

**BioVendor
Group**

NGS

CZ

Návod k použití:

fastGEN POLE Cancer kit

Katalogové číslo:

RDNGS0004

Pouze pro výzkumné účely!

Souprava pro profesionální použití

**B
G** | **BioVendor
R&D®**

BioVendor – Laboratorní medicína a.s.

Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika

+420 549 124 185

objednavky@biovendor.cz

www.biovendor.cz

1.	POUŽITÍ	3
2.	SKLADOVÁNÍ	5
3.	ÚVOD	6
4.	PRINCIP STANOVENÍ	7
5.	UPOZORNĚNÍ	7
6.	TECHNICKÁ DOPORUČENÍ	8
7.	SLOŽENÍ SOUPRAVY	9
8.	DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)	10
9.	PŘÍPRAVA REAGENCIÍ	11
10.	PŘÍPRAVA VZORKŮ	12
11.	POSTUP STANOVENÍ	13
12.	VYHODNOCENÍ	19
13.	LIMITACE SOUPRAVY	21
14.	CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY	21
15.	FAQ	22
16.	REFERENCE	23
17.	VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM	24

1. POUŽITÍ

RDNGS0004 BioVendor fastGEN POLE Cancer kit slouží pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci genu *POLE* (DNA polymerase epsilon, catalytic subunit; exony 9, 11, 13, 14) rychlým masivně paralelním sekvenováním (NGS) na přístroji Illumina®. Sekvenační data jsou analyzována pomocí softwaru GENOVESA, modul fastGEN dostupného online.

Informace o mutačním statusu genu *POLE* je vyžadována pro indikaci správné terapie nádorů (především endometria) a případně pro hodnocení prognózy onemocnění.

Použité zkratky

Ct	číslo cyklu (cycle threshold)
Cp	(Abs Quant/2nd derivation max)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
FAM/SYBR	6-karboxyfluorescein/asymmetrical cyanine dye
FFPE	vzorky fixované formalinem a zalité v parafinu (formalin-fixed, paraffin-embedded)
LoD	limit detekce (limit of detection)
NC	negativní kontrola (negative control)
NGS	masivně paralelní sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)
PC	pozitivní kontrola (positive control)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
<i>POLE</i>	gen pro DNA polymerázu epsilon – kat. podjednotku (DNA polymerase epsilon catalytic subunit)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
RFU	relativní hodnota fluorescence (relative fluorescent unit)
Tm	teplota tání (Tm Calling)

Základní charakteristika

- **Evropská unie: pouze pro výzkumné účely!**
- **Ostatní státy: 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 onkomarkeru (*POLE*).
- Souprava obsahuje **kompletní Master Mixy** k přímému použití včetně indexů a také **sekvenační primery.**
- Příprava knihovny pomocí soupravy fastGEN POLE Cancer kit vyžaduje **pouze přidání izolované DNA** ke konkrétnímu Master Mixu a analýzu pomocí Real-Time PCR termocykleru.
- Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je izolovaná DNA.
- Kapacita soupravy je 16 reakcí/vzorků s unikátní kombinací indexů do jednoho sekvenačního běhu.
- Sekvenační data jsou analyzována pomocí softwaru GENOVESA, modul fastGEN dostupného online.

2. 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 POLE Cancer kit je dodávána zamražená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Po dodání skladujte fastGEN POLE Cancer kit při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Komponenty soupravy **chraňte před světlem**.
- Omezte opakované zmražení a rozmražení.
- Nepoužívejte soupravu po vypršení doby expirace.

Vzor

3. ÚVOD

Personalizovaná terapie může pro pacienty s různými druhy závažných nádorových onemocnění znamenat velkou naději na prodloužení a zkvalitnění života. Pro efektivní nastavení terapie je nutné rozlišit pacienty, kteří budou mít z léčby benefit, od pacientů, kde daná terapie je nevhodná. Vhodné prediktivní molekulární markery umožňují zvýšit celkovou efektivitu a snížit finanční náklady na terapii [1, 2].

