



SarcomaFusion



DEUTSCH

Gebrauchsanweisung GENEXPATH SarcomaFusion.

Vorsichtsmaßnahmen für den Gebrauch.



In-vitro-Diagnostikum gemäß Richtlinie (EU) 98/79/EG



Für die Verwendung in der *In-vitro*-Diagnostik

Nur für den professionellen Gebrauch bestimmt.

Lesen Sie vor dem Gebrauch alle Informationen in dieser Anleitung.

Kontakt:

Hersteller: GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen – Frankreich

contact@genexpath.com

support@genexpath.com

Wichtige Vorsichtsmaßnahmen	5
Allgemeine Empfehlungen	5
Symbole.....	5
Verwendungszweck	6
Testprinzip.....	6
Reagenzien.....	7
Inhalt des GENEXPATH SarcomaFusion Reagenzien-Kits.....	7
Format der vermarkteten Reagenzien-Kits und Mengen	8
Nicht im Reagenzien-Kit enthaltene Reagenzien.....	8
Benötigte Materialien	9
Bevor Sie beginnen	9
Biologische Proben.....	9
Programmierung von Thermocyclern	10
Programm 1: Pre-PCR.....	10
Programm 2: PCR.....	11
Detailliertes Protokoll	11
Schritt 1: Reverse Transkription	11
Benötigte Reagenzien.....	11
Reverse Transkription.....	11
Schritt 2: Hybridisierung der Sonden	12
Benötigte Reagenzien.....	12
Hybridisierung der Sonden.....	12
Schritt 3: Ligation	12
Benötigte Reagenzien.....	12
Ligation	12
Schritt 4: Amplifikation und Integration von Barcodes und Adaptern	13
Benötigte Reagenzien.....	14
Amplifikation.....	14
Schritt 5: Aufreinigung und Dosierung von Sequenzierbibliotheken	14
Benötigte Reagenzien.....	15

Schritt 5.a: Aufreinigung der Sequenzierbibliotheken.....	15
Schritt 5.b: Dosierung von Sequenzierbibliotheken	15
Schritt 6: Verdünnung, Poolen und Sequenzierung der Bibliotheken	15
Benötigte Reagenzien.....	15
Sequenzierung in einem Illumina MiSeq-Sequenziergerät	15
• Schritt 6.a: Verdünnung und Poolen von Bibliotheken	16
• Schritt 6.b: Denaturierung und Verdünnung des Bibliothekspools.....	16
• Schritt 6.c: Vorbereitung der Sequenzierungsprimer	16
• Schritt 6.d: Vorbereitung des Probenblatts.....	16
• Schritt 6.e: Starten der Sequenzierung.....	17
Sequenzierung in einem Illumina NextSeq 500/550 System	17
• Schritt 6.a: Verdünnung und Poolen von Bibliotheken	17
• Schritt 6.b: Denaturierung und Verdünnung des Bibliothekspools.....	17
• Schritt 6.c: Vorbereitung der Sequenzierungsprimer	18
• Schritt 6.d: Vorbereitung des Probenblatts.....	18
• Schritt 6.e: Starten der Sequenzierung.....	18
Schritt 7: Analyse der Ergebnisse	18
Verfahrensgrenzen.....	19
Leistungsbestimmung	20
Analytische Leistungen.....	20
Tabelle 1: Zusammenfassung der erwarteten Ergebnisse	20
Analytische Leistungen an einer Patientenkohorte	21
Wiederholbarkeit.....	21
Wiederholbarkeits-Zwischenläufe	22
Reproduzierbarkeit.....	22
Analytische Sensibilität.....	23
Literatur	24
Symboltabelle.....	25
Hinweise.....	25

Wichtige Vorsichtsmaßnahmen.

Allgemeine Empfehlungen.

- Verwendbar für die In-vitro-Diagnostik
- Beachten Sie die gute Laborpraxis für den Umgang mit PCR-Produkten (Tragen eines Laborkittels und von Einweghandschuhen, Abgrenzen von speziellen Pre- und Post-PCR-Bereichen, Verwendung von Filterspitzen).
- Treffen Sie auch Vorsichtsmaßnahmen, um Kontaminationen mit Nukleasen zu vermeiden, die einen Abbau von RNA und DNA induzieren könnten (verwenden Sie nukleasefrei Verbrauchsmaterialien und Reagenzien).
- Darauf achten, dass sich die Thermocycler in funktionstüchtigen Zustand befinden und gemäß den Empfehlungen des Herstellers kalibriert sind.
- Es ist besonders wichtig, dass Sie Reagenzien, die nicht im Kit enthalten sind, nicht austauschen, insbesondere die Puffer und Enzyme, die in den Schritten der reversen Transkription, Ligation und PCR-Amplifikation verwendet werden. Auch die Inkubationszeiten und -temperaturen sowie die Volumina und Konzentrationen müssen beachtet werden.
- Das **SarcomaFusion**-Testkit enthält eine interne GAPDH-Positivkontrolle. Es wird dringend empfohlen, sie durchzuführen, um die korrekte Durchführung Ihres Experiments zu bestätigen.
- Die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Reagenzien sind nur für die Verwendung in den Sequenziersystemen Miseq oder Nextseq 500/550 von Illumina bestimmt.
- Die Sicherheitsdatenblätter sind im Anwenderbereich erhältlich.
- Maßnahmen für den Fall, dass der Anwender Fehler in den von Ihnen bereitgestellten Anweisungen entdeckt: Wenden Sie sich an contact@genexpath.com.
- Alle schwerwiegenden Vorfälle, die im Zusammenhang mit dem Diagnostikum aufgetreten sind, müssen uns gemeldet werden: contact@genexpath.com.

Symbole



Wichtige Punkte und kritische Schritte im Protokoll, die die Qualität der Ergebnisse beeinträchtigen können.



Schritte, in denen das Protokoll ausgesetzt werden kann.

Verwendungszweck

Dieses Protokoll ist für die Durchführung des **GENEXPATH SarcomaFusion**-Tests bestimmt. Es dient zur Vorbereitung von Sequenzierbibliotheken für Illumina-Sequenziergeräte des Typs MiSeq oder NextSeq 500/550.

