

**BioVendor
Group**

NGS

CZE

Návod k použití:
fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit

Katalogové číslo:
RDNGS0022

Pouze pro výzkumné účely



**BioVendor
R&D®**



BioVendor – Laboratorní medicína s.r.o.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

+420 549 124 185

info@biovendor.com

sales@biovendor.com

www.biovendor.com

1.	URČENÝ ÚČEL	3
2.	ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA	5
3.	SKLADOVÁNÍ	5
4.	ÚVOD	6
5.	PRINCIP STANOVENÍ	7
6.	UPOZORNĚNÍ	7
7.	TECHNICKÁ DOPORUČENÍ	8
8.	SLOŽENÍ SOUPRAVY	9
9.	DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)	10
10.	PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	11
11.	PŘÍPRAVA VZORKŮ	12
12.	POSTUP STANOVENÍ	13
13.	VYHODNOCENÍ	19
14.	LIMITACE SOUPRAVY	23
15.	CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY	23
16.	ČASTO Kladené DOTAZY	24
17.	REFERENCE	25
18.	VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM	26

HISTORIE ZMĚN

Předchozí verze	Platná verze
CZE.001.A	CZE.001.B
Oprava formální chyby v kapitole 13, změna nomenklatury varianty	

1. URČENÝ ÚČEL

RDNGS0022 fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit slouží pro rychlou přípravu sekvenační knihovny potřebné pro genotypizaci oblastí rs2395182, rs7775228, rs4713586, rs2187668, rs7454108, rs1004819, rs10889677, rs2066844, rs2066845 a rs2066847 metodou sekvenování nové generace (NGS). Tyto oblasti jsou asociovány s haplotypy HLA-DQ2 a HLA-DQ8 souvisejícími s predispozicí k celiakii a s geny *IL23R* a *NOD2* asociovanými s predispozicí ke Crohnově chorobě.

Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je izolovaná DNA.

1.1 Použité zkratky

Ct	číslo cyklu (Cycle Threshold)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
FAM/SYBR	6-karboxyfluorescein/ Asymmetrical Cyanine Dye
HLA	lidský leukocytární antigen (Human Leukocyte Antigen)
<i>IL23R</i>	Interleukin-23 receptor
LoD	limit detekce (Limit of Detection)
NC	negativní kontrola (Negative Control)
NGS	sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)
<i>NOD2</i>	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
PC	pozitivní kontrola (Positive Control)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Quantitative Polymerase Chain Reaction)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (Single-Nucleotide Polymorphism)
VAF	frekvence variantní alely (Variant Allele Frequency)

2. ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA

- **Pouze pro výzkumné účely.**
- Celková doba přípravy sekvenační knihovny je kratší než 3 hodiny a zahrnuje méně než 30 minut laboratorních operací.
- Technologie je založena na **rychlé** a **robustní** jednokrokové přípravě sekvenační knihovny za účelem genotypizace vybraných oblastí významných pro určení predispozice u Celiakie a Crohnovy choroby.
- Souprava obsahuje **kompletní Master Mixy** k přímému použití, včetně indexů.
- Souprava fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit je určena pro vyšetření celkem 10 vybraných oblastí v haplotypech HLA-DQ2 a HLA-DQ8 a genech *IL23R*, *NOD2* u 16 vzorků s unikátní kombinací indexů do jednoho sekvenačního běhu.
- Příprava knihovny pomocí soupravy fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit **vyžaduje pouze přidání izolované DNA** ke konkrétnímu Master Mixu a analýzu pomocí Real-Time PCR termocykleru.

3. SKLADOVÁNÍ

Soupravu skladujte při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za těchto podmínek jsou všechny komponenty stabilní po dobu expirace uvedené na vnějším obalu.

- Souprava fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit je dodávána zamražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po dodání skladujte fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Komponenty soupravy chraňte před světlem.**
- Omezte opakované zmražení a rozmražení Master Mixů.
- Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace.

4. ÚVOD

Crohnova choroba je chronické zánětlivé onemocnění trávicího traktu patřící mezi idiopatické střevní záněty.

Za jeden z nejvýznamnějších genetických rizikových faktorů jsou považovány mutace genu **NOD2**. Vyšetřované varianty **rs2066844**, **rs2066845** a **rs2066847** patří mezi nejlépe známé mutace genu *NOD2*.

Rizikový je také gen **IL23R**, který souvisí s regulací imunity a procesem autofagie – mechanismem odstraňování poškozených buněk a mikroorganismů. Vyšetřované genetické varianty – **rs1004819** a **rs10889677**.

Celiakie je chronické autoimunitní onemocnění, při kterém imunitní systém reaguje na lepek. U geneticky predisponovaných jedinců vede příjem lepku k poškození sliznice tenkého střeva, což narušuje vstřebávání živin.

HLA-DQ2.5, **HLA-DQ2.2** a **HLA-DQ8** jsou genetické varianty systému HLA II, které významně souvisejí s rozvojem celiakie. Nejvýznamnější genetické riziko představuje HLA-DQ2.5, které se vyskytuje přibližně u 90–95 % pacientů s celiakií. HLA-DQ8 je přítomno u menší části pacientů, zatímco HLA-DQ2.2 je spojeno s nižším rizikem, ale v kombinaci s dalšími rizikovými variantami může také přispívat k rozvoji onemocnění. Vyšetřované genetické varianty u haplotypu HLA-DQ2.2 – **rs2395182**, **rs7775228** a **rs4713586**, u HLA-DQ2.5 – **rs2187668** a u HLA-DQ8 – **rs7454108**.

Genetický screening založený na metodě NGS je vysoce citlivý a specifický.