Rakovina endometria (dělohy nebo *corpus uteri*) je šestý nejčastěji se vyskytující nádor u žen a v roce 2020 bylo zaznamenáno více než 417 000 nových případů. Molekulární klasifikace karcinomu endometria se stává důležitou součástí diagnostického procesu s přímými léčebnými dopady [3, 4]. Jako *POLE*-ultramutované nádory by měly být hodnoceny pouze nádory, které mají některou z definovaných „hot-spotových“ patogenních mutací (variant) v exonukleázové doméně genu *POLE* v exonu 9–14. Seznam těchto variant představuje aktuální situaci a může se s rozvojem vědeckých poznatků dále měnit [5, 6].

V současné době jsou k dispozici metody genotypizace založené na sekvenování technologií NGS, které nevyžadují specifické sondy nebo primerové páry pro každou přípustnou variantu mutace, což snižuje riziko falešně negativních výsledků.

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, slouží ke ztotožnění získaných výsledků s odpovídajícím vzorkem DNA (pacientem) a umožňuje tak paralelní sekvenování více vzorků (typicky více než deset v jednom běhu)
- sekvenci pro navázání DNA konstruktů na povrch sekvenační komůrky

4. PRINCIP STANOVENÍ

Souprava fastGEN POLE Cancer kit slouží k přípravě vzorku na vyšetření mutačního statusu klinicky relevantního onkomarkeru *POLE* pomocí NGS. Vstupním materiálem je izolát DNA. Postup je vhodný i pro izoláty z tkáně s fragmentovanou DNA z FFPE bločků. Princip stanovení využívá NGS sekvenování krátkých amplikonů získaných pomocí jediné polymerázové řetězové reakce s tagovanými hybridními primery, kdy se provede amplifikace úseků o délce do 170 párů bází a následné sekvenování o vysokém pokrytí. Použití krátkých amplikonů zvyšuje amplifikovatelnost DNA a diagnostickou výtěžnost. Master Mixy dodávané ve formátu k přímému použití umožňují úsporu celkového času na vyšetření a snížení rizika chyby. Sekvenační data jsou analyzována pomocí softwaru GENOVESA, modul fastGEN, dostupného online.

Příprava sekvenační knihovny pomocí soupravy fastGEN POLE Cancer 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.

5. UPOZORNĚNÍ

- **Pouze pro profesionální použití.**
- Komponenty soupravy fastGEN POLE Cancer kit neobsahují infekční materiál.
- Se vzorky pro testování soupravou fastGEN POLE Cancer 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.

6. TECHNICKÁ DOPORUČENÍ

- Souprava je určena pro vzorky izolované DNA.
- Souprava je určena pro profesionální použití vyškolenými pracovníky v adekvátním laboratorním prostředí.
- 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 souprav.
- Souprava fastGEN POLE Cancer kit je určena pro 16 reakcí na vyšetření mutací v genu *POLE*.
- FastGEN POLE Cancer kit Master Mix je dodáván pro každý vyšetřovaný vzorek v samostatné zkumavce. Nedoporučujeme alikvotovat a opakovaně rozmrazovat, vícenásobné rozmražení může negativně ovlivnit kvalitu testu.
- Jednotlivé komponenty soupravy rozmrazujte těsně před použitím. Minimalizujte dobu, kdy jsou reagenty při běžné laboratorní teplotě. Doporučujeme použití chladících stojánků.
- Před použitím reagenty promíchejte jemným vortexováním a krátkou centrifugací.
- 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.
- Nezaměňujte reagenty s odlišnými čísly šarže.
- Likvidaci spotřebovaného a nepoužitého materiálu provádějte v souladu s platnou legislativou.

7. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Souprava **fastGEN POLE Cancer kit** je dodávána ve formátu k přímému použití k provedení 16 reakcí pro gen *POLE* (Tabulka č. 1). Součástí soupravy jsou **specifické Master Mixy** obsahující všechny potřebné komponenty reakce a **sekvenační primery** pro gen *POLE*.