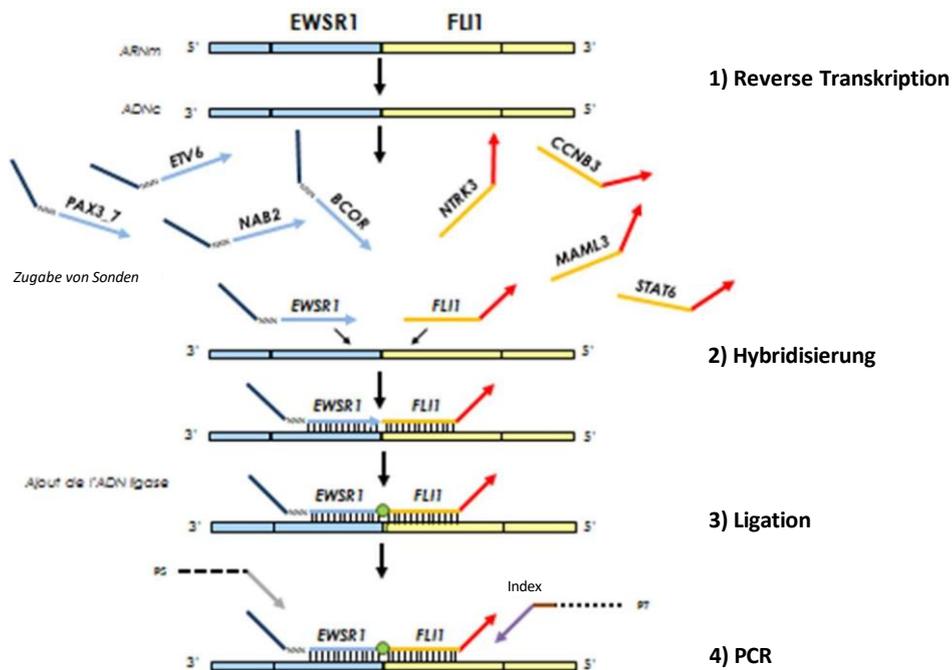
Die mit diesem Test erzeugten fastQ-Dateien enthalten Daten über die Zählung von Sequenzen, die dem möglichen Vorhandensein eines Fusionstranskripts entsprechen, d. h. über die Ligation von zwei Sonden und deren Amplifikation.

Sie können mit der Software **GENEXPATH RT-MIS** analysiert werden, die eine spezielle Sequenzdemultiplex-Anwendung enthält.

Dieser Test ermöglicht durch die Untersuchung von 138 Genen den Nachweis von Fusionstranskripten, die in 58 Arten von Knochen- und Weichgewebstumoren gefunden werden.

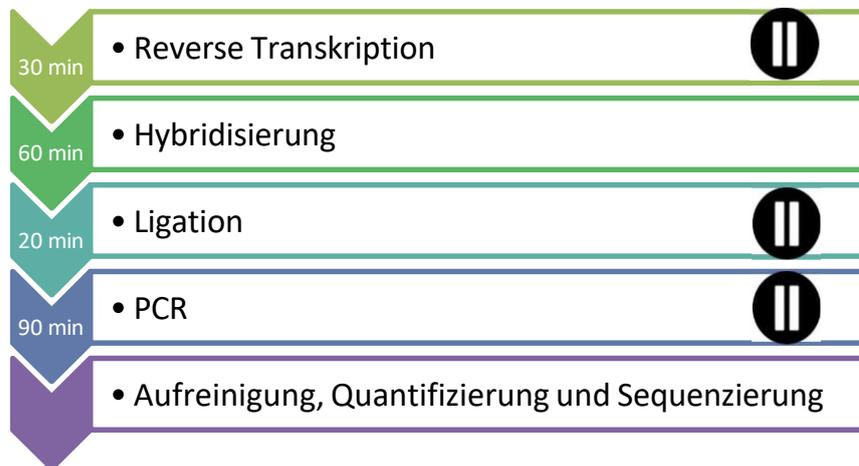
Testprinzip

Der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Test basiert auf einer ligationsabhängigen RT-PCR-Methode (LD-RT-PCR). Diese semiquantitative Technik ermöglicht den Nachweis von Chromosomentranslokationen mithilfe spezifischer Oligonukleotid-Sondenpaare. Ein Sondenpaar für ein Kontrollgen (GAPDH) ist im Sonden-Mix des Tests enthalten und ermöglicht so eine interne Kontrolle Ihres Experiments.



Ausgehend von einem RNA-Gesamtextrakt reichen vier Schritte, um die Bibliotheken zu erhalten.

- Ein reverser Transkriptionsschritt (RT).
- Ein Schritt zur Hybridisierung der spezifischen Oligonukleotid-Sonden.
- Ein Ligationsschritt.
- Ein PCR-Amplifikationsschritt.



Bis zum Erhalt der Bibliotheken ist keine Aufreinigung erforderlich, was den Materialverlust begrenzt und eine sehr hohe Sensitivität dieser Technik gewährleistet. Außerdem sind die Ziel-Gensequenzen der Sonden besonders kurz (zwischen 40 und 60 Basen), was eine sehr gute Robustheit gegenüber RNA-Abbau gewährleistet.

Die LD-RT-PCR ist daher ein besonders geeigneter Ansatz für die Analyse schwieriger biologischer Proben wie fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebebiopsien.

Für jede Probe reichen etwa 10^5 Sequenzen aus, um ein analysierbares Expressionsprofil zu erhalten, sodass eine große Anzahl von Proben parallel in einer einzigen FlowCell zur Sequenzierung getestet werden kann. Die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken können auch zusammen mit anderen Sequenzierbibliotheken geladen werden, die mit anderen Methoden erzeugt wurden.

Reagenzien.

Inhalt des GENEXPATH SarcomaFusion Reagenzien-Kits.

Sonden-Mix GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SFPM
Barcodes GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BC-xxx
Sequenzprimer GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-001

Barcodes GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-BCC-xxx
Sequenzprimer GAPDH GENEXPATH SarcomaFusion	GEP-SP-002

XXX: Barcode-Nr.

Nach Erhalt müssen diese Reagenzien zwischen -25 °C und -15 °C gelagert werden.

Sie sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.

Die Haltbarkeit der Reagenzien beträgt ein Jahr.

Sofort nach Gebrauch wieder auf geeignete Lagerbedingungen bringen.

Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatums.

