

Návod k použití

fastGEN CFTR 8-kit

CZ

Katalogové číslo:

RDNGS0006

Pouze pro výzkumné účely!

**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

BioVendor fastGEN CFTR kit slouží pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci genu *CFTR* sekvenováním nové generace (NGS) na přístroji Illumina®. Sekvenační data jsou analyzována pomocí softwaru GENOVESA modul fastGEN dostupného online.

Použité zkratky

<i>CFTR</i>	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CF	cystická fibróza
CNV	variabilita počtu kopií (copy number variation)
Ct	číslo cyklu (cycle threshold)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
FAM/SYBR	6-karboxyfluorescein/asymmetrical cyanine dye
LoD	limit detekce (limit of detection)
NC	negativní kontrola (negative control)
NGS	sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing)
PC	pozitivní kontrola (positive control)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)

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 genu *CFTR*.
- Souprava obsahuje **kompletní Master Mixy**, včetně indexů, určených k přímému použití a také **sekvenační primery**.
- FastGEN CFTR Master Mix je dodáván pro každý vyšetřovaný vzorek ve **4 zkumavkách**.
- Souprava fastGEN CFTR 8-kit je určena pro vyšetření mutací v genu *CFTR* u **8 vzorků** s unikátní kombinací indexů do jednoho sekvenačního běhu.
- Příprava knihovny pomocí soupravy fastGEN CFTR vyžaduje **pouze přidání izolované DNA** ke konkrétnímu Master Mixu a amplifikaci pomocí Real-Time PCR termocykleru.
- Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je DNA izolovaná z **plné krve, stěru sliznice dutiny ústní, suché kapky krve**.
- Genotypizace kitem fastGEN CFTR umožňuje analýzu všech exonů s přilehlými intronovými oblastmi a 4 hluboké intronové oblasti (7, 11, 12 a 22). FastGEN CFTR detekuje polyT a TG repetitivní oblasti v intronu 9. Zároveň kit umožňuje detekci CFTR dele2,3 díky delečně specifickým primerům. Další rozsáhlé delece jsou detekovány kvantitativní analýzou CNV.
- Sekvenační data jsou analyzována pomocí softwaru GENOVESA, modul fastGEN dostupného online.

2. SKLADOVÁNÍ

Soupravu skladujte při -20 °C. Za těchto podmínek jsou všechny komponenty stabilní po dobu expirace uvedené na vnějším obalu.

- Souprava fastGEN CFTR je dodávána zamražená na -20 °C.
- Po dodání skladujte fastGEN CFTR při teplotě -20 °C.
- Komponenty soupravy **chráňte před světlem**.
- Omezte opakované zmražení a rozmražení.
- Nepoužívejte soupravu po uplynutí doby expirace.

DEMO

3. ÚVOD

Gen *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) se nachází na chromozomu 7q31.2, obsahuje 27 kódujících exonů a jeho genomová sekvence je dlouhá přibližně 230 kb. Gen kóduje stejnojmenný protein. Tento protein funguje jako iontový kanál na povrchu buněk a podílí se na udržování homeostázy iontového prostředí v organismu. Mutace v genu *CFTR* vedou k poruše funkce nebo tvorby proteinu a manifestaci cystické fibrózy (CF). CF je nejčastější autozomálně recesivní onemocnění v kavkazské populaci. Bylo objeveno více jak 2000 variant a mutací v genu *CFTR* (zahrnuje mutace spojené se vznikem CF, potencionálně patogenní či s nejasnou patogenitou). Kritickým faktorem přežití je závažnost plicního onemocnění. Léčba pacientů s CF je paliativní, včasné zahájení však zlepšuje klinický průběh nemoci i délku života.

V současné době jsou k dispozici metody genotypizace založené na technologii NGS, které nevyžadují specifické sondy nebo primerové páry pro každou přípustnou variantu mutace, což snižuje riziko falešně negativních výsledků. Screening založený na NGS je vysoce citlivý, specifický, vhodný pro diagnostiku onemocnění cystické fibrózy a pro určení přenašečství. Informace o mutačním statusu je navíc důležitá k indikaci správné terapie.

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 flowcell

4. PRINCIP STANOVENÍ

Souprava fastGEN CFTR slouží k přípravě vzorku na vyšetření mutačního statusu klinicky relevantního genu *CFTR* pomocí NGS. 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 330 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.

Příprava sekvenační knihovny pomocí soupravy fastGEN CFTR vyžaduje pouze přidání izolované DNA ke konkrétnímu Master Mixu a amplifikaci pomocí Real-Time PCR termocyklu.