Tabulka č. 1: Složení soupravy fastGEN POLE Cancer kit.

Složení soupravy fastGEN POLE Cancer kit	Sekvence indexů do Sample Sheetu	Objem v 1 zkušavce (μl)	Počet zkušavek	Forma dodání
POLE Cancer kit Master Mix i730	AGACGCGC	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i731	CATGGACC	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i741	CGTTGGTT	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i743	GACCAGTT	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i744	AAGTTCTT	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i746	TCTCTATT	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i747	CTACTGGT	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i748	AATACGGT	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i751	CCGGAAGT	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i753	GCTTCTCT	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i754	AGCGATCT	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i757	GTACCTTG	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i761	ATGGTTGG	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i764	TTCTTGCG	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i767	GAGCTACG	18	1	přímé použití
POLE Cancer kit Master Mix i768	GACTGCAG	18	1	přímé použití
R1SP		12	1	k ředění
R2SP POLE Cancer		20	1	k ředění
ISP POLE Cancer		20	1	k ředění

8. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

Chemikálie

- Vyšetřovaná DNA (standardní koncentrace nejméně 10–200 ng/μl dle spektrofotometru, resp. 1 ng/μl dle fluorimetru Qubit HS assay; méně koncentrovanou DNA je možné vyšetřit ve speciálním režimu, viz Tabulka č. 2)
- Standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaného genu *POLE* (vhodný jako **pozitivní kontrola**)
- Voda pro molekulární biologii (Nuclease Free Water, vhodná jako **negativní kontrola**)
- Illumina sekvenační kit
- Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies)
- NaOH (p.a.)
- Tween 20
- Purifikační kit pro DNA pool
- Komerčně dostupné roztoky pro dekontaminaci povrchů

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
- Ochranné pomůcky (rukavice, oděv)

Přístroje

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

9. 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.

fastGEN POLE Cancer kit: Master Mix

Pro genotypizaci genu *POLE* nechte před přípravou reakce rozmrazit adekvátní množství zkumavek POLE Cancer kit Master Mix a uchovejte v chladu do doby těsně před použitím.

Sekvenační primery

Před denaturací sekvenační knihovny nechte rozmrazit a uchovejte je v chladu do doby těsně před použitím:

- 1 zkumavku: R1SP
- 1 zkumavku: R2SP POLE Cancer
- 1 zkumavku: ISP POLE Cancer

Doporučení:

Do každého běhu testování pomocí fastGEN POLE Cancer kitu je doporučeno přidávat pozitivní kontrolu (PC; standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaných genů, 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.

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.

10. PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pracujte ve vhodném PCR boxu.

- Jako vstupní vzorek použijte izolovanou DNA.
- Stanovte vhodné ředění na základě koncentrace vstupní DNA dle Tabulky č.2
- Správného množství vstupní DNA v doporučeném rozsahu dosáhnete dle následujících postupů:

A) Vzorky o **vysoké koncentraci DNA** ředíte 5x (1 µl DNA + 4 µl H₂O).

B) Vzorky o **standardní koncentraci DNA** neředíte.

C) Vzorky o **velmi nízké koncentraci DNA** neředíte a zahrňte je do analýzy v duplikátu (pipetujte 5 µl DNA do zkumavek s dvěma různými Master Mixy).

- Do jedné reakce pipetujeme vždy **5 µl DNA** vzorku připraveného dle Tabulky č.2.
- Vzorek naředěný na vhodnou koncentraci je **připraven k analýze**. Pokračujte dle kapitoly 11. Postup stanovení

Tabulka č. 2: Stanovení vhodného ředění DNA do PCR reakce.

	Koncentrace Nanodrop	Koncentrace Qubit HS	Ředění	Postup ředění
A	>200 ng/µl	>20 ng/µl	5 x	1 µl DNA + 4 µl H ₂ O
B	10–200 ng/µl	1–20 ng/µl	bez ředění	5 µl DNA
C	<10 ng/µl	<1 ng/µl	bez ředění	5 µl DNA v duplikátu

Doporučení:

Pozitivní kontrola (PC)

Není součástí soupravy. Kontrolní analýza PC je doporučována v rámci každého běhu testování pro zhodnocení správné přípravy reakcí.