Základem NGS genotypizace je příprava vhodného dvouvláknového DNA konstruktů (tzv. sekvenační knihovny), který musí obsahovat:

- cílovou sekvenci pro účely genotypizace (úsek DNA)
- adaptérovou sekvenci pro nasedání sekvenačních primerů
- indexovou sekvenci, která je pro vzorek v daném běhu unikátní, sloužící ke ztotožnění získaných výsledků s odpovídajícím vzorkem DNA (pacientem) a umožňuje tak paralelní sekvenování více vzorků v jednom běhu
- sekvenci pro navázání DNA konstruktů na povrch flowcellu

5. PRINCIP STANOVENÍ

Souprava fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit slouží k přípravě vzorku na vyšetření genetických variant spojených s predispozicí pro Crohnovu chorobu (**rs2066844**, **rs2066845**, **rs2066847**, **rs1004819**, **rs10889677**) a s predispozicí pro celiakii (**rs2395182**, **rs7775228**, **rs4713586**, **rs2187668**, **rs7454108**) pomocí NGS. Princip stanovení využívá krátkých amplikonů získaných pomocí jediné polymerázové řetězové reakce s tagovanými hybridními primery, kdy dochází k amplifikaci úseků o průměrné délce 283 párů bází a následnému sekvenování o vysokém pokrytí. Použití krátkých amplikonů zvyšuje amplifikovatelnost DNA a výtěžnost. Master Mixy dodávané ve formátu k přímému použití umožňují úsporu celkového času na vyšetření a snížení rizika chyby.

Příprava sekvenační knihovny pomocí soupravy fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit vyžaduje pouze přidání izolované DNA ke konkrétnímu Master Mixu a analýzu pomocí Real-Time PCR termocykleru.

K vyhodnocení sekvenačních dat je doporučen software GENOVESA, modul fastGEN, který je součástí komplexního řešení.

6. UPOZORNĚNÍ

- **Pouze pro profesionální použití vyškolenými pracovníky v adekvátním laboratorním prostředí.**
- Komponenty soupravy fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit neobsahují infekční materiál.
- Se vzorky pro testování soupravou fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem a je nutno dodržovat standardní bezpečnostní opatření.
- Nepijte, nejezte a nekuřte v prostoru, kde se pracuje s biologickým materiálem.

7. TECHNICKÁ DOPORUČENÍ

- Před a po každém testu musí být pracovní prostředí dekontaminováno vhodnými prostředky odstraňujícími RNázy, DNázy i standardními dezinfekčními prostředky. Práce v nevhodném prostředí může vést ke kontaminaci komponent soupravy.
- Master Mixy nealikvotujte ani opakovaně nerozmrazujte, vícenásobné rozmražení může negativně ovlivnit kvalitu testu.
- Jednotlivé komponenty soupravy rozmrazujte těsně před použitím. Minimalizujte dobu, kdy jsou reagenty při běžné laboratorní teplotě. Pracujte na ledu nebo za použití chladících stojánků.
- Před použitím reagenty promíchejte jemným vortexováním a krátce zcentrifugujte.
- Přípravu qPCR a post-amplifikační kroky provádějte v oddělených laboratorních prostorech.
- Zabraňte kontaminaci vzorků a reagentů. Z tohoto důvodu používejte pro každý vzorek a reagenty špičky na jedno použití.
- Likvidaci spotřebovaného a nepoužitého materiálu provádějte v souladu s platnou legislativou.

8. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Souprava **fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit** je dodávána ve formátu k přímému použití a analýze 16 vzorků (Tabulka 1). Součástí soupravy jsou **specifické Master Mixy** obsahující všechny potřebné komponenty reakce.

Komponenty soupravy	Sekvence indexů P7	Sekvence indexů P5	Objem v 1 zkumavce (μl)	Počet zkumavek	Forma dodání
Master Mix B21	CTTGAGAA	CTCAGACG	18	1	přímé použití
Master Mix B22	ATCCTCAA	CTCAGACG	18	1	přímé použití
Master Mix B23	TTGGCGTT	CTCAGACG	18	1	přímé použití
Master Mix B24	GCAGGCTT	CTCAGACG	18	1	přímé použití
Master Mix C21	CTTGAGAA	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
Master Mix C22	ATCCTCAA	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
Master Mix C23	TTGGCGTT	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
Master Mix C24	GCAGGCTT	GAGCTCGT	18	1	přímé použití
Master Mix D21	CTTGAGAA	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
Master Mix D22	ATCCTCAA	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
Master Mix D23	TTGGCGTT	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
Master Mix D24	GCAGGCTT	TCTGAGTA	18	1	přímé použití
Master Mix E21	CTTGAGAA	CAAGTTAT	18	1	přímé použití
Master Mix E22	ATCCTCAA	CAAGTTAT	18	1	přímé použití
Master Mix E23	TTGGCGTT	CAAGTTAT	18	1	přímé použití
Master Mix E24	GCAGGCTT	CAAGTTAT	18	1	přímé použití

Tabulka 1: Složení soupravy fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit

9. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

9.1 Chemikálie

- Vyšetřovaný vzorek DNA
- Standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaných oblastí (vhodný jako **pozitivní kontrola**)
- Voda pro molekulární biologii (Nuclease Free Water, vhodná jako **negativní kontrola**)
- Sekvenační kit
- Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies)
- NaOH (p.a.)
- Tween 20
- Kit nebo magnetické částice pro purifikaci DNA poolu
- Komerčně dostupné roztoky pro dekontaminaci povrchů

9.2 Materiál

- Zkumavky 0,2 ml a zkumavky 1,5–2 ml vhodné pro práci s nukleovými kyselinami (RNase + DNase free, low binding nucleic acid tubes)
- PCR zkumavky/stripy/destičky dle použitého Real-Time PCR termocykleru (vhodné pro práci s nukleovými kyselinami)
- Adhezivní PCR fólie
- Stojánky na zkumavky
- Chladicí bločky/lednice/mrazák/box s ledem pro vychlazení zkumavek
- Jednorázové utěrky na optická zařízení
- Jednorázové špičky s filtrem; tenká plastová Pasteurova pipeta
- Ochranné pomůcky (rukavice, oděv)

9.3 Přístroje

- Automatické pipety pro objemy 0,2–1 000 µl
- Real-Time PCR termocykler
- Flowbox/PCR box
- Fluorimetr
- Vortex, combi-spin (centrifuga a vortex), centrifugy
- Sekvenátor

10. PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Připravte odpovídající počet zkumavek s Master Mixy potřebnými pro plánovaný test.