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

5. UPOZORNĚNÍ

- **Pouze pro profesionální použití.**
- Komponenty soupravy fastGEN CFTR neobsahují infekční materiál.
- Se vzorky pro testování soupravou fastGEN CFTR je třeba zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem a je nutno dodržovat standardní bezpečnostní opatření.
- Nepijte, nejezte a nekuřte v prostoru, kde se pracuje biologickým materiálem.

6. TECHNICKÁ DOPORUČENÍ

- 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.
- 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 reagent špičky na jedno použití.
- Nekombinujte reagenty ze souprav různých výrobních šarží.
- Likvidaci spotřebovaného a nepoužitého materiálu provádějte v souladu s platnou legislativou.

7. SLOŽENÍ SOUPRAVY

Souprava **fastGEN CFTR 8-kit** je dodávána ve formátu k přímému použití k vyšetření 8 vzorků, tj. provedení 32 reakcí pro gen *CFTR* (Tabulka č. 1). Součástí soupravy jsou **specifické Master Mixy** obsahující všechny potřebné komponenty reakce a **sekvenační primery** pro *CFTR*.

Tabulka č. 1: Složení soupravy fastGEN CFTR 8-kit.

Složení soupravy fastGEN CFTR 8-kit	Sekvence indexů	Objem v 1 zkumavce (μl)	Počet zkumavek	Forma dodání
CFTR Master Mix i701 (A-D)	TAAGGCGA	18	4	přímé
CFTR Master Mix i721 (A-D)	TACGCTGC	18	4	přímé
CFTR Master Mix i722 (A-D)	ATGCGCAG	18	4	přímé
CFTR Master Mix i723 (A-D)	TAGCGCTC	18	4	přímé
CFTR Master Mix i724 (A-D)	ACTGAGCG	18	4	přímé
CFTR Master Mix i726 (A-D)	CCTAAGAC	18	4	přímé
CFTR Master Mix i727 (A-D)	CGATCAGT	18	4	přímé
CFTR Master Mix i728 (A-D)	TGCAGCTA	18	4	přímé
R1SP		12	1	k ředění
R2SP CFTR		47	1	k ředění
ISP CFTR		47	1	k ředění

8. DOPORUČENÝ MATERIÁL (NEDODÁVANÝ SE SOUPRAVOU)

Chemikálie

- Vyšetřovaná DNA
- Standardizovaný vzorek obsahující požadované varianty vyšetřovaného genu *CFTR* (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
- Fluorimetr
- Vortex, combi-spin (centrifuga a vortex), centrifugy
- Sekvenátor Illumina® MiSeq™

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 CFTR: Master Mix

Pro genotypizaci genu *CFTR* nechte před přípravou reakce rozmrazit adekvátní množství zkumavek CFTR 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 CFTR
- 1 zkumavku: ISP CFTR

Doporučení:

Do každého běhu testování pomocí fastGEN CFTR kit 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.

- Vstupním materiálem pro přípravu sekvenační knihovny je DNA izolovaná z plné krve, stěru sliznice dutiny ústní, suché kapky krve.
- Optimálních výsledků je dosahováno při použití **10 ng** vstupního množství DNA v PCR reakci. Souprava je validována na použití 2-50 ng vstupního množství DNA.
- DNA o vysoké koncentraci je vhodné naředit na koncentraci 2 ng/μl.
- Příliš koncentrovaná DNA může vést k inhibičním jevům PCR a nesprávným výsledkům. Vzorky o **velmi nízké koncentraci DNA** neřeďte a zahrňte je do analýzy v duplikátu (pipetujte 5 μl DNA do zkumavek se dvěma různými CFTR Master Mixy).
- Do jedné reakce pipetujte vždy **5 μl DNA**.
- Vzorek naředěný na vhodnou koncentraci je **připraven k analýze**. Pokračujte dle kapitoly 11. Postup stanovení.

Doporučení:

Pozitivní kontrola (PC)