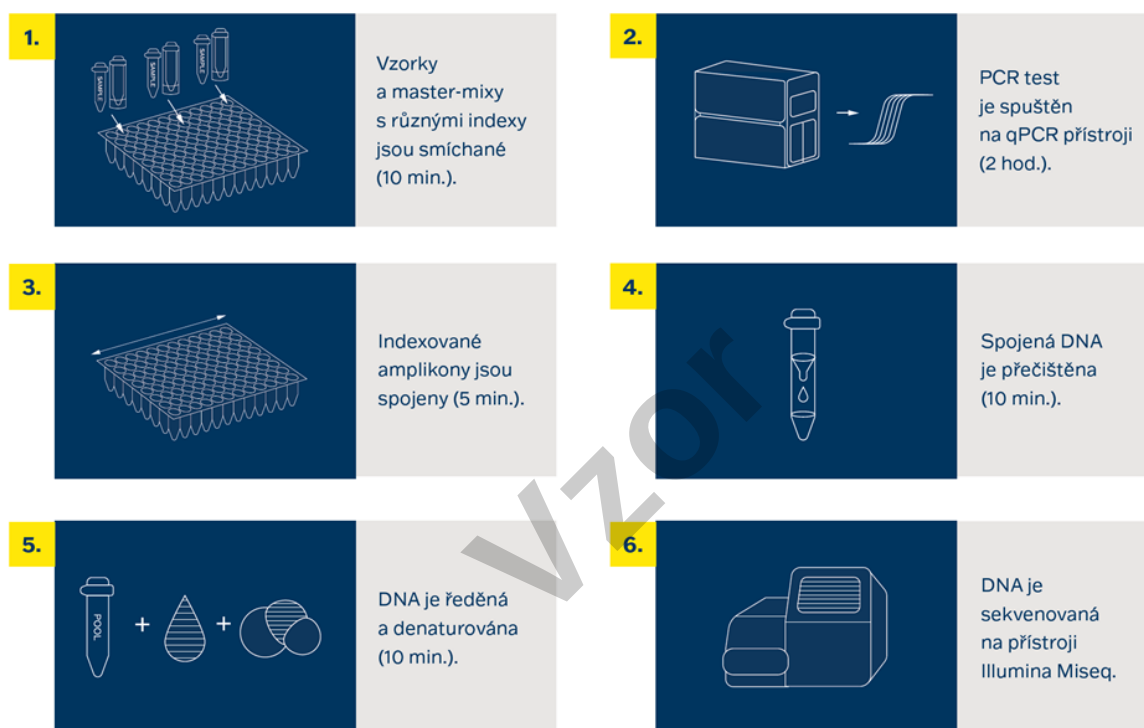
PC připravte obdobným ředěním jako vyšetřované vzorky DNA.

Upozornění: Zkumavky s pozitivní kontrolou nikdy neotvírejte během přípravy testu, vždy je pipetujte jako poslední součást reakce. Při nevhodné manipulaci může dojít ke kontaminaci testu a falešně pozitivním výsledkům. Při podezření na kontaminaci test opakujte.

11. 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 a dokáže odhalit somatickou mutaci ve frekvenci od 1 %, případně od 5 %.

Souprava je navržena tak, aby bylo možné zpracovat až 16 vzorků pro genotypizaci genu *POLE* v jednom sekvenačním běhu.



Obrázek č. 1: Schéma postupu genotypizace pomocí soupravy fastGEN.

11.1 Příprava DNA knihovny

11.1.1 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 μ l DNA o vhodné koncentraci (viz kapitola 10).
- Doporučení:
 - Zahrňte mezi skupinu vyšetřovaných vzorků také pozitivní (PC) a negativní (NC) kontrolu.
 - Pipetujte **5 μ l DNA pozitivní kontroly o vhodné koncentraci** (viz kapitola 10).
 - Pipetujte **5 μ l vody pro molekulární biologii** jako negativní kontrolu.