Nepoužívejte komponenty po uplynutí doby expirace vyznačené na obalu.

Reagencie jsou dodávány ve formě k přímému použití nebo k ředění.

10.1 fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit: Master Mix

Pro genotypizaci vyšetřovaných oblastí nechte před přípravou reakce rozmrazit adekvátní počet zkumavek Master Mix a uchovejte v chladu do doby těsně před použitím.

VZOR

11. PŘÍPRAVA VZORKŮ

- Pracujte ve vhodném PCR boxu.
- Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je izolovaná DNA.
- Stanovte vhodné ředění na základě koncentrace vstupní DNA dle Tabulka 2.
- Příliš koncentrovaná DNA může vést k inhibičním jevům PCR a nesprávným výsledkům. Vzorky o velmi nízké koncentraci DNA neředěte a zahrňte je do analýzy v duplikátu (pipetujte 5 µl DNA do zkumavek se dvěma různými Master Mixy).
- Do jedné reakce pipetujte vždy **5 µl DNA** vzorku připraveného dle Tabulka 2.
- Vzorek naředěný na vhodnou koncentraci je **připraven k analýze**. Pokračujte dle kapitoly 12. Postup stanovení.

	Koncentrace Qubit HS	Ředění	Postup ředění
A	>10 ng/µl	5 x	1 µl DNA + 4 µl H ₂ O
B	1–10 ng/µl	bez ředění	5 µl DNA

Tabulka 2: Stanovení vhodného ředění DNA do PCR

Doporučení:

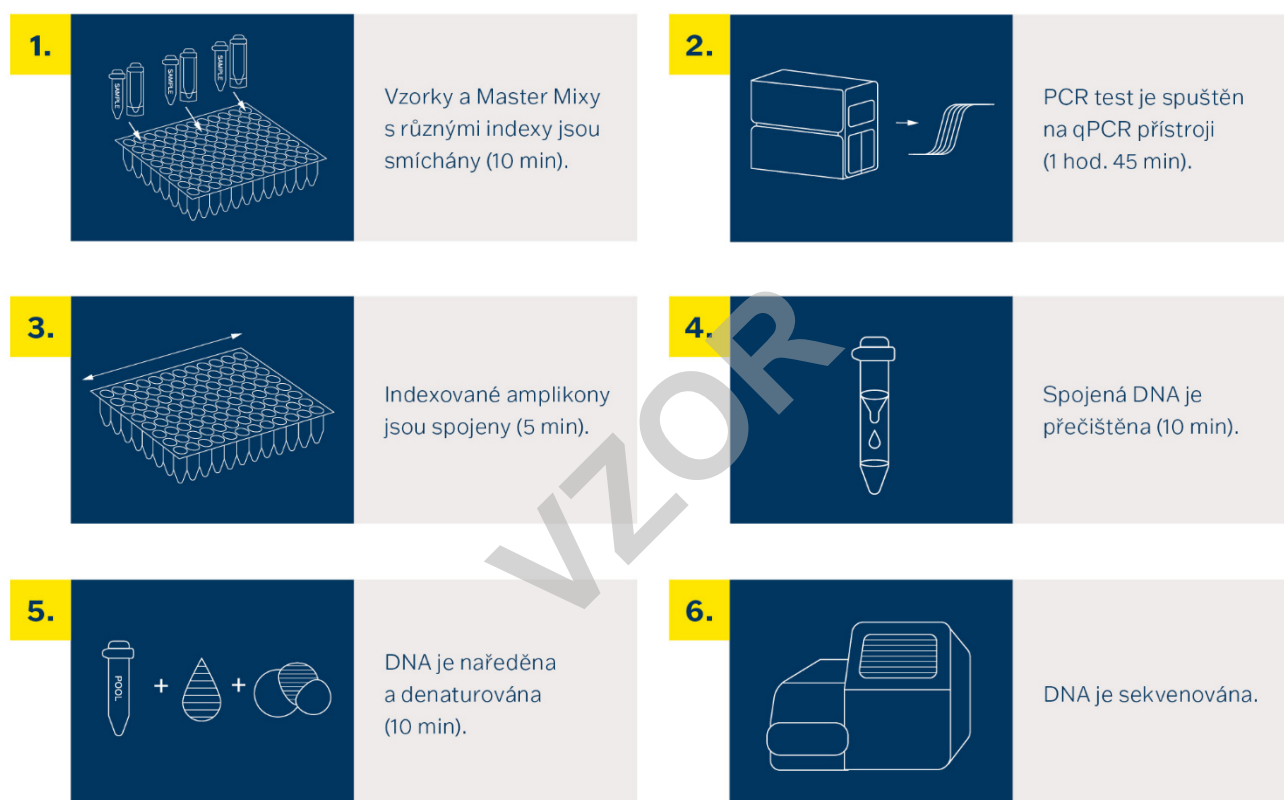
Do každého běhu testování pomocí fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit je doporučeno přidávat **pozitivní kontrolu (PC)**; standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaných oblastí, není dodáván se soupravou) a **negativní kontrolu (NC)** pro zhodnocení správné přípravy reakcí a vyloučení kontaminace. Při nedodržení tohoto doporučení nelze vyloučit falešně pozitivní či negativní výsledky. PC připravte obdobným ředěním jako vyšetřované vzorky DNA.