Das Produkt ist bei sachgemäßem Gebrauch bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Format der vermarkteten Reagenzien-Kits und Mengen:

	Reagenzien-Kit - U = Anzahl der Analysen			
	8U	16U	24U	48U
Sonden-Mix GEP-SFPM	30 µL	48 µL	54 µL	108 µL
Barcodes GEP-BC-xxx (von 001 bis 032, je nach Anzahl der gekauften Analysen) BC=Barcode	8 BC	8 BC	12 BC	24 BC
	Nr. 017 bis 024	Nr. 001 bis 008	Nr. 021 bis 032	Nr. 001 bis 024
	5 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC	9 µL/BC
Sequenzierungsprimer GEP-SP-001	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL
Für die interne Kontrolle				
Barcodes GAPDH GEP-BCC-xxx (von 001 bis 032, je nach Anzahl der gekauften Analysen) BCC=Barcode für die Kontrolle	8 BCC	8 BCC	12 BCC	24 BCC
	Nr. 017 bis 024	Nr. 001 bis 008	Nr. 021 bis 032	Nr. 001 bis 024
	5 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC	9 µL/BCC
GAPDH-Sequenzierungsprimer GEP-SP-002	60 µL	96 µL	144 µL	288 µL

Reagenzien werden in größeren Mengen bereitgestellt, als tatsächlich benötigt werden. Nach Ablauf der Anzahl der bestellten Analysen müssen sie entsorgt werden. Wenn eine neue Bestellung aufgegeben wird, werden die Reagenzien entsprechend geliefert.

Bei einem Reagenzien-Kit mit mehr als 8 Tests ist jeder Barcode für 2 verschiedene Tests zu verwenden.

Nicht im Reagenzien-Kit enthaltene Reagenzien:

<i>Reagenzien</i>	<i>Lieferant und Art.-Nr.</i>
SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Art.-Nr. 11754250
SALSA MLPA Buffer	MRC Holland, Art.-Nr. SMR33
SALSA Ligase Buffer A	MRC Holland, Art.-Nr. SMR12
SALSA Ligase Buffer B	MRC Holland, Art.-Nr. SMR13

SALSA Ligase 65	MRC Holland, Art.-Nr. SMR20
Red'y' Star PCR Mix	Eurogentec, Art.-Nr. PK-0073-02R
AMPure XP (magnetische Beads)	Beckman Coulter, Art.-Nr. A63880
Qubit® dsDNA HS Assay	Fisher Scientific, Art.-Nr. 10616763
Sequenzierungs-Reagenzien	Illumina
TE-Puffer (10 mM Tris-Acetat pH 8.0, 1 mM EDTA)	Variable
Ethanol 100 %	Variable
NaOH 1 N	Variable
Tris Buffer 200 mM pH 7	Variable
Nuclease-free water (nuclease-free Wasser)	Variable

Nach Erhalt und zwischen den einzelnen Verwendungen sollten diese Reagenzien gemäß den Empfehlungen der verschiedenen Lieferanten aufbewahrt werden.

Benötigte Materialien:

Material	Lieferant und Art.-Nr.
Thermocycler im Pre-PCR-Bereich	Variable
Thermocycler im Post-PCR-Bereich	Variable
Qubit® Fluorometer (oder gleichwertig)	Thermo Fisher Scientific, Art.-Nr. Q33238
Qubit® Assay-Röhrchen	Fisher Scientific, Art.-Nr. 12037609
DynaMag™-96 Seitenmagnet – Magnetplatte (AMPure XP Aufreinigung)	Thermo Fisher Scientific, Art.-Nr. 12331D
PCR-Röhrchen und -Platten 200 µL	Variable

Bevor Sie beginnen.

Biologische Proben.

Mit dem **GENEXPATH SarcomaFusion**-Test können Sequenzierbibliotheken aus Gesamt-RNA hergestellt werden, die aus Gewebe- oder Tumorbiopsien von Sarkomen (Knochen- und Weichteiltumoren) extrahiert wurden.

Diese Proben können frisch, gefroren oder formalinfixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) sein.

Für die Extraktion von RNA aus fixiertem Gewebe wird das Promega Maxwell® RSC RNA FFPE Kit (Promega, Art.-Nr. AS1440 und AS4500) empfohlen.

Die Menge der zu analysierenden RNA sollte zwischen **50 und 500 ng in einem Volumen von 2,5 µL** liegen. Wenn die Konzentration der zu analysierenden Lösungen zu hoch ist, können diese RNAs mit nuclease-freem Wasser verdünnt werden.

Programmierung von Thermocyclern.

Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, sollten Sie zwei Thermocycler verwenden, einen im Pre-PCR-Bereich und einen im Post-PCR-Bereich.

Es werden zwei Programme benötigt:

- Mit dem ersten werden die ersten drei Schritte des Protokolls durchgeführt: **reverse Transkription der RNA in cDNA, Hybridisierung der Oligo-Nukleotid-Sonden und Ligation**. Es muss in dem Thermocycler, der sich im Pre-PCR-Bereich befindet, durchgeführt werden.
- Mit dem zweiten werden die Ligationsprodukte amplifiziert und die für die Sequenzierung notwendigen Barcodes und Adapter eingebettet. Es muss in dem Thermocycler im Post-PCR-Bereich durchgeführt werden.

Programm 1: Pre-PCR.



Da die Reaktionsvolumina gering sind, stellen Sie sicher, dass die Temperatur des Heizdeckels des Thermocyclers bei allen Programmschritten auf einem hohen Niveau (95 °C) bleibt, um Verdunstung zu vermeiden.

Zwischen den einzelnen Schritten des Programms sind Pausenbereiche bei 4 °C oder 54 °C vorgesehen, damit die notwendigen Reagenzien zugegeben werden können.

Schritt 1: Reverse Transkription von RNA in cDNA.

- Heizdeckel: 95 °C
- 10 Minuten 25 °C
- 60 Minuten bei 42 °C
- 5 Minuten 85 °C
- 4 °C unendlich

Schritt 2: Hybridisierung der Sonden.

- Heizdeckel: 95 °C
- 2 Minuten 95 °C
- 60 °C unendlich (1 h Hybridisierung)

Schritt 3: Ligation.

- Heizdeckel: 95 °C
- 54 °C unendlich (Verteilung des Ligationsmix)
- 15 Minuten 54 °C
- 5 Minuten 98 °C

- 4 °C unendlich

Programm 2: PCR.

- Heizdeckel: 95 °C
- 6 Minuten 94 °C
- 35 x (30 Sekunden 94 °C; 30 Sekunden 58 °C; 30 Sekunden 72 °C)
- 4 Minuten 72 °C
- 4 °C unendlich

Detailliertes Protokoll.