11.1.2 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 μ l** Master Mixu.
- Celkový objem PCR reakce je **20 μ l**.
- 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 destičku lepicí PCR fólií nebo uzavřete mikrozskumavky, vortexujte, krátce centrifugujte (15 s, 280x g).

11.1.3 qPCR

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

Tabulka č. 3: Program qPCR amplifikace.

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	
melting		60 °C → 95 °C	

*čtení signálu v kanálu FAM/SYBR

- Zadejte identifikaci vzorků do ovládacího programu Real-Time PCR termocykleru.
- Spustěte nastavený amplifikační program se vzorky.
- Exportujte qPCR data a proveďte kontrolu amplifikace. Hodnoty Ct uchovejte pro případnou kontrolu.

11.2 Příprava sekvenátoru

- Doporučujeme dělat tento krok v dostatečném předstihu.
- Před použitím sekvenátoru, nejlépe v době, kdy probíhá qPCR, sekvenátor promyjte (tzv. “maintenance wash”) a rozmrazte sekvenační kazetu.

11.3 Spojení ampliconů v DNA pool, purifikace a kvantifikace

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

11.3.1 Spojení ampliconů v DNA pool

- Po ukončení qPCR amplifikace krátce stočte zkumavky s amplicony.
- Pro vytvoření knihovny pro genotypizaci genu ***POLE***:
 - 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 ul.

- 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.

- 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.

11.3.2 Purifikace DNA poolu

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

11.3.3 Kvantifikace DNA poolu

- Fluorometricky stanovte koncentraci DNA poolu po jeho přečištění.
- DNA pool udržujte na ledu.
- Doporučená koncentrace DNA poolu je cca 40–80 ng/μl; nižší koncentrace je akceptovatelná do 10 ng/μl.
- Z naměřené hmotnostní koncentrace vypočítejte molaritu DNA poolu podle vzorce:

$$c[nM] = \frac{\rho_i \left[\frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^6}{(660 \times 230)}$$

- ρ_i je hmotnostní koncentrace DNA
- 230 je orientační průměrná velikost molekuly DNA po indexaci v bp
- 660 g/mol je průměrná molární hmotnost jedné báze (1bp)

11.4 Příprava na sekvenaci

11.4.1 Zadání runu

Pro zadání runu využijte vzorový SampleSheet „fastGEN-sample-sheet.xlsx“ na stránkách www.biovendor.com, který editujete (zadejte datum, ID běhu a identifikátory vzorků dle použitých indexů). Vzorový SampleSheet ke stažení naleznete také v softwaru GENOVESA, modul fastGEN.

11.4.2 Ředění purifikovaného DNA poolu

- Naředte DNA pool (sekvenační knihovnu) vodou pro molekulární biologii na koncentraci **2 nM**.
- Koncentrace ředěného DNA poolu musí být v rozsahu 1,6 nM - 2,4 nM.
- Ověřte koncentraci naředěného DNA poolu např. metodou Qubit HS. Pro měření použijte minimálně 10 μl naředěného DNA poolu.
- Ředění je možné upravit tak, aby bylo dlouhodobě dosahováno hodnot sekvenační hustoty v rozsahu 1000-1200 kilo-klustrů/mm². V případě neoptimálních densit klustrů (>1200 kilo-klustrů/mm²) je vhodné snížit ředění poolu na 1,8 nM, v případě densit <1000 kilo-klustrů/mm² na 2,2 nM. Pro usnadnění ředění využijte nástroj “fastGEN-pool-dilution.xlsx” dostupný na stránkách www.biovendor.com.
- V opačném případě musí být DNA pool naředěn a proměřen znovu.