S pozitivní kontrolou manipulujte s opatrností a pipetujte jako poslední součást reakce. Při nevhodné manipulaci může dojít ke kontaminaci testu a falešně pozitivním výsledkům. Při podezření na kontaminaci test opakujte.

12. POSTUP STANOVENÍ

Technologie NGS umožňuje sekvenovat všechny požadované úseky DNA se sekvenačním pokrytím v řádu tisíců čtení pro každý vzorek. Metoda je proto vysoce citlivá. Minimální vstup do reakce je 5 ng DNA.

Souprava je navržena tak, aby bylo možné zpracovat až 16 vzorků pro vyšetření genetických variant spojených s predispozicí pro Crohnovu chorobu a s predispozicí pro celiakii v jednom sekvenačním běhu.



Obrázek 1: Schéma postupu genotypizace pomocí soupravy fastGEN

12.1 Příprava DNA knihovny

12.1.1 Příprava vyšetřované DNA

Pracujte ve vhodném PCR boxu.

- Vzorky si připravte podle svého pracovního rozpisu.
- DNA vzorky krátce vortexujte a centrifugujte.
- Do PCR destičky anebo stripu pipetujte **5 µl vzorku DNA** o vhodné koncentraci (viz kapitola 11).
- Doporučení:
 - Zahrňte mezi skupinu vyšetřovaných vzorků také pozitivní (PC) a negativní (NC) kontrolu.
 - Pipetujte **5 µl DNA pozitivní kontroly** o vhodné koncentraci (viz kapitola 11).
 - Pipetujte **5 µl vody pro molekulární biologii** jako negativní kontrolu.

12.1.2 Příprava Master Mixů

Pracujte ve vhodném PCR boxu v pre-PCR místnosti.

- Označte si PCR desku nebo stripy.
- Po rozmražení Master Mixy krátce vortexujte a centrifugujte.
- Ke každému vzorku nebo kontrole přidejte **15 µl Master Mixu**.
- Celkový objem PCR reakce je **20 µl**.
- V jedné pozici můžete použít jenom **jeden** druh Master Mixu.
- Maximální možný počet souběžně vyšetřovaných vzorků včetně kontrol je 16.
- Jednotlivé Master Mixy otvírejte postupně a vždy těsně před přidáním do reakce, poté ihned uzavřete. Zabraňte současnému otevírání více Master Mixů, aby nedošlo k vzájemné kontaminaci.
- Zalepte PCR desku lepicí fólií nebo uzavřete mikrozskumavky, vortexujte, krátce centrifugujte (15 s, 280 x g).

12.1.3 qPCR

Na Real-Time PCR termocykleru nastavte amplifikační program dle Tabulka 3.

Detekce signálu probíhá v **amplifikačním cyklu***, v kanálu **FAM/SYBR/Green channel**.

Krok	Čas	Teplota	
Denaturace	2 min	95 °C	
Amplifikační cyklus	15 s	95 °C	40 cyklů
	30 s	62 °C	
	30 s	72 °C*	
Finální elongace	5 min	72 °C	
Křivka tání†		60 °C → 95 °C	
Chlazení	∞	4 °C	

Tabulka 3: Program qPCR amplifikace († doporučený krok)

- Zadejte identifikaci vzorků do ovládacího programu Real-Time PCR termocykleru.
- Spustíte nastavený amplifikační program se vzorky.
- Zpracujte a exportujte qPCR data a proveďte kontrolu amplifikace. Hodnoty Ct uložte pro případnou kontrolu.
- Produkty PCR uchovejte pro další použití při 4 °C. Pro dlouhodobé skladování je uchovejte při -20 °C.

12.2 Spojení ampliconů v DNA pool, purifikace a kvantifikace

Celý proces přípravy knihovny provádějte v post-PCR místnosti ve vhodném boxu a **po celou dobu, vyjma denaturace, udržujte amplicony a DNA pool na ledu.**

12.2.1 Spojení ampliconů v DNA pool

- Po ukončení qPCR amplifikace zkumavky s amplicony krátce zcentrifugujte.
- Pro vytvoření knihovny pro genotypizaci oblastí spojených s predispozicí pro Crohnovu chorobu a s predispozicí pro celiakii:
 - Smíchejte jednotlivé amplicony všech vzorků do jednoho DNA poolu ve stejném poměru.
 - Příklad: Při počtu 16 vzorků smíchejte jednotlivé amplicony v množství 3 µl PCR produktu z každého vzorku. Takto získáte DNA pool v objemu 48 µl.
 - Finální objem DNA poolu stanovte dle používaného kitu pro purifikaci DNA poolu.
 - Doporučení: V případě, že vzorek vykazuje hodnotu Ct > 31 přidejte dvojnásobek, ev. pro Ct > 34 trojnásobek objemu ampliconu do DNA poolu. V případě, že vzorek vykazuje hodnotu Ct > 36, do DNA poolu ho nepřidávejte a vyřadte jej ze sekvenace.
- Pro purifikaci přeneste DNA pool do nové 1,5 ml zkumavky.
- Původní PCR destičku/stripy s amplicony uchovejte zmražené pro případné opakování purifikace DNA poolu.

12.2.2 Purifikace DNA poolu

- Pro purifikaci DNA poolu postupujte dle návodu výrobce purifikačního kitu.
- Purifikovaný DNA pool uchovejte dle pokynů výrobce purifikačního kitu.