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

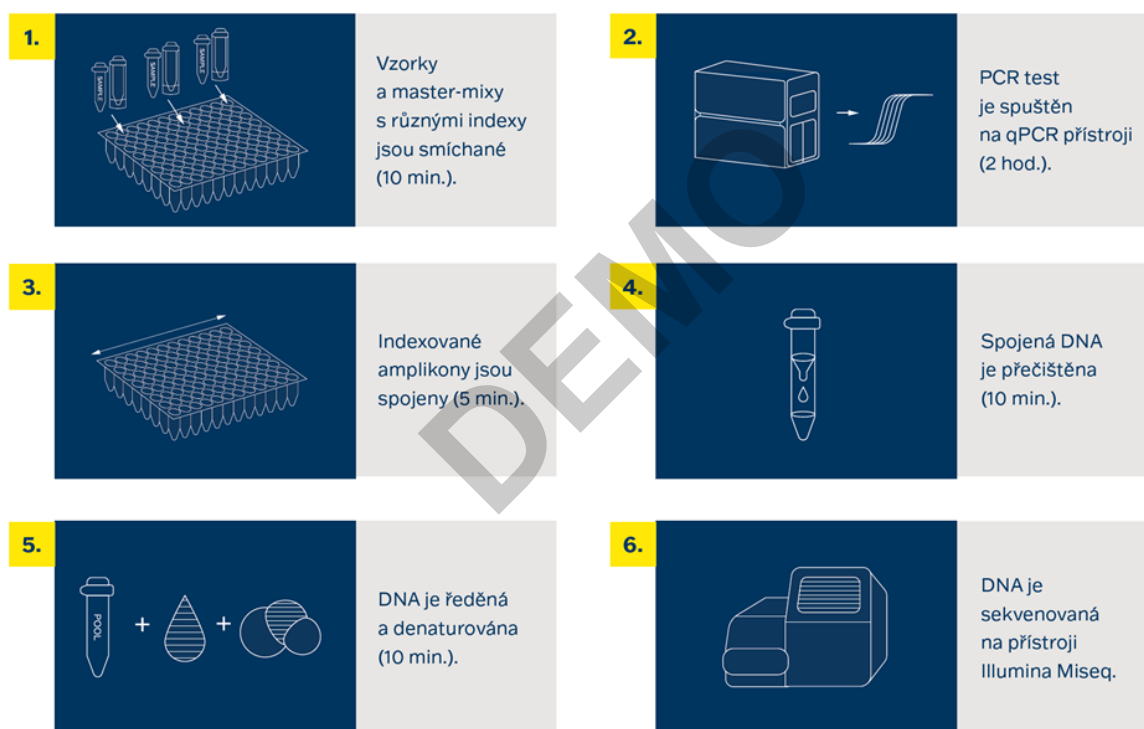
PC připravte obdobným ředěním jako vyšetřované vzorky DNA.

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. Genotypizace kitem fastGEN CFTR umožňuje analýzu všech exonů s přilehlými intronovými oblastmi a 4 hluboké intronové oblasti (7, 11, 12 a 22). FastGEN CFTR detekuje polyT a TG repetitivní oblasti v intronu 9. Zároveň kit umožňuje detekci CFTR dele2,3 díky delečně specifickým primerům.

Souprava je navržena tak, aby bylo možné zpracovat 8 vzorků pro genotypizaci genu *CFTR* v jednom sekvenačním běhu. **Analýza jednoho vzorku probíhá ve čtyřech oddělených reakcích.**



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 desky anebo stripu pipetujte **5 µl** DNA o vhodné koncentraci pro Master Mixy A–D daného indexu (viz kapitola 10). Doporučená koncentrace izolované DNA je 2 ng/µl.
- Doporučení:
 - Zahrňte mezi skupinu vyšetřovaných vzorků také pozitivní (PC) a negativní (NC) kontrolu.
 - Pipetujte **5 µl DNA pozitivní kontroly o vhodné koncentraci pro Master Mixy A–D daného indexu** (viz kapitola 10).
 - Pipetujte **5 µl vody pro molekulární biologii** jako negativní kontrolu **pro Master Mixy A–D daného indexu**.

11.1.2 Příprava Master Mixů

Pracujte ve vhodném PCR boxu v pre-PCR místnosti.

- Označte si PCR desku nebo stripy.
- Po rozmrazení Master Mixy krátce vortexujte a centrifugujte.
- Ke každému vzorku nebo kontrole přidejte postupně do 4 jamek **15 µl** Master Mixu A–D.
- 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 8.
- 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 mikrozkušavky, vortexujte, krátce centrifugujte (15 s, 280x g).

11.1.3 qPCR

Na Real-Time PCR termocykleru nastavte amplifikační program dle Tabulky č. 2.

Tabulka č. 2: 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.
- Spustte nastavený amplifikační program se vzorky.
- 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 uchovejte při -20 °C.

11.2 Příprava sekvenátoru

- 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, vyjma denaturace, 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 společné knihovny pro genotypizaci genu **CFTR**:
 - Smíchejte jednotlivé amplicony všech vzorků do jednoho DNA poolu ve stejném poměru.

Příklad: Při počtu 8 vzorků smíchejte jednotlivé amplicony v množství 3 μ l PCR produktu z každého vzorku. Takto získáte DNA pool v objemu 96 μ l.
 - 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 desku/stripy s amplicony uchovejte zmrazené 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

- 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:

$$c[nM] = \frac{\rho_i \left[\frac{ng}{\mu l} \right] \times 10^6}{(660 \times 330)}$$

- ρ_i je hmotnostní koncentrace DNA
- 330 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).