Schritt 1: Reverse Transkription.

Dieser Schritt sollte im Pre-PCR-Bereich durchgeführt werden.

Benötigte Reagenzien.

- 5X Vilo reaction mix, 10X super script (SuperScript Vilo cDNA Synthesis Kit), nuclease-free Wasser, Extrakt der gesamten zu testenden RNA (25 bis 250 ng/μL).



Es wird empfohlen, das gesamte Verfahren in 200-μL-PCR-Röhrchen oder -Platten durchzuführen.

Reverse Transkription.

- Die folgenden Reagenzien auftauen und sie dann auf Eis oder in einem Kühlrack lagern: 5X Vilo reaction mix und 10X super script.
- Einen Mix für die reverse Transkription vorbereiten. Für jede Probe mischen (für ein Gesamtvolumen von 3 μL pro Reaktion):

○ 5X Vilo reaction mix	1 μL
○ Nuclease-free Wasser	1 μL
○ 10X super script	0,5 μL
- Diesen Mix in 200 μL PCR-Röhrchen (2,5 μL pro Röhrchen) verteilen, die auf Eis oder in einem Kühlrack gelagert werden.
- Jeweils 2,5 μL der Gesamt-RNA-Lösungen in die verschiedenen Röhrchen geben.
- Vortexen, kurz zentrifugieren.
- Die Röhrchen in den Thermocycler stellen, der sich im Pre-PCR-Bereich befindet, und **Schritt 1 des Pre-PCR-Programms** durchführen (reverse Transkription von RNA in cDNA).



Anschließend direkt mit Schritt 2 fortfahren oder die Ligationsprodukte bei -25 °C bis -15 °C lagern.

Schritt 2: Hybridisierung der Sonden.

Dieser Schritt sollte im Pre-PCR-Bereich durchgeführt werden.

Benötigte Reagenzien.

- Sonden-Mix **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP- SFPM), SALSA MLPA Buffer

Hybridisierung der Sonden.

- **Nach Abschluss von Schritt 1**, wenn die Temperatur des Thermocyclers wieder auf 4 °C gesunken ist, die Röhrrchen herausnehmen, sie kurz zentrifugieren und auf Eis oder in einem Kühlrack lagern.
- Die Puffer Salsa MLP Buffer und den Sonden-Mix **GENEXPATH SarcomaFusion** auftauen und sie auf Eis oder in einem Kühlrack lagern.
- Einen Hybridisierungsmix vorbereiten. Für jede Probe mischen (für ein Gesamtvolumen von 3 µL pro Reaktion):
 - Salsa MLPA Buffer 1,5 µL
 - Sonden-Mix **GENEXPATH SarcomaFusion** 1,5 µL
- Vortexen, kurz zentrifugieren.
- 3 µL dieses Mix in jedes cDNA-Röhrrchen geben.
- Kurz zentrifugieren.
- Die Röhrrchen wieder in den Thermocycler einsetzen.
- Die Temperatur des Heizdeckels (95 °C) prüfen.
- **Schritt 2 des Pre-PCR-Programms** (Sondenhybridisierung) durchführen.

Schritt 3: Ligation.

Dieser Schritt sollte im Pre-PCR-Bereich durchgeführt werden.

Benötigte Reagenzien.

- SALSA Ligase Buffer A, SALSA Ligase Buffer B, SALSA Ligase 65, nuclease-free Wasser.

Ligation.

- 15 Minuten vor dem Ende von Schritt 2 die Puffer SALSA Ligase Buffer A und SALSA Ligase Buffer B auftauen und sie auf Eis oder in einem Kühlrack lagern.

- Das Enzym SALSA ligase 65 auf Eis oder in ein Kühlrack setzen.
- Einen Ligationsmix vorbereiten. Für jede Probe mischen (für ein Gesamtvolumen von 32 µL pro Reaktion):
 - Nuclease-free Wasser 25 µL
 - Salsa Ligase Buffer A 3 µL
 - Salsa Ligase Buffer B 3 µL
- Vortexen, kurz zentrifugieren
 - Salsa Ligase 65 1 µL
- Vortexen, kurz zentrifugieren.
- Nach Ablauf der 60-minütigen Inkubationszeit **Schritt 3 des Pre-PCR-Programms (Ligation)** durchführen.
- Die Temperatur des Heizblocks auf 54 °C absenken.
- 32 µL des Ligationsmix direkt in jedes Röhrchen geben, ohne sie aus dem Heizblock zu nehmen.
- Nach dem Verteilen des Mix den nächsten Programmschritt durchführen (15 Minuten bei 54 °C, 5 Minuten bei 98 °C).



Nach diesem Schritt, wenn die Temperatur des PCR-Blocks wieder auf 4 °C gesunken ist, sofort mit Schritt 4 (Amplifikation durch PCR) fortfahren oder die Ligationsprodukte einfrieren (zwischen -25 °C und -15 °C).



Nach diesem Schritt sollten die Produkte nicht bei höheren Temperaturen (z. B. 4 °C oder Raumtemperatur) gelagert werden, um unspezifische Ligationen zu vermeiden, die aus einer Restaktivität des Enzyms resultieren könnten.

Schritt 4: Amplifikation und Integration von Barcodes und Adaptern.

In diesem Schritt werden die Ligationsprodukte durch PCR mithilfe der zusätzlichen Enden an den Enden der Sonden amplifiziert. Diese Amplifikationen werden mithilfe von Primer-Paaren durchgeführt, die in den **GENEXPATH SarcomaFusion**-Barcode-Röhrchen (GEP-BC-xxx) bereitgestellt werden.

Um die Analyse mehrerer Proben auf einer FlowCell zu ermöglichen, trägt der 3'-PCR-Primer einen molekularen Barcode, der vom Demultiplexing-Algorithmus des **GENEXPATH RT-MIS**-Systems erkannt wird.

Um die interne Kontrolle mit den GAPDH-Sonden durchzuführen, werden zwei verschiedene PCRs durchgeführt, daher müssen Sie Ihre Anzahl an Röhrchen verdoppeln. Für eine bestimmte Probe sollte für die Computeranalyse die gleiche Nummer xxx der Barcodes GEP-

BC-xxx und GEP-BCC-xxx verwendet werden. Also muss man für jede Probe in einem Röhrchen den Barcode GEP-BC-xxx und im anderen den zugehörigen Barcode GEP-BCC-xxx zugeben.