12.2.3 Kvantifikace DNA poolu

- Fluorimetricky stanovte koncentraci DNA poolu po jeho přečištění.
- Doporučená koncentrace DNA poolu je cca 40–80 ng/µl; nejnižší akceptovatelná koncentrace je 10 ng/µl.
- Z naměřené hmotnostní koncentrace vypočítejte molaritu DNA poolu podle vzorce:

$$c[nM] = \frac{\rho_i \left[\frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^6}{(660 \times 283)}$$

- ρ_i je hmotnostní koncentrace DNA
- **283 je orientační průměrná velikost molekuly DNA po indexaci [bp]**
- 660 g/mol je průměrná molární hmotnost jedné báze (bp)

12.3 Příprava na sekvenaci

12.3.1 Příprava sekvenátoru

Před použitím sekvenátoru, nejlépe v době, kdy probíhá qPCR, sekvenátor promyjte (tzv. „maintenance wash“) a rozmrazte sekvenační kazetu. Provedte „power cycling“ sekvenátoru.

12.3.2 Příprava knihovny

Sekvenační knihovna připravená pomocí fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit je vhodná k použití na všech sekvenátorech značky Illumina® a využívá Illumina® sekvenační primery.

12.3.3 Ředění a denaturace DNA poolu

Nařed'te purifikovaný DNA pool na požadovanou koncentraci dle doporučení Illumina® a dle používaného sekvenátoru.

Proved'te denaturaci vhodně nařed'ného DNA poolu NaOH. Vždy je nutné připravit čerstvý roztok NaOH. Zřed'te denaturovaný DNA pool vychlazeným puřem HT1 z lednice na finální koncentraci. Před aplikací uchovejte DNA pool v lednici.

12.3.4 Příprava sekvenační kazety, spuštění sekvenačního programu

Zkontrolujte, že sekvenační kazeta je dokonale rozmražená a zamíchejte její obsah převrácením (3x). Připravte flowcellu podle pokynů výrobce a spusťte sekvenační program (software od Illumina®). Postupujte podle pokynů výrobce přístroje.

Na jeden vzorek je potřeba **75 000 paired-end readů**. Při nastavování runu uveďte délku čtení 151 bp (paired-end read) a velikost indexu 8 bp.

12.3.5 Doporučení pro sekvenátor typu MiSeq

Koncentrace řed'ného DNA poolu musí být v rozsahu 1,6–2,4 nM. Denaturujte 5 µl DNA poolu s 5 µl čerstvě připraveného 0,2M NaOH po dobu 5 min při pokojové teplotě. Zřed'te denaturovaný DNA pool vychlazeným puřem HT1 na finální koncentraci 10 pM (např. 10 µl DNA pool + 990 µl HT1). Ředění je možné upravit tak, aby bylo dosahováno optimálních hodnot sekvenační hustoty.

Pipetujte 600 µl nařed'né 10pM DNA knihovny do sekvenační kazety do pozice 17.

12.3.6 Doporučení pro sekvenátor MiniSeq

Koncentrace řed'ného DNA poolu musí být v rozsahu 0,8–1,2 nM. Denaturujte 5 µl DNA poolu s 5 µl čerstvě připraveným 0,2M NaOH po dobu 5 min při pokojové teplotě. Přidejte 5 µl 200mM

Tris-HCl. Zředte denaturovaný DNA pool 985 µl vychlazeného pufru HT1 na koncentraci 5 pM. Následně naředte 5pM DNA pool vychlazeným HT1 na finální koncentraci 1,4 pM (např. 150 µl DNA 5pM pool + 385 µl HT1) nebo 1,6 pM (např. 170 µl DNA 5 pM pool + 361 µl HT1). Ředění je možné upravit tak, aby bylo dosahováno optimálních hodnot sekvenační hustoty.

Pipetujte 500 µl naředěné 1,4pM nebo 1,6pM DNA knihovny do pozice 16.

12.3.7 Doporučení pro sekvenátor NextSeq 500/550

Koncentrace ředěného DNA poolu musí být v rozsahu 3,6–4,4 nM. Přidejte fastGEN DNA pool ke zředěnému poolu další sekvenační knihovny. Denaturujte 5 µl celkového DNA poolu s 5 µl čerstvě připraveného 0,2M NaOH po dobu 5 min při pokojové teplotě. Přidejte 5 µl 200mM Tris-HCl. Zředte denaturovaný DNA pool 985 µl vychlazeného pufru HT1 na koncentraci 20 pM. Následně naředte 20pM DNA pool vychlazeným HT1 na finální koncentraci 1,5 pM (např. 100 µl 20pM DNA pool + 1 233 µl HT1) pro Mid Output nebo 1,8 pM (např. 120 µl 20pM DNA pool + 1 213 µl HT1) pro High Output. Ředění je možné upravit tak, aby bylo dosahováno optimálních hodnot sekvenační hustoty.

Pipetujte 1 300 µl naředěné 1,5pM nebo 1,8pM DNA knihovny do pozice 10.

12.3.8 Doporučení pro sekvenátor NovaSeq, reagent kit v1.5 SP, S1, S2, S4

Koncentrace ředěného DNA poolu musí být v rozsahu 1–2 nM. Přidejte fastGEN DNA pool ke zředěnému poolu další sekvenační knihovny. Typicky fastGEN knihovna vyžaduje 0,2–1 % sekvenační kapacity kitu NovaSEQ SP. Ředění a podíl je možné upravit tak, aby bylo dosahováno optimálních hodnot sekvenační hustoty a počtu čtení na vzorek. Denaturujte celkový DNA pool (SP/S1 100 µl; S2 150 µl; S4 310 µl) pomocí čerstvě připraveného 0,2M NaOH (SP/S1 25 µl; S2 37 µl; S4 77 µl) po dobu 8 min při pokojové teplotě. Přidejte 400mM Tris-HCl (SP/S1 25 µl; S2 38 µl; S4 78 µl).

