

# PGM Barcoding Set 1-8

Navrženo pro PGM ION-TORRENT

**KÓD PRODUKTU:** 2001 (1-8)

**BALEN9:** 32 testů

## Uživatelská příručka

*Rev02 .2015*



# Rejstřík

1. POUŽITÍ VÝROBKU	3
2. OBSAH KITU	4
3. SKLADOVÁNÍ	4
4. STABILITA	4
5. PRINCIP TESTU	4
6. NEZBYTNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ	5
7. DŮLEŽITÁ UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ INFORMACE	5
8. PROTOKOL	6
<i>Příprava směsi pro PCR barcoding</i>	6
<i>Purifikace PCR</i>	7
<i>Kontrola kvality PCR produktů</i>	8
<i>Kvantifikace PCR produktů</i>	9
<i>Příprava vzorce</i>	10
9. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ	12

## 1. POUŽITÍ VÝROBKU

Kity pro PGM barcoding jsou soupravy, které musí být použity spolu se sestavami pro cílené obohacení HuGene na bázi technologie DST. Zamýšleným použitím těchto sad je generování knihovny vhodné pro NGS analýzu se systémem PGM Ion Torrent.

Pracovní postup NGS analýzy technologií DST zahrnuje dvě po sobě jdoucí PCR reakce, které mají být provedeny pomocí dvou odlišných sad.

### **FÁZE 1: CÍLENÉ OBOHACENÍ MULTIPLEX PCR**

Každý vzorek je amplifikován pomocí směsi primerů pro cílené obohacení multiplex. Produkty amplifikace budou nést specifické konce, které jsou nezbytné pro následující fázi barcodingu.

### **FÁZE 2: 2° PCR PRO ADAPTÉRY A VLOŽENÍ BARKÓDU**

Adaptéry a sekvence barkódů jsou vloženy druhou PCR. Každý vzorek je amplifikován přímo i reverzně kvůli obousměrné analýze.

#### **Pro Ion Torrent**

PGM BARCODE SET 1-8 (kód 2001)

PGM BARCODE SET 9-16 (kód 2001)

PGM BARCODE SET 17-24 (kód 2001)

PGM BARCODE SET 25-32 (kód 2001)

## 2. OBSAH KITU

Každá sada pro barcoding obsahuje činidla připravená k použití k vložení adaptérů a barkódů specifických pro Ion Torrent. Výchozí DNA je z PCR produktu získaného ve fázi 1 cíleného obohacení. Výsledkem této druhé PCR vznikne knihovna vhodná pro analýzu sekvenace nové generace systémem PGM Ion Torrent.

PGM BARCODE SADA 1-8 (cod 2001)		
ZKUMAVKA	POPIS	SEKVENCE BARKÓDŮ
BARKÓD 1 Fw	Smíchejte s adaptérem a barkódem 1Fw - P1 rev	CTAAGGTAACGAT
BARKÓD 1 Rv	Smíchejte s adaptérem a barkódem 1Rv - P1 fwd	CTAAGGTAACGAT
BARKÓD 2 Fw	Smíchejte s adaptérem a barkódem 2Fw - P1 rev	TAAGGAGAACGAT
BARKÓD 2 Rv	Smíchejte s adaptérem a barkódem 2Rv - P1 fwd	TAAGGAGAACGAT
BARKÓD 3 Fw	Smíchejte s adaptérem a barkódem 3Fw - P1 rev	AAGAGGATTCGAT
BARKÓD 3 Rv	Smíchejte s adaptérem a barkódem 3Rv - P1 fwd	AAGAGGATTCGAT
BARKÓD 4 Fw	Smíchejte s adaptérem a barkódem 4Fw - P1 rev	TACCAAGATCGAT
BARKÓD 4 Rv	Smíchejte s adaptérem a barkódem 4Rv - P1 fwd	TACCAAGATCGAT
BARKÓD 5 Fw	Smíchejte s adaptérem a barkódem 5Fw - P1 rev	CAGAAGGAACGAT
BARKÓD 5 Rv	Smíchejte s adaptérem a barkódem 5Rv - P1 fwd	CAGAAGGAACGAT
BARKÓD 6 Fw	Smíchejte s adaptérem a barkódem 6Fw - P1 rev	CTGCAAGTTCGAT
BARKÓD 6 Rv	Smíchejte s adaptérem a barkódem 6Rv - P1 fwd	CTGCAAGTTCGAT
BARKÓD 7 Fw	Smíchejte s adaptérem a barkódem 7Fw - P1 rev	TTCGTGATTCGAT
BARKÓD 7 Rv	Smíchejte s adaptérem a barkódem 7Rv - P1 fwd	TTCGTGATTCGAT
BARKÓD 8 Fw	Smíchejte s adaptérem a barkódem 8Fw - P1 rev	TTCCGATAACGAT
BARKÓD 8 Rv	Smíchejte s adaptérem a barkódem 8Rv - P1 fwd	TTCCGATAACGAT