Benötigte Reagenzien.

- Barcodes **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BC-xxx), Barcodes GAPDH **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-BCC-xxx), Red'y' Star PCR Mix, nuclease-free Wasser.

Amplifikation.

- Einen Amplifikationsmix im Pre-PCR-Bereich vorbereiten. Für jede Probe mischen (für ein Gesamtvolumen von 18 µL pro Reaktion):
 - o Red'y' Star PCR Mix 12,5 µL
 - o Nuclease-free Wasser 5,5 µL
- Vortexen, kurz zentrifugieren.
- 18 µL dieses Amplifikationsmix in verschiedene Wells einer PCR-Platte verteilen.
- 5 µL der in Schritt 3 erzeugten Ligationsprodukte in jeden Well geben.
- 2 µL **GENEXPATH SarcomaFusion**-Barcode (GEP-BC-xxx oder GEP-BCC-xxx, je nach Test) zugeben.

Für ~~jede~~ der getesteten Proben unterschiedliche BEP-BC-xxx-Barcodes verwenden, aber für eine Probe die gleiche immer für BEP-BC-xxx und GEP-BCC-xxx verwenden.



- Die Platte in den Thermocycler im Post-PCR-Bereich setzen.
- **Programm 2** (PCR) starten.



Am Ende des Programms, wenn die Temperatur des Thermocyclers wieder auf 4 °C gesunken ist, schnell mit Schritt 5 (Aufreinigung) fortfahren oder die Amplifikationsprodukte zwischen -25 °C und -15 °C einfrieren.



Diese Produkte nicht über einen längeren Zeitraum bei höheren Temperaturen lagern (z. B. 4 °C im Thermocycler oder bei Raumtemperatur).

Schritt 5: Aufreinigung und Dosierung von Sequenzierbibliotheken.

Nach Abschluss des Amplifikationsschrittes müssen die Sequenzierbibliotheken aufgereinigt werden, um PCR-Primer und nicht eingebettete Nukleotide zu entfernen. Diese Aufreinigung wird mithilfe der magnetischen Beads AMPure XP durchgeführt. Die Bibliotheken müssen dann mit dem Qubit® dsDNA HS Kit fluorimetrisch dosiert werden, bevor sie in das Sequenziergerät geladen werden.

Benötigte Reagenzien.

- Ethanol 100 %, nuclease-free Wasser, magnetische Beads AMPure XP, TE-Puffer (10 mM Tris-Acetat pH 8.0, 1 mM EDTA), Qubit® dsDNA HS Assay.

Schritt 5.a: Aufreinigung der Sequenzierbibliotheken.



Sicherstellen, dass die Beads vor der Verwendung vollständig resuspendiert sind.

- 25 µL PCR-Produkte mit 45 µL AMPure XP Beads aufreinigen (gemäß den Empfehlungen des Herstellers).
- Die aufgereinigten PCR-Produkte in 50 µL TE-Puffer eluieren.



Nach der Aufreinigung können die Bibliotheken vor der Sequenzierung bei -25 °C bis -15 °C gelagert werden.

Schritt 5.b: Dosierung von Sequenzierbibliotheken.

- 10 µL jeder Sequenzierbibliothek fluorimetrisch mithilfe des Qubit® dsDNA HS Assays dosieren.

Schritt 6: Verdünnung, Poolen und Sequenzierung der Bibliotheken.

Nach der Reinigung müssen die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken verdünnt, gebündelt und in den Sequenzer geladen werden.



Um optimale Ergebnisse zu erzielen, müssen für jede Probe mindestens 10⁵ Sequenzen gelesen werden.

Anders als bei den meisten herkömmlichen Sequenzierbibliotheken erfolgt das Lesen der molekularen Barcodes, die zum Demultiplexen der **GENEXPATH SarcomaFusion** Sequenzen benötigt werden, während des Read1. Diese Sequenzen werden also nicht automatisch vom Sequenzer demultiplext und werden in den fastQ „Undetermined“-Dateien gespeichert. Das Demultiplexen erfolgt mithilfe eines speziellen Algorithmus, der im **GENEXPATH RT-MIS**-System zur Verfügung gestellt wird.

Benötigte Reagenzien.

- Sequenzierungsprimer **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-001),
Kontrollsequenzierungsprimer **GENEXPATH SarcomaFusion** (GEP-SP-002) (wenn interne Kontrolle durchgeführt wird), Illumina Sequenzierungs-Reagenzien.

Sequenzierung in einem Illumina MiSeq-Sequenziergerät.

Ausführliche Informationen zur Verdünnung und Denaturierung der Bibliotheken, zur Vorbereitung des Sequenzierungsprimers, zum Probenblatt und zum Start der Sequenzierung finden Sie im Illumina-Leitfaden für das MiSeq-System.

- Schritt 6.a: Verdünnung und Poolen von Bibliotheken.
 - Jede **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek auf eine Konzentration zwischen 2 nM und 4 nM verdünnen, und dabei von einer durchschnittlichen Größe der amplifizierten Fragmente von 150 bp ausgehen.
 - Die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken im gleichwertigen Volumen poolen.
 - Wenn weitere Bibliotheken auf derselben Flowcell sequenziert werden, die Konzentrationen der verschiedenen Pools anpassen und sie dann kombinieren, um die gewünschte Anzahl an Sequenzen zu erhalten (mindestens 10^5 Sequenzen für jede **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek).

Beispiel: Für einen Pool von 10 **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken, die 1 M Sequenzen benötigen (10^5 Sequenzen für jede Bibliothek), die mit einem Pool von B-Bibliotheken mit derselben Konzentration sequenziert wurden und 3 M Sequenzen benötigen, 1 μ L des **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspools und 3 μ L des B-Bibliothekspools mischen.