Pipetujte 150 µl (SP, S1), 225 µl (S2), 465 µl (S4) naředěné, denaturované a neutralizované knihovny do pozice 8.

Poznámka: V případě, že DNA pool přidáváte k jiné knihovně, kontaktujte aplikační podporu.

13. VYHODNOCENÍ

Pro vyhodnocení sekvenačních dat použijte software GENOVESA, modul fastGEN, který je dostupný online na adrese www.biovendor.com.

GENOVESA modul fastGEN

Jedná se o cloudové all-in-one řešení pro analýzu hrubých dat sekvenátorů (FASTQ files) s technickou a aplikační podporou v češtině.

Software umožňuje:

- pokročilou kontrolu kvality sekvenačních dat
- automatické upozornění na regiony s nízkým pokrytím
- jednoduchou filtraci relevantních variant
- měsíční update anotačních databází
- možnost customizace
- ukládat patientská data a varianty do interní databáze
- report na jedno kliknutí

13.1 Genotypizace variant

U variant **rs10889677**, **rs2066844**, **rs2066845** a **rs2066847** je výsledek považován za pozitivní, pokud byla varianta detekována s frekvencí ≥ 14 %.

Varianta **rs1004819** je považována za pozitivní, pokud byla detekována s frekvencí < 86 %.

U variant **rs2187668** (HLA-DQ2.5) a **rs7454108** (HLA-DQ8) je výsledek považován za pozitivní, pokud byla varianta detekována s frekvencí ≥ 14 %.

Varianty rs2395182, rs7775228 a rs4713586 jsou ve vazbě a společně určují, zda vzniká predispozice typu HLA-DQ2.2 (viz Tabulka 4). Haplotyp HLA-DQ2.2 je pozitivní za těchto podmínek:

- u variant **rs2395182** a **rs7775228** je výsledek považován za pozitivní, pokud byla varianta detekována s frekvencí ≥ 14 %
- u varianty **rs4713586** je výsledek považován za pozitivní, pokud byla varianta detekována s frekvencí < 86 %

POZOR! Vzhledem k tomu, že se varianty rs4713586 a rs1004819 projevují jako pozitivní u alely vedené v referenčním genomu GRCh38, výskyt variantní alely značí zdravého jedince.

U pacienta s pozitivní variantou v homozygotním stavu bude hodnota VAF < 1 % a tím pádem se v GENOVESA v soupisu variant nevypisuje!

Výsledek genotypizace pro **vzorky s velmi nízkou koncentrací DNA** je považován za validní, pokud se výsledek detekce varianty shoduje pro oba duplikáty s odlišnými Master Mixy.

VZOR

Soupis variant a jejich hodnocení

Haplotyp	dbSNP	Ref. alela	Alt. alela	Pozitivní alela	Výsledek genotypizace VAF < 13,99 %	Výsledek analýzy		Výsledek genotypizace VAF 14–85,99 %	Výsledek analýzy		Výsledek genotypizace VAF > 86 %	Výsledek analýzy	
HLA-DQ2.2	rs2395182	G	T	T	homozygot GG	negativní	HLA-DQ2.2 negativní	heterozygot GT	pozitivní	HLA-DQ2.2 pozitivní	homozygot TT	pozitivní	HLA-DQ2.2 negativní
	rs7775228	T	C	C	homozygot TT	negativní		heterozygot TC	pozitivní		homozygot CC	pozitivní	
	rs4713586	A	G	A	homozygot AA	pozitivní		heterozygot AG	pozitivní		homozygot GG	negativní	
HLA-DQ2.5	rs2187668	C	T	T	homozygot CC	negativní	HLA-DQ2.5 negativní	heterozygot CT	pozitivní	HLA-DQ2.5 pozitivní	homozygot TT	pozitivní	HLA-DQ2.5 pozitivní
HLA-DQ8	rs7454108	T	C	C	homozygot TT	negativní	HLA-DQ8 negativní	heterozygot TC	pozitivní	HLA-DQ8 pozitivní	homozygot CC	pozitivní	HLA-DQ8 pozitivní

Tabulka 4: Hodnocení variant u predispozice pro celiakii

Gen	dbSNP	Ref. alela	Alt. alela	Pozitivní alela	Výsledek genotypizace VAF < 13,99 %	Výsledek analýzy	Výsledek genotypizace VAF 14–85,99 %	Výsledek analýzy	Výsledek genotypizace VAF > 86 %	Výsledek analýzy
IL23R	rs1004819	G	A	G	homozygot GG	pozitivní	heterozygot GA	pozitivní	homozygot AA	negativní
IL23R	rs10889677	C	A	A	homozygot CC	negativní	heterozygot CA	pozitivní	homozygot AA	pozitivní
NOD2	rs2066844	C	T	T	homozygot CC	negativní	heterozygot CT	pozitivní	homozygot TT	pozitivní
NOD2	rs2066845	G	C	C	homozygot GG	negativní	heterozygot GC	pozitivní	homozygot CC	pozitivní
NOD2	rs2066847	G	ins C	ins C	homozygot GG	negativní	heterozygotní inserce	pozitivní	homozygotní inserce	pozitivní

Tabulka 5: Hodnocení variant u predispozice pro Crohnovu chorobu

13.2 Negativní výsledek

Pokud nejsou dané varianty detekovány, nebo nedosahuje jejich četnost předepsané frekvence, výsledek genotypizace je negativní.

13.3 Interpretace PC a NC

Zahrnutí pozitivní a negativní non-templátové kontroly pro každý běh testu (skupinu vzorků měřenou současně) je doporučeno pro kontrolu správného provedení přípravy DNA knihovny a vyloučení technických problémů.