*Tabulka 1: Obsah sad pro barcoding 1-8*

## 3. SKLADOVÁNÍ

Všechna činidla dodávaná s našimi sadami jsou připravena k použití a musí být skladována při -20 °C.

## 4. STABILITA PRODUKTU

Všechna činidla dodávaná s kitem si budou udržovat vysokou kvalitu až do vypršení data použitelnosti, které je označené na každé lahvičce činidla a na vnější nádobě/obalu.

## 5. PRINCIP TESTU

Tento test je založen na reakci PCR (polymerázová řetězová reakce). Reakční činidla dodávaná se sadou umožňují pomocí PCR reakcí integraci adaptérů a barkódů do amplifikačních produktů získaných v první fázi cíleného obohacení.

## 6. NEZBYTNÝ MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ

### **KVANTIFIKACE DNA:**

- Mikropipety 2-20 µl, 20-200 µl nebo 100-1000 µl a špičky
- Fluorimetr Qubit® 2.0 (Invitrogen kód Q32866), nebo fluorimetr Qubit® 3.0 (Invitrogen kód Q33216)
- Testovací zkumavky Qubit (kat. č. Q32856)
- Testovací sada Qubit® dsDNA HS (Invitrogen, kód Q32851)
- Vortex
- Jednorázové rukavice

### **2° PCR (BARCODING)**

- Sada mikropipet pro PCR se špičkami
- Termocykler ABI9700 nebo Veriti nebo Proflex (Applied Biosystems)
- Zkumavky a víčka nebo 96-jamková destička, dle potřeby, bez DNáz a RNáz
- Voda bez nukleáz
- Jednorázové rukavice

### **KVALIFIKACE DNA:**

- Elektroforézní systém nebo
- Systém Agilent 2100 Bioanalyzer (důrazně doporučeno) se sadou čidel DNA 1000 (kat. č. 5067-1504)

**PURIFIKACE DNA:** purifikace PCR produktů po druhém PCR (cílený barcoding) může být provedena Agencourt AMPure XP Kit (Beckman counter, kód A63880.) nebo Diffinity RapidTip2 (Diffinity Genomics, kód RR050-096)

Purifikace Agencourt AMPure XP Kit vyžaduje následující nástroje a činidla:

- Ohřívač / suchý inkubátor (40° C)
- 1,5ml trubcový magnetický separátor nebo magnetický separátor kompatibilní s 96-jamkovou destičkou
- Čerstvý 70% etanol
- Vícekanálovou pipetu (doporučeno)
- Buď vodu, TRIS-acetát (10 mM pH 8,0) nebo TE pufr (10 mM Tris-acetát pH 8,0, 1 mM EDTA) na eluci DNA

Purifikace pomocí Diffinity RapidTip2 vyžaduje následující nástroje a činidla:

- Vícekanálovou pipetu (doporučeno) se špičkami (požaduje se objem 60µl)

## 7. DŮLEŽITÁ UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ INFORMACE

- Biologické vzorky a všechna činidla kitu musí být používány v prostředí řádně vybaveném, čistém a ve kterém se nenacházejí potenciální kontaminanty. Pracovní plochy by měly být pravidelně očišťovány roztokem obsahujícím chlornan sodný 5 %.

- Vždy používejte ochranné pomůcky, jako je laboratorní plášť, rukavice a ochranné brýle, během všech fází popsaných v protokolu.
- Aby se zabránilo kontaminaci činidel, doporučujeme používat zkumavky a špičky bez DNáz/RNáz, věnujte zvláště pozornost tomu, aby všechny nástroje byly čisté a bez kontaminantů.
- Doporučujeme dodržovat jednosměrný pracovní postup od počáteční fáze izolace DNA v návaznosti na přípravné fáze PCR, fáze amplifikace a post-amplifikace, aby byly pracovní prostory pro různé fáze oddělené a používat pro každou fázi postupu specializované laboratorní pláště, mikropipety, zkumavky a špičky.
- Použitá činidla a biologické vzorky musí být zlikvidovány v souladu s právními postupy.