- Schritt 6.b: Denaturierung und Verdünnung des Bibliothekspools.
 - Den Endpool gemäß den Empfehlungen der Anleitung des Illumina Miseq-Systems denaturieren und verdünnen, um eine endgültige Ladungskonzentration zwischen 8 und 10 pM zu erhalten.
- Schritt 6.c: Vorbereitung der Sequenzierungsprimer.
 - Wenn der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspool allein sequenziert wird, 3 μ L jedes **GENEXPATH SarcomaFusion**-Sequenzierungsprimers (GEP-SP-001 und GEP-SP-002, falls interne Kontrolle) in einem Endvolumen von 600 μ L HT1-Puffer verdünnen und diese 600 μ L in Well 18 der MiSeq-Reagenzkassette geben.
 - Wenn der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspool mit anderen Bibliotheken beladen ist, die mit Illumina Sequenzierungsprimern sequenziert wurden, den gesamten Inhalt von Well 12 (ca. 600 μ L) pipettieren, 3 μ L jedes **GENEXPATH SarcomaFusion**-Sequenzierungsprimers (GEP-SP-001 und GEP-SP-002, falls interne Kontrolle) zugeben und diesen Mix dann wieder in Well 18 der Kassette geben.
- Schritt 6.d: Vorbereitung des Probenblatts.
 - Wenn die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek allein sequenziert wird, das Probenblatt zur Erzeugung der FASTQs erstellen, wobei 120 Zyklen in Read 1 vorzusehen sind.
 - Wenn die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken mit anderen Sequenzierbibliotheken kombiniert werden, das Probenblatt mit den üblichen Parametern erstellen, ohne die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Proben anzugeben.

- Die Verwendung von Custom bei der Konfiguration des Laufs angeben (mit Local Run Manager auf der Seite Create Run. Im manuellen Laufmodus auf dem Bildschirm Run Setup).



Achten Sie in jedem Fall darauf, dass das Lesen in Read 1 mit mindestens 120 Zyklen erfolgt und dass das Kontrollkästchen für Custom Primer for Read 1 aktiviert wird.

- In allen Fällen werden die Sequenzen der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken nicht vom Sequenzer demultiplext, sondern in der FastQ-Datei „Undetermined“ gespeichert, die dann in das **GENEXPATH RT-MIS**-System geladen werden muss.
- **Schritt 6.e: Starten der Sequenzierung.**
- Die Sequenzierung gemäß den in der Anleitung des Illumina MiSeq-Systems beschriebenen Verfahren starten.

Sequenzierung in einem Illumina NextSeq 500/550 System.

Detaillierte Informationen zur Verdünnung und Denaturierung der Bibliotheken, zur Vorbereitung des Sequenzierungsprimers, zum Probenblatt und zum Start der Sequenzierung finden Sie in der Anleitung für das Illumina NextSeq-System.

- **Schritt 6.a: Verdünnung und Poolen von Bibliotheken.**
- Jede **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek auf eine Konzentration zwischen 0,5 nM und 4 nM verdünnen, und dabei von einer durchschnittlichen Größe der amplifizierten Fragmente von 150 bp ausgehen.
- Die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken im gleichwertigen Volumen poolen.
- Wenn weitere Bibliotheken auf derselben Flowcell sequenziert werden, die Konzentrationen der verschiedenen Pools anpassen und sie dann kombinieren, um die gewünschte Anzahl an Sequenzen zu erhalten (mindestens 10^5 Sequenzen für jede **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek).

Beispiel: Für einen Pool von 10 **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken, die 1 M Sequenzen benötigen (10^5 Sequenzen für jede Bibliothek), die mit einem Pool von B-Bibliotheken mit derselben Konzentration sequenziert wurden und 3 M Sequenzen benötigen, 1 μ L des **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspools und 3 μ L des B-Bibliothekspools mischen.

- **Schritt 6.b: Denaturierung und Verdünnung des Bibliothekspools.**
- Den Endpool gemäß den Empfehlungen der Anleitung des Illumina NextSeq-Systems denaturieren und verdünnen, um eine endgültige Beladungskonzentration von 0,8 pM bis 1 pM zu erhalten.

- **Schritt 6.c: Vorbereitung der Sequenzierungsprimer.**
 - Wenn der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspool allein sequenziert wird, 6 µL jedes **GENEXPATH SarcomaFusion**-Sequenzierungsprimers (GEP-SP-001 und GEP-SP002, falls interne Kontrolle) in einem Endvolumen von 2000 µL HT1-Puffer verdünnen und diese 2 mL in Well 7 der NextSeq-Reagenzkassette geben.
 - Wenn der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothekspool mit anderen Bibliotheken kombiniert ist, die mit Illumina Sequenzierungsprimern sequenziert wurden, den gesamten Inhalt von Well 20 (ca. 2 mL) pipettieren, 6 µL jedes **GENEXPATH SarcomaFusion**-Sequenzierungsprimers (GEP-SP-001 und GEP-SP-002, falls interne Kontrolle) zugeben und diesen Mix dann wieder in Well 7 der Kassette geben.
 - **Schritt 6.d: Vorbereitung des Probenblatts.**
 - Wenn die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliothek allein sequenziert wird, das Probenblatt zur Erzeugung der FASTQs erstellen, wobei 120 Zyklen in Read 1 vorzusehen sind.
 - Wenn die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken mit anderen Sequenzierbibliotheken kombiniert werden, das Probenblatt mit den üblichen Parametern erstellen, ohne die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Proben anzugeben.
 - Die Verwendung von Custom bei der Konfiguration des Laufs angeben (mit Local Run Manager auf der Seite Create Run. Im manuellen Laufmodus auf dem Bildschirm Run Setup).
-  **Achten Sie in jedem Fall darauf, dass das Lesen in Read 1 mit mindestens 120 Zyklen erfolgt und dass das Kontrollkästchen für Custom Primer for Read 1 aktiviert wird.**
- In allen Fällen werden die Sequenzen der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Bibliotheken nicht vom Sequenzer demultiplext, sondern in den vier FastQ-Datei „Undetermined“ gespeichert, die dann in das **GENEXPATH RT-MIS**-System geladen werden müssen.
- **Schritt 6.e: Starten der Sequenzierung.**
 - Die Sequenzierung gemäß den in der Anleitung des Illumina NextSeq-Systems beschriebenen Verfahren starten.

Schritt 7: Analyse der Ergebnisse.

Die vom Illumina-Sequenzierungssystem (MiSeq oder NextSeq) erzeugten Sequenzdateien im FastQ-Format müssen anschließend mit der Software **GENEXPATH RT-MIS** analysiert werden, die online unter folgender Adresse zur Verfügung steht: <https://connect.genexpath.com/>.



Um das Herunterladen der FastQ-Datei zu erleichtern, darf sie nicht dekomprimiert werden (fastq.gz).