13.3.1 Pozitivní kontrola musí splňovat následující kritéria:

- V qPCR amplifikačním kroku přípravy knihovny je detekována s hodnotou minimálně o 3 Ct nižší než NC ($Ct_{PC} + 3 \leq Ct_{NC}$).
- Po vyhodnocení sekvenčních dat vykazuje přítomnost daných variant v předepsaných frekvencích.

13.3.2 Negativní kontrola musí splňovat následující kritéria:

- V qPCR amplifikačním kroku přípravy knihovny není detekována nebo má Ct hodnotu minimálně o 3 Ct vyšší než poslední vzorek/PC. Pokud je rozdíl mezi PC a NC menší než 3 Ct, zařaďte vzorek rovněž do DNA poolu k sekvenaci.

Pokud PC a NC nesplňuje jeden z parametrů, test neproběhl zcela správně a je nezbytné individuálně zhodnotit dopad na interpretaci dat. Můžete kontaktovat aplikační podporu www.biovendor.com.

Více informací v kapitole 16. Často kladené dotazy.

14. LIMITACE SOUPRAVY

- Souprava fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit je validována na DNA izolované z bukalního stěru, periferní krve, syntetických DNA kontrolách a referenčních standardech. Výsledek je ovlivněn kvalitou vzorku. Správný postup odběru, transportu, izolace DNA a skladování vzorků je pro vyšetření důležitý. Kvalita vzorku (integrita DNA) ovlivňuje jeho amplifikovatelnost. Za kvalitu vzorků zodpovídá uživatel soupravy.
- Výsledky genotypizace by měly být hodnoceny odborným pracovníkem ve zdravotnictví.
- Souprava fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit je navržena pro rychlou přípravu sekvenční knihovny, potřebnou pro genotypizaci oblastí rs2395182, rs7775228, rs4713586, rs2187668, rs7454108 u celiakie a oblastí rs1004819 a rs10889677 u genu *IL23R* a oblastí rs2066844, rs2066845, rs2066847 v genu *NOD2* u Crohnovy choroby technologií NGS. Sekvenční varianty jiných oblastí, nejsou kitem fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit zjistitelné.
- Negativní výsledek nevylučuje mutace pod limitem detekce metody.
- Za validaci soupravy fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit v kombinaci s dalšími produkty a přístroji (např. izolační kit, sekvenátor, software na vyhodnocení dat) při jejich zařazení do diagnostického procesu zodpovídá uživatel soupravy.
- U soupravy fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit se v oblastí primerů vyskytují sekvenční varianty jako např. rs113035896, rs2858326 a rs116178934, které by mohly ovlivnit funkčnost jednotlivých fastGEN primerů a mohou vést ke snížení efektivity amplifikace daného amplikonu. K ovlivnění funkčnosti fastGEN primerů může dojít i při výskytu vzácných sekvenčních variant.

Při provedení testu by měly být dodrženy všechny instrukce uvedené v tomto dokumentu. Jejich nedodržení může ovlivnit kvalitu a spolehlivost výsledků.

15. CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY

Vyhodnocením dat v rámci analytické charakteristiky soupravy fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit firmy BioVendor – Laboratorní medicína s.r.o. byly stanoveny parametry analytické senzitivity a specifity. Pro soupravu byl stanoven limit detekce metody a ověřena křížová reaktivita primerů (*in silico*). Byla testována opakovatelnost a robustnost metody na sérii totožných vzorků ve dvou nezávislých experimentech s definovanou změnou podmínek. Souprava fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit byla validována na DNA izolované z bukalního stěru, periferní krve, syntetických DNA kontrolách a referenčních standardech.

16. ČASTO Kladené dotazy

1. Kolik vzorků lze sekvenovat současně v 1 běhu?

Na jeden vzorek je potřeba 75 000 paired-end readů. MiSeq Reagent kit v2 Nano, který má kapacitu 2 mil paired-end readů, je dostačující až pro 16 vzorků a je zaplněn ze 60 %. MiSeq Reagent kit v2 Micro, který má 8 mil paired-end readů je při sekvenaci 16 vzorků zaplněn z 15 %.

2. Lze použít i jiný nástroj na analýzu dat?

Ano, na sekundární analýzu dat je možné použít např. Local Run Manager nebo BaseSpace Sequencing Hub.

3. Jaký typ sekvenátoru je vhodný pro analýzu vzorků připravených kity fastGEN?

Pro sekvenování knihoven připravených pomocí souprav fastGEN jsou vhodné sekvenátory značky Illumina®.

4. Lze kombinovat soupravy na genotypizaci?

Ano, je možné vzájemně kombinovat všechny soupravy z řady fastGEN. V případě, že DNA pool přidáváte k jiné knihovně, kontaktujte aplikační podporu.

5. Jak přistoupit k hodnocení výsledků v případě, že PC a NC nesplňují daná kritéria?

Příčiny nestandardních výsledků PC a NC mohou být různé. Doporučujeme ověřit kvalitu a správný typ použité PC (musí obsahovat vyšetřované varianty), dále ověřte nastavení technického vybavení, ověřte, zda nedošlo k manuální chybě při přípravě knihovny či kontaminaci materiálu. Standardní NC by při sekvenaci neměla vykazovat ready v oblasti analyzované kitem. V případě nejasností se obraťte na zákaznickou podporu.

6. U *NOD2* genu je známá inzerce c.2938dup (p.Leu980fs), která způsobuje frameshift mutaci. Je kitem detekovatelná?

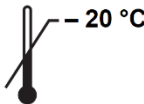
Ano, mutace, také známá jako c.3020insC (p.Leu1007fs), je kitem fastGEN Crohn's & Celiac Disease Kit detekovatelná. Její označení se v roce 2017 v databázi dbSNP změnilo a varianta rs5743293 byla spojena s dalšími variantami do jedné souhrnné varianty rs2066847.