## 8. PROTOKOL

### *Příprava směsi pro PCR barcoding*

Rozmrazte, rychle promíchejte a odstředte dodaná činidla. Udržujte Taq polymerázu zmrazenou.

**NB: K tomuto PCR použijte Pufr A, Pufr B, dNTP a Taq polymerázy obsažené v sadě cíleného obohacení.**

Krátce promíchejte a odstředte činidla.

Abyste získali obousměrnou knihovnu, připravte dvě různé směsi pro každý vzorek amplifikovaný v první fázi cíleného obohacení, jeden pro přímý a jeden pro reverzní řetězec.

Připravte směs pro N+1 vzorků podle následujícího schématu. Udržujte zkumavky i destičku zmrazenou v průběhu všech operací.

Master Mix	x1	x11 (n+1)
H <sub>2</sub> O	10,8 µl	118,8 µl
Pufr A	8 µl	88 µl
Pufr B	8 µl	88 µl
dNTP	0,8 µl	8,8 µl
Taq polymeráza	0,4 µl	4,4 µl
<b>TOT</b>	<b>28 µl</b>	<b>308 µl</b>

*Tabulka 2: Objemy připravených směsí na PCR*

Pečlivě zvortexujte a krátce odstředujte.

Pro každý vzorek připravte dvě reakční zkumavky: jednu pro dopřednou a jednu pro reverzní reakci. Rozpusťte v každé zkumavce 14 µl směsi připravené ve fázi 8.1.4.

Přiřaďte ke každému vzorku barkód ze sady (1-8), a rozpusťte 5 µl přímé nebo reverzní barcoding směsi v odpovídající zkumavce.

**Upozornění: Ke každému vzorku přiřaďte stejný barkód pro přímou i reverzní reakci. (tj. 1Fw a 1Rv). Nepoužívejte různé barkódy pro přímou i reverzní reakci téhož vzorku (tj. 1Fw a 2Rv). Je možné přiřadit stejný barkód dvěma různým vzorkům, ale pouze v případě, že jsou amplifikované cíle různé (tj. vzorek A amplifikovaný pro Kras/Nras a vzorek B amplifikovaný pro EGFR).**

Po PCR použijte 1 µl (asi 10-25 ng) každého PCR produktu získaného ve fázi 1 cíleného obohacení do obou reakčních zkumavek (Fw a Rv).

Krátce odstředujte

Umístěte reakční zkumavky / destičku do termocykleru a spusťte následující protokol PCR:

teplota	vteřiny	cykly
98 °C	180	1
98 °C	10	30
54 °C	20	
72 °C	20	
72 °C	300	1
4 °C	HOLD	

*Tabulka 3: Profil termocykleru*

**Moment zastavení:** Pokračujte následující fází, nebo uložte amplifikované vzorky při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin, nebo při -20 °C po delší dobu.

### *Purifikace PCR*

Purifikace PCR produktů může být provedena pomocí Agencourt AMPure XP Kit (Beckman counter, kód A63880) nebo Diffinity RapidTip2 (Diffinity Genomics, kód RR050-096) Podrobný protokol naleznete v příručkách výrobců.

Při purifikaci pomocí Diffinity RapidTip2 přidejte 30 µl PCR H<sub>2</sub>O ke každému vzorku, čímž dosáhnete objemu 50 µl potřebného pro protokol purifikace.