11.4.3 Denaturace DNA poolu

- Připravte čerstvý 0,2 M roztok NaOH: 480 μ l H₂O + 20 μ l 5 M NaOH.
- Smíchejte **10 μ l naředěného DNA poolu s 10 μ l čerstvě připraveného 0,2 M NaOH (1:1)**. Vždy je nutno použít čerstvý roztok NaOH.
- Společně inkubujte 5 min při pokojové teplotě.

11.4.4 Ředění sekvenačních primerů

- Připravte si nové zkumavky pro naředění sekvenačních primerů a v průběhu denaturace naředte sekvenační primery podle následujícího postupu:
 - **Read1 sekvenační primery (R1SP):** 3 μ l R1SP + 597 μ l HT1
 - **Index sekvenační primery (ISP):** 6 μ l ISP POLE Cancer + 594 μ l HT1
 - **Read2 sekvenační primery (R2SP):** 6 μ l R2SP POLE Cancer + 594 μ l HT1

11.4.5 Ředění denaturovaného DNA poolu

Zředte denaturovaný DNA pool vychlazeným roztokem HT1 z lednice v poměru 1:100 (např. 10 μ l DNA pool + 990 μ l HT1) – **získaný 10 pM DNA pool je připraven do sekvenační kazety**.

Před aplikací uchovejte DNA pool v lednici.

11.4.6 Příprava sekvenační kazety

- Zkontrolujte, že sekvenační kazeta je dokonale rozmražená a zamíchejte její obsah převrácením (3x).
- Pipetujte 600 μ l naředěné 10 pM DNA knihovny a naředěných sekvenačních primerů do sekvenační kazety do pozic 17-20 v uvedeném pořadí:
 - pozice 17: DNA knihovna v HT1
 - pozice 18: naředěný R1SP v HT1
 - pozice 19: naředěný ISP v HT1
 - pozice 20: naředěný R2SP v HT1
- Připravte průtokovou kazetu podle pokynů výrobce.
- Spusťte sekvenační program (Illumina software). Postupujte podle pokynů výrobce přístroje.

Poznámka: V případě, že DNA pool přidáváte k jiné knihovně, postupujte dle doporučení pro míchání knihoven „fastGEN-pool-mix.docx“, který je dostupný na stránkách www.biovendor.com, případně kontaktujte aplikační podporu.

12. VYHODNOCENÍ

Pro vyhodnocení sekvenačních dat použijte software GENOVESA, modul fastGEN POLE, 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

12.1 Genotypizace *POLE*

Výsledek genotypizace ***POLE*** je považovaný za pozitivní (detekovaná patogenní mutace v exonukleázové doméně), pokud byla detekována nesynonymní mutace **pro kodon 286, 411, 297, 459, 456, 367, 424, 295, 436, 444, 368 *POLE* s frekvencí $\geq 5\%$ [3, 4].**

V případě pozitivního nálezu mutace v *POLE* v rozsahu frekvence 1 % až 5 % doporučujeme vyšetření zopakovat v duplikátu nebo verifikovat jinou metodou. V případě opakovaného potvrzení varianty je vzorek považovaný za pozitivní. V případě opakovaného potvrzení wt formy *POLE* je vzorek považovaný za negativní.

Výsledek genotypizace pro vzorky s velmi nízkou koncentrací DNA (<10 ng/μl; měřeno na přístroji nanospektrofotometr) je považován za validní, pokud se výsledek detekce varianty genu shoduje pro oba replikáty s odlišnými Master Mixy.

12.2 Negativní výsledek

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

Doporučení:

12.3 Interpretace PC a NC

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

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 sekvenačních dat vykazuje přítomnost daných variant genu *POLE* v předepsaných frekvencích.

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 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 15. FAQ.

13. LIMITACE SOUPRAVY

- Souprava fastGEN POLE Cancer kit je validována na vzorcích DNA izolované z nádorové tkáně fixované v FFPE bločcích.
- Výsledek genotypizace je ovlivněn kvalitou vzorku. Správný postup odběru, transportu, izolace DNA a skladování vzorků je pro vyšetření důležitý.
- Výsledky genotypizace by měly být hodnoceny odborným pracovníkem ve zdravotnictví.
- Souprava fastGEN POLE Cancer kit je navržena pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci genu *POLE* technologií NGS.
- Metoda je určena pro **vyšetření mutačního statusu** onkomarkeru ve vzorcích nádorové tkáně, negativní výsledek nevylučuje mutace pod limitem detekce metody.