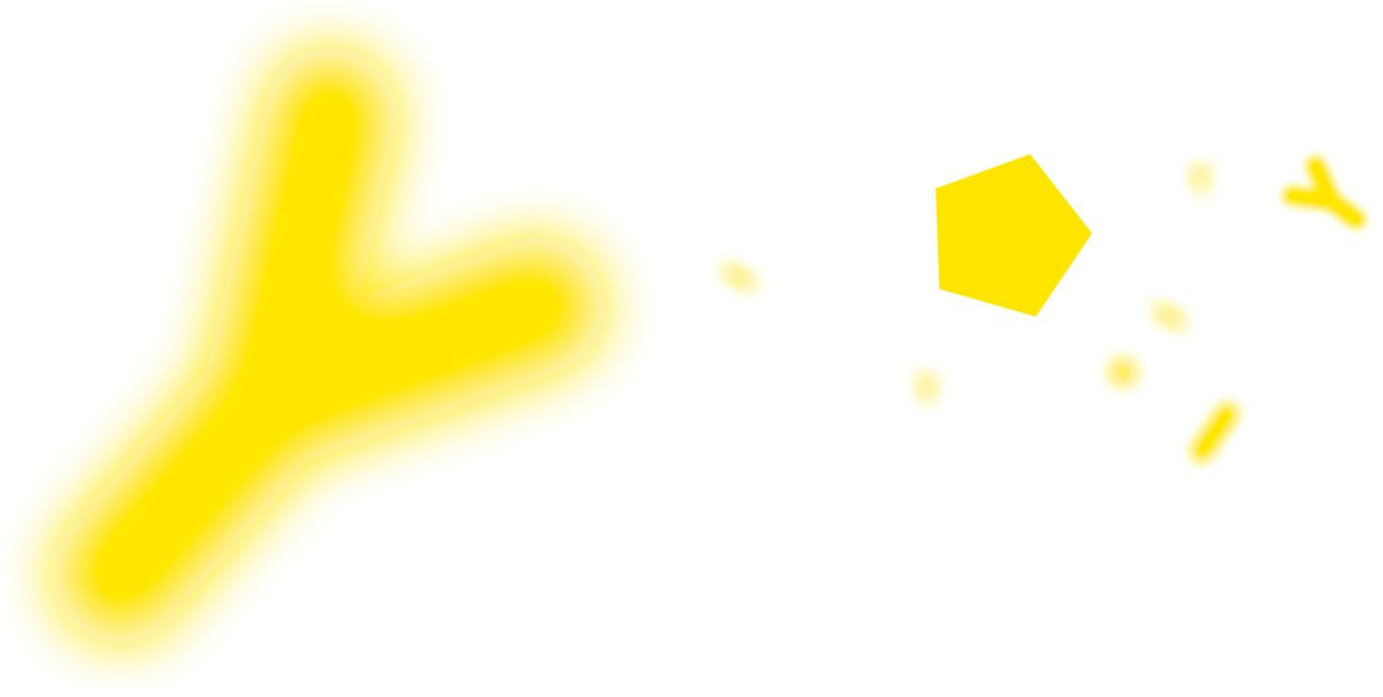
17. REFERENCE

Pro více referencí k tomuto produktu navštivte naše webové stránky www.biovendor.com.

- [1] Hardy MY, Ontiveros N, Varney MD, Tye-Din JA. Resolving incomplete single nucleotide polymorphism tagging of HLA-DQ2.2 for coeliac disease genotyping using digital droplet PCR. *HLA*. 2018;91(4):280-288. doi:10.1111/tan.13219
- [2] Kutszegi N, Gézsi A, F Semsei Á, et al. Two tagging single-nucleotide polymorphisms to capture HLA-DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*02:02 haplotype associated with asparaginase hypersensitivity. *Br J Clin Pharmacol*. 2021;87(6):2542-2548. doi:10.1111/bcp.14664
- [3] Michail S, Bultron G, Depaolo RW. Genetic variants associated with Crohn's disease. *Appl Clin Genet*. 2013;6:25-32. Published 2013 Jul 16. doi:10.2147/TACG.S33966
- [4] Monsuur AJ, de Bakker PI, Zhernakova A, et al. Effective detection of human leukocyte antigen risk alleles in celiac disease using tag single nucleotide polymorphisms. *PLoS One*. 2008;3(5):e2270. Published 2008 May 28. doi:10.1371/journal.pone.0002270
- [5] Rostami-Nejad M, Romanos J, Rostami K, et al. Allele and haplotype frequencies for HLA-DQ in Iranian celiac disease patients. *World J Gastroenterol*. 2014;20(20):6302-6308. doi:10.3748/wjg.v20.i20.6302
- [6] Vrana M, Tajtlova J, Mrazek F. Harmonisation of the HLA tests for the diagnosis of coeliac disease: experiences from the Czech external proficiency testing program. *Front Genet*. 2024;15:1441769. Published 2024 Sep 9. doi:10.3389/fgene.2024.1441769
- [7] Heinrich V, Stange J, Dickhaus T, et al. The allele distribution in next-generation sequencing data sets is accurately described as the result of a stochastic branching process. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(6):2426-2431. doi:10.1093/nar/gkr1073

18. VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM

	Katalogové číslo
	Šarže
	Použít do data
	Horní mez teploty
	Výrobce
 www.biovendor.com	Čtěte elektronický návod k použití
 16	Obsah postačuje pro 16 testů



VZOR



BioVendor – Laboratorní medicína s.r.o.
Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika
+420 549 124 185
info@biovendor.com
sales@biovendor.com
www.biovendor.com