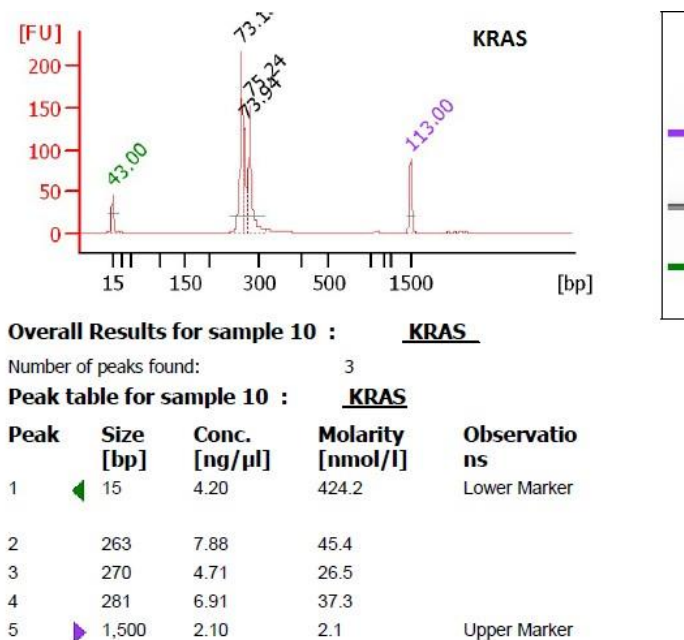
## Kontrola kvality PCR produktů

Ověřte kvalitu PCR produktů před započítáním následujících fází. Doporučuje se použít systém Agilent 2100 Bioanalyzer se sadou činidel DNA 1000 (kat. č. 5067-1504). Eventuálně je možné použít systém pro elektroforézu s 2,5% agarózovým gelem, a to i v případě, že by mělo být velmi obtížné rozlišit různé skupiny, protože mají velmi podobné délky.

Operativní protokol Agilent 2100 Bioanalyzer naleznete v příručce výrobce.

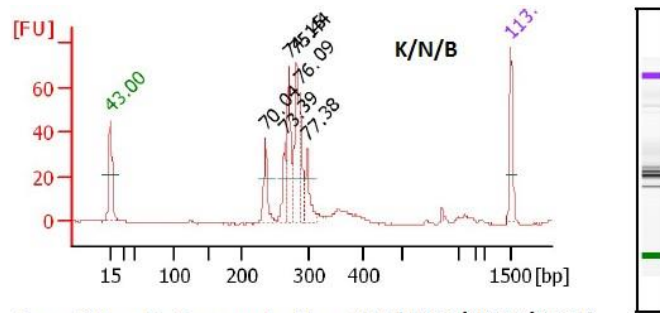
Provedte analýzu 4 µl každého amplifikovaného produktu na 2,5% agarózovém gelu na 60/90 minut při 90 voltech nebo pomocí Agilent 2100 Bioanalyzer se sadou DNA 1000. (podrobný protokol naleznete v příručkách výrobců)

Očekávanou délku každého fragmentu lze vypočítat přidáním 66 bp k očekávané délce fragmentů udávaných ve zvolené sadě cíleného obohacení (bod 9.4 příručky sady cíleného obohacení).



Obrázek 1: příklad KRAS amplifikovaného barcoding sadou





**Overall Results for sample 11 : CRC (KRAS/NRAS/BRAF)**

Number of peaks found: 6

**Peak table for sample 11 : CRC (KRAS/NRAS/BRAF)**

Peak	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	Molarity [nmol/l]	Observations
1	15	4.20	424.2	Lower Marker
2	236	1.92	12.3	
3	265	1.53	8.8	
4	271	3.24	18.1	
5	282	3.37	18.1	
6	288	2.50	13.2	
7	299	1.72	8.7	
8	1,500	2.10	2.1	Upper Marker

Obrázek 2: příklad KRAS/NRAS/BRAF CRC IVD panelu amplifikovaného barcoding sadou

**Přerušení práce:** Pokračujte následující fází, nebo uložte amplifikované vzorky při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin, nebo při -20 °C po delší dobu.

### Kvantifikace PCR produktů

Před spojením vzorků stanovte koncentraci každého PCR produktu.

Stanovte počáteční koncentraci DNA pomocí fluorimetru Qubit® 2.0 (Invitrogen kód Q32866) nebo fluorimetru Qubit® 3.0 (Invitrogen kód Q33216) s Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, kód Q32851).

### Příprava templátu

Po PCR zředte každý vzorek podle výsledků získaných v tabulce kvantifikace (viz níže, požádejte o verzi Excel). Použijte koncentraci DNA získanou v bodě 8.4.1. k vypočítání faktoru ředění 2,6 nM pro všechny PCR produkty, následně přidejte 1 μl templátu k objemu H<sub>2</sub>O PCR jakosti vypočtené v tabulce. Opatrně promíchejte.

Vzorek	DNA koncentrace (ng/ $\mu$ l)	cílová délka	molekuly/ $\mu$ l	nmol/l (nM)	Objem vzorku ( $\mu$ l)	Objem H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l) (na 2,6 nM)
1F	22,4	270	7,6089E+10	126,35	1	47,6
1R	19,8	270	6,7258E+10	111,69	1	42,0
2F	14,9	270	5,0613E+10	84,05	1	31,3
2R	16	270	5,435E+10	90,25	1	33,7
3F	18,9	270	6,42E+10	106,61	1	40,0
3R	21,7	270	7,3712E+10	122,40	1	46,1

*Tabulka 4: Tabulka kvantifikace*

Přeneste stejné množství každého zředěného vzorku (tj. 5  $\mu$ l) do nové zkumavky, čímž získáte 100x pool. Pečlivě promíchejte a krátce odstředte.