Diese Software ist eine umfassende Bioinformatik-Lösung, die verschiedene Algorithmen zur Datenverarbeitung integriert. Sie führt das Demultiplexen durch, das die Zuordnung der Sequenzen zu den einzelnen Proben ermöglicht. Anschließend führt sie eine genaue Identifizierung der Genexpressionsmarker und deren Quantifizierung durch.

Der **GENEXPATH SarcomaFusion**-Test basiert auf einer Quantifizierung qualitativer Marker, die das Vorhandensein oder Fehlen von Chromosomentranslokationen charakterisieren.

GENEXPATH RT-MIS erstellt kurze, transparente Berichte, die vom Einrichten der Sequenzierungsreaktionen bis zur automatisierten Analyse der Sequenzierungsergebnisse reichen.

GENEXPATH RT-MIS erfordert das Hochladen der Sequenzerdateien im FASTQ-Format sowie der Liste der Barcodes, die während des Experiments verwendet wurden.

GENEXPATH RT-MIS bewertet die Qualität der Sequenzierung jeder Probe, indem es die Anzahl der identifizierten Reads und die Anzahl der gefundenen UMIs (unique molecular identifier) quantifiziert.

GENEXPATH RT-MIS erstellt für jede Probe einen Analysebericht, der angibt, ob ein Fusionstranskript vorhanden ist, wie viele Reads und MMUs erzielt wurden und eine Literaturreferenz, die dem Transkript entspricht (falls eine Fusion festgestellt wurde). Diese Daten stehen zum Download zur Verfügung.

GENEXPATH RT-MIS beinhaltet ein direkt online zugängliches Anwenderhandbuch, um den Einstieg in das Tool zu erleichtern, alle erzeugten Ergebnisse zu beschreiben und die Präsentation der Ergebnisse detailliert darzustellen.

Das Unternehmen **GENEXPATH** speichert die von der Software **GENEXPATH RT-MIS** erzeugten Ergebnisse nicht dauerhaft. Die Daten sollten direkt nach jeder Analyse heruntergeladen und vom Anwender in seinem Dokumentenmanagementsystem gespeichert werden.

Verfahrensgrenzen

- Der SarcomaFusion-Test ist optimiert, um mögliche Fusionstranskripte gemäß den im Mix vorhandenen Sonden bei Patienten mit Sarkomen nachzuweisen. Die getesteten Probentypen sind FFPE- oder gefrorene Proben, die möglicherweise aus Nadelbiopsien gewonnen wurden.
- Die im Abschnitt „Leistungsbestimmung“ nachgewiesenen Leistungen wurden nach dem oben genannten Verfahren validiert.
- Eine geringe Menge an RNA oder eine Probe von geringer Qualität kann zu einem nicht interpretierbaren Ergebnis führen.
- Die Sequenzierung sollte mit Sequenziergeräten der Illumina-Technologie (Miseq und NextSeq) durchgeführt werden.

Leistungsbestimmung

Analytische Leistungen

Um die analytische Leistung des SarcomaFusion GENEXPATH-Tests nachzuweisen, wurden 4 RNAs aus FFPE-Proben (3 positiv und 1 negativ) und 3 RNAs aus gefrorenen Proben (alle positiv) von Sarkom-Patienten sowie 2 Zellreihen (negative Proben) ausgewertet. Die erwarteten Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Nach der Analyse mit der Analysesoftware RT-MIS wurden die Ergebnisse gemäß dem in dieser Gebrauchsanweisung beschriebenen Verfahren ermittelt und in Tabelle 2 zusammengefasst.

Diesen Ergebnissen zufolge bietet der SarcomaFusion-Test eine hohe Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von Fusionstranskripten, die mit Sarkomen in Verbindung stehen.

Tabelle 1: Zusammenfassung der erwarteten Ergebnisse

Probe	expected result / <i>obtained</i>	Vorhersagewert	
Probe 1	EWSR1 exon 7 - CREB1 exon 7 <i>EWSR1 exon 7 - CREB1 exon 7</i>	Richtig positiv (VP)	6
Probe 2	JAZF1 exon 3 - SUZ12 exon 2 <i>JAZF1 exon 3 - SUZ12 exon 2</i>	Richtig negativ (WN)	3
Probe 3	PAX3_7 exon 7 - FOXO exon 2 <i>PAX3_7 exon 7 - FOXO exon 2</i>	Positiver Vorhersagewert (%)	100%
Probe 4	Negative <i>no fusion detected</i>	Treffer (%)	100%
Probe 5	SS18 exon 10 – SSX exon6 <i>SS18 exon 10 – SSX exon6</i>	Falsch-positive Rate (%)	0%
Probe 6	PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2 <i>PAX3_7 exon 7 – FOXO exon 2</i>	Sensitivität (%)	100%
Probe 7	EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6 <i>EWSR1 exon 7 – FLI1 exon 6</i>	Falsch-positiv (FP)	0
Zellreihe 1	Negative <i>No fusion detected</i>	Falsch-negativ (FN)	0
Zellreihe 2	Negative <i>no fusion detected</i>	Negativer Vorhersagewert (%)	100%
		Präzision (%)	100%
		Falsch-negative Rate (%)	0%
		Spezifität (%)	100%

Die Ergebnisse zeigen, dass der SarcomaFusion-Test eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Detektion von Fusionstranskripten in Sarkomen bietet.

Analytische Leistungen an einer Patientenkohorte

Eine 2022 veröffentlichte Studie an 158 Knochen- und Weichteiltumorproben (Lanic MD et al., Modern Pathology, 2022) zeigte folgende Leistung:

Empfindlichkeit = 98,1%

Spezifität = 100%

In diesem Artikel berichten die Autoren, dass die wenigen Anomalien, die durch den SarcomaFusion-Test nicht erkannt wurden, erklärt werden durch:

- Das Vorhandensein seltener oder komplexer Translokationen, die nicht vom SarcomaFusion-Test abgedeckt werden
- Die geringe Qualität und Quantität der RNA einiger Proben

Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit des SarcomaFusion-Assays ist definiert als seine Fähigkeit, ein erwartetes Fusionstranskript genau zu quantifizieren. Es wurden zwei Tests durchgeführt:

- Ein Test zum Testen der Wiederholbarkeit der Ergebnisse von 3 Proben innerhalb desselben Durchlaufs - Ein zweiter Test, der es ermöglicht, die Wiederholbarkeit der Ergebnisse von 5 Proben in 3 verschiedenen Durchläufen zu testen