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 alespoň **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):** 44 μ l ISP + 556 μ l HT1
 - **Read2 sekvenační primery (R2SP):** 44 μ l R2SP + 556 μ l HT1

11.4.5 Ředění denaturovaného DNA poolu

Zředte denaturovaný DNA pool vychlazeným roztokem HT1 z lednice na finální koncentraci 10 pM (např. 10 μ l DNA pool + 990 μ l HT1). **Získaný 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 600 μ l 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 flowcellu podle pokynů výrobce.
- Spusťte sekvenační program (Illumina software). Postupujte podle pokynů výrobce přístroje.

12. 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 pacientská data a varianty do interní databáze
- report na jedno kliknutí

12.1 Genotypizace *CFTR*

Výsledek genotypizace *CFTR* je považovaný za pozitivní (detekovaná mutace), pokud byla detekována varianta genu *CFTR* s frekvencí odpovídající heterozygotnímu nebo homozygotnímu stavu.

V případě pozitivního nálezu mutace v genu *CFTR* v rozsahu frekvence < 15 % je doporučeno vyšetření zopakovat nebo verifikovat jinou metodou. Delece nalezené pomocí CNV analýzy je doporučeno verifikovat jinou metodou.

Výsledek genotypizace pro vzorky s velmi nízkou koncentrací DNA (<0,4 ng/μl; stanoveno fluorimetricky) 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).

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 *CFTR* 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 nespĺňuje 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. Často kladené dotazy.

13. LIMITACE SOUPRAVY

- Souprava fastGEN CFTR 8-kit byla validována na vzorcích DNA izolované z plné krve a suché kapky krve.
- 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 CFTR je navržena pro rychlou přípravu sekvenační knihovny, potřebné pro genotypizaci genu *CFTR* technologií NGS. Sekvenční varianty jiných genů než genu *CFTR*, nejsou kitem fastGEN CFTR zjištělné.
- Negativní výsledek nevylučuje mutace pod limitem detekce metody.
- Vzácné sekvenční varianty v oblasti primerů mohou ovlivnit funkčnost jednotlivých fastGEN primerů a mohou vést ke snížení efektivity amplifikace daného amplikonu.
- Analýza polyT a TG repetice může být negativně ovlivněna při nižším sekvenačním pokrytím příslušné oblasti (<200x).
- Souprava fastGEN CFTR neumožňuje rozlišení delece *CFTR* dele2 od *CFTR* dele2ins182.
- *CFTR* exon 10 není zahrnut v CNV analýze.

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 CFTR 8-kit firmy BioVendor byly stanoveny parametry analytické senzitivity a specificity. Pro soupravu byl stanoven limit detekce metody a ověřena křížová reaktivita primerů (*in silico*). Byla testována opakovatelnost a robustnost metody. Diagnostická přesnost (senzitivita) testu byla stanovena na základě analýzy klinických a referenčních vzorků se známým mutačním statutem. Výsledky stanovení genotypů *CFTR* byly ve všech typech vzorků správné ve všech případech včetně opakování (senzitivita 100 %).

15. ČASTO KLADENÉ DOTAZY

1. Kolik vzorků lze sekvenovat současně v 1 běhu?

Na jeden vzorek potřebujeme 200 000 pair end readů. MiSeq Reagent kit v2 Nano, který má 2 mil pair end readů, je dostačující až pro 8 vzorků. MiSeq Reagent kit v2 Micro, který má 8 mil pair end readů je při sekvenaci 24 vzorků zaplněn ze 75 %.

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 Illumina® MiSeq™.

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] Richards, C. S., Bradley, L. A., Amos, J., Allitto, B., Grody, W. W., Maddalena, A., ... & Watson, M. S. (2002). Standards and guidelines for CFTR mutation testing. *Genetics in Medicine*, 4(5), 379-391.




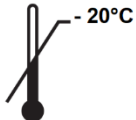



[2] Deignan, J. L., Astbury, C., Cutting, G. R., Del Gaudio, D., Gregg, A. R., Grody, W. W., ... & Richards, S. (2020). CFTR variant testing: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 22(8), 1288-1295.

[3] <https://www.klubcf.cz>

[4] <https://cftr2.org/>

DEMO

17. VYSVĚTLIVKY K SYMBOLŮM

	Katalogové číslo
	Šarže
	Použit do data
	Omezení teploty
	Výrobce
 www.biovendor.com	Čtěte elektronický návod k použití
	Obsah postačuje pro 8 testů



DEMO



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

Datum poslední revize: 22.02.2023