Připravte 1x pool se dvěma sériovými roztoky 1:10 v PCR H<sub>2</sub>O 100x poolu:

- 10X pool: přidejte 10  $\mu$ l z 100x poolu do 90  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, pečlivě promíchejte.
- 1x pool: přidejte 10  $\mu$ l z 10x poolu do 90  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, pečlivě promíchejte.

Použijte 25  $\mu$ l tohoto 1x poolu (26 pM) pro následující fázi emulzní PCR.

## TABULKA KVANTIFIKACE

Vzorek	DNA koncentrace (ng/μl)	cílová délka	molekuly/μl	nmol/l (nM)	Objem vzorku	Obj. H <sub>2</sub> O (na 2,6 nM)
1F	22,4	270	7,6089E+10	126,35	1	47,6
1R	19,8	270	6,7258E+10	111,69	1	42,0
2F	14,9	270	5,0613E+10	84,05	1	31,3
2R	16	270	5,435E+10	90,25	1	33,7
3F	18,9	270	6,42E+10	106,61	1	40,0
3R	21,7	270	7,3712E+10	122,40	1	46,1

### VYSVĚTLIVKY K TABULCE KVANTIFIKACE

- **VZOREK:** jméno nebo č. vzorku
- **DNA koncentrace (ng/μl):** do tohoto sloupce vepište hodnoty koncentrace (ng/μl) získané ve fázi 8.4.1
- **Cílová délka:** 270 bp je průměrná délka barkódovaných knihoven.
- **Molekuly/μl:** počet molekul amplifikačního produktu na μl. Vypočítá se následně:

$$\text{molekuly}/\mu\text{l} = \frac{\text{DNA koncentrace } (\underline{\text{g}/\mu\text{l}}) \times 6022 \times 10^{23}}{\text{PM DNA [656,6 x délka vzorce]}}$$

Nebo

$$\text{molekuly}/\mu\text{l} = \frac{\text{DNA koncentrace } (\underline{\text{ng}/\mu\text{l}}) \times 6022 \times 10^{23}}{\text{PM DNA [656,6 x délka vzorce]} \times 10^9}$$

- **nmol/l:** molarita PCR produktu. Vypočítá se následovně:

$$\text{nmol/l} = \frac{\text{molekuly}/\mu\text{l} \times 10^{15}}{6,022 \times 10^{23}}$$

- **Objem vzorku ( $\mu$ l):** objem (1  $\mu$ l), který má být přidán do objemu H<sub>2</sub>O vypočítaného v sousedním sloupci, čímž se získá 2,6 nM (100x) směsi.
- **Obj. H<sub>2</sub>O ( $\mu$ l) (na 2,6 nM)** Objem H<sub>2</sub>O, který má být přidán k 1  $\mu$ l produktu amplifikace, čímž se získá 2,6 nM (100x) směsi

## 9. ŘEŠENÍ PROBLÉMŮ

PROBLÉM	MOŽNÁ PŘÍČINA	Doporučení
Absence očekávaných fragmentů na agarózovém gelu	Chybně naprogramovaný termocykler	Zkontrolujte teplotní profil a kalibraci a reakci opakujte
	Chyba při přípravě Master Mixu	Zkontrolujte složky PCR směsi a reakci opakujte
	Degradace reagensů	Zkontrolujte datum expirace a podmínky uskladnění sady
	Přítomnost inhibitorů	Zkontrolujte koncentraci a kvalitu extrahované DNA fluorimetrem. V případě potřeby opakujte extrakci.
	Nedostatečná kvantita DNA	Zkontrolujte koncentraci a kvalitu DNA fluorimetrem. V případě potřeby opakujte extrakci
Přítomnost smíru na agarósovém gelu	Degradace templátové DNA	Zkontrolujte koncentraci a kvalitu DNA fluorimetrem. V případě potřeby opakujte extrakci DNA
Přítomnost fragmentů s nízkou molekulovou hmotností	Zbytky primerů a/nebo zhoršení kvality adaptérů, výskyt dimerů oligonukleotidů, atd.	Eliminujte fragmenty s nízkou molekulovou hmotností za použití kalibračních postupů pomocí AMPure XP Beads nebo Diffinity Rapid Tips