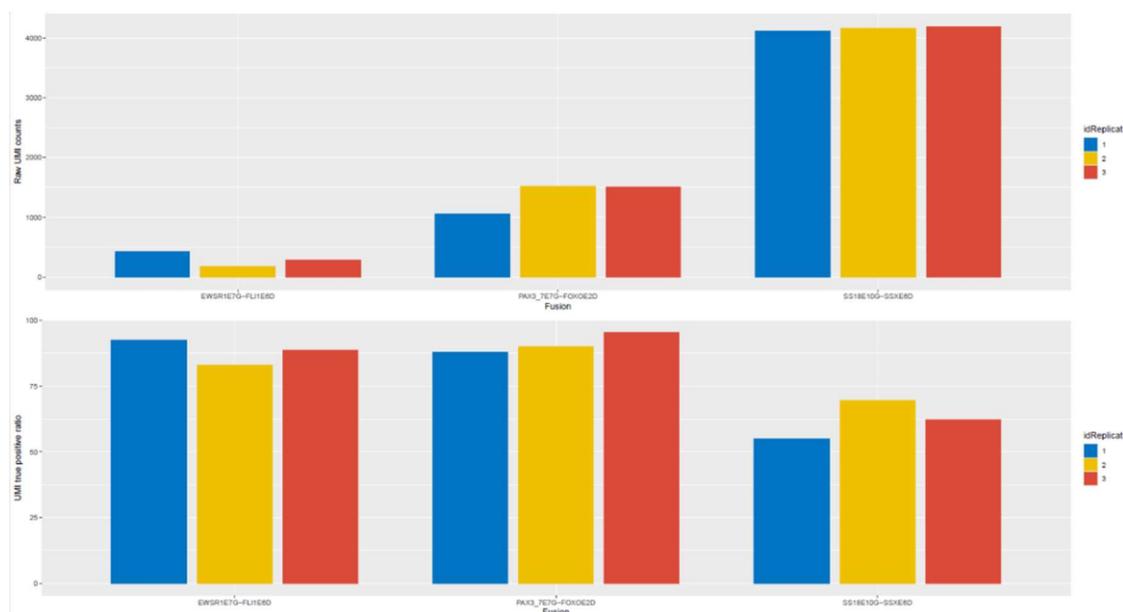


Abbildung 1: Die Histogramme stellen oben die rohe Anzahl der erkannten UMIs und unten die rohe Anzahl der UMIs dar, die sich auf die Gesamtzahl der UMIs der Stichprobe gemäß der erwarteten Fusion und den Replikaten beziehen.

Wiederholbarkeits-Zwischenläufe

5 Proben, die mit dem SarcomaFusion-Test analysiert wurden, wurden in 3 verschiedenen Durchläufen untersucht (Abbildung 2). Die Zählraten für jede Fusion sind perfekt vergleichbar.

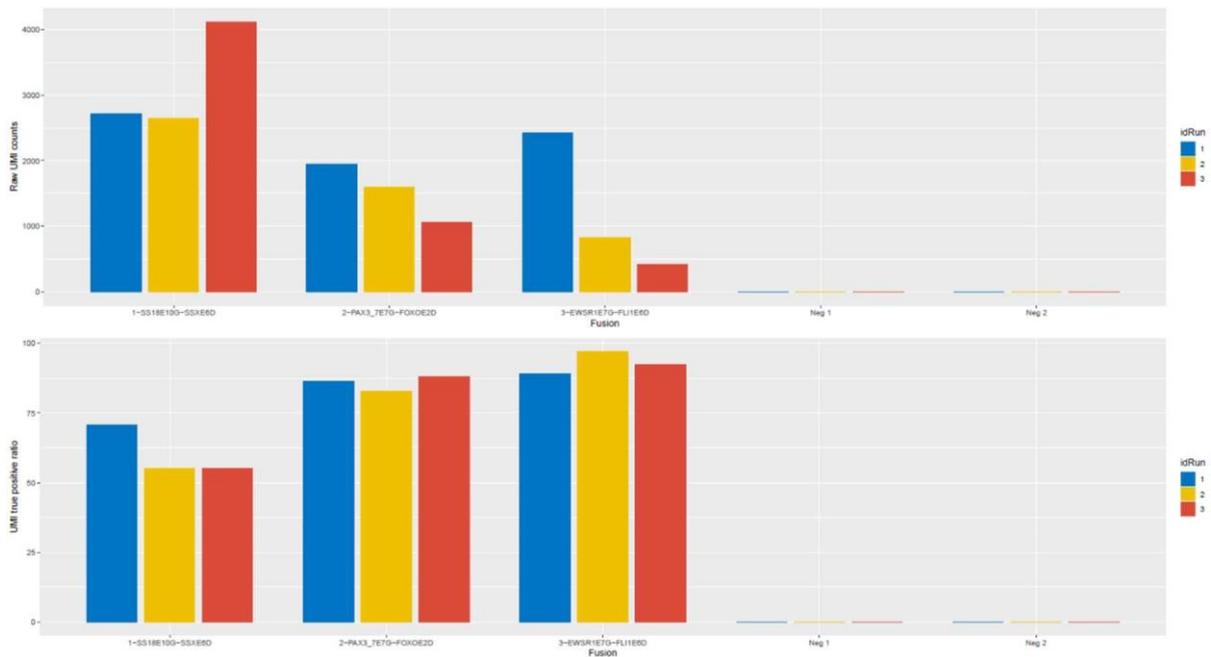


Abbildung 2: Die Histogramme stellen oben die Rohzahl der detektierten UMI und unten die Rohzahl der UMI bezogen auf die Gesamtzahl der UMI der Stichprobe entsprechend der erwarteten Fusion und des Laufs dar.

Reproduzierbarkeit

Reproduzierbarkeit bezieht sich auf die Fähigkeit des SarcomaFusion-Tests, Translokationen zwischen verschiedenen Benutzern unter identischen Bedingungen zu erkennen.

Um diesen Parameter zu bewerten, wurden 5 Proben von 3 verschiedenen Anwendern analysiert:

- 3 positive Proben (SS18 Exon 10 – SSX Exon6, PAX3_7 Exon 7 – FOXO Exon 2, EWSR1 Exon 7 – FLI1 Exon 6)
- 2 negative Proben (Zelllinien)

Die in Abbildung 3 dargestellten Daten zeigen eine reproduzierbare Quantifizierung zwischen verschiedenen Benutzern.