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

14. CHARAKTERISTIKA SOUPRAVY

Vyhodnocením dat v rámci analytické charakteristiky soupravy fastGEN POLE Cancer kit firmy BioVendor 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 třech nezávislých experimentech s definovanou změnou podmínek. Diagnostická přesnost (senzitivita a specifita) testu byla stanovena na základě analýzy klinických a referenčních vzorků se známým mutačním statusem. Výsledky stanovení genotypu *POLE* byly ve všech typech vzorků správné ve všech případech včetně opakování (senzitivita a specifita 100 %).

15. FAQ

1. Kolik vzorků lze sekvenovat současně v 1 běhu?

Na jeden vzorek při pročtení alespoň 1 000x a alelové frekvenci 1–5 % potřebujeme 100 000 - 130 000 pair end readů. MiSeq Reagent kit v2 Nano, který má 2 mil pair end readů, je dostačující až pro 16 vzorků. MiniSeq Mid-Output kit, který má až 16 mil pair end readů, je dostačující až 128 vzorků.

2. Lze použít i jiný nástroj na analýzu dat?

Ano. Je možné použít i Illumina® Experiment Manager.

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, postupujte dle doporučení pro míchání knihoven „fastGEN-pool-mix.docx“, který je dostupný na stránkách www.biovendor.com, případně kontaktujte aplikační podporu.

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

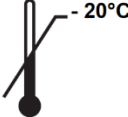
Příčiny nestandardních výsledků PC a NC mohou být různé. Doporučujeme ověřit kvalitu a správný typ použité PC (musí obsahovat mutace v cílových genech a jejich variantách), dále ověřte nastavení technického vybavení, ověřte, zda nedošlo k manuální chybě při přípravě knihovny či kontaminaci materiálu. V případě nejasností se obraťte na zákaznickou podporu.

16. REFERENCE

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

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics 2002, CA Cancer J Clin 55, 74-108.
- [2] Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. 2009. Worldwide Variations in Colorectal Cancer. CA Cancer J Clin 59, 366-378.
- [3] León-Castillo A, Britton H, McConechy MK, et al. 2020. Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. J Pathol 250(3):323-335.
- [4] Dundr P, Cibula D, Doležel M, Fabian P, Fínek J, Jirásek T, Matěj R, Luboš, Petruželka, Rob L, Ryška A, Švajdler M, Weinberger V, Zikán M. 2021. Molecular testing in endometrial carcinoma (Joint recommendation of Czech Oncological Society, Oncogynecological Section of the Czech Gynecological and Obstetrical Society, Society of Radiation Oncology, Biology and Physics, and the Society of Czech Pathologists). Cesk Patol 57(3):181-187.
- [5] Rayner E, van Gool IC, Palles C, et al. 2016. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. Nat Rev Cancer 16: 71-81.
- [6] Dundr P, Cibula D, Doležel M, Fabián P, Fínek J, Jirásek T, Matěj R, Petruželka L, Rob L, Ryška A, Švajdler M, Weinberger V, Zikán M. 2021 Molecular testing in endometrial carcinoma - joint recommendation of Czech Oncological Society, Oncogynecological Section of the Czech Gynecological and Obstetrical Society, Society of Radiation Oncology, Biology and Physics, and the Society of Czech Pathologists. Ceska Gynekol 86(4):264-272.

17. VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM

	Katalogové číslo
	Šarže
	Použit do data
	Omezení teploty
	Výrobce
 www.biovendor.com	Čtěte elektronický návod k použití
	Obsah postačuje pro 96 testů

Vzor



BioVendor – Laboratorní medicína a.s.
Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika
+420 549 124 185
objednavky@biovendor.cz
www.biovendor.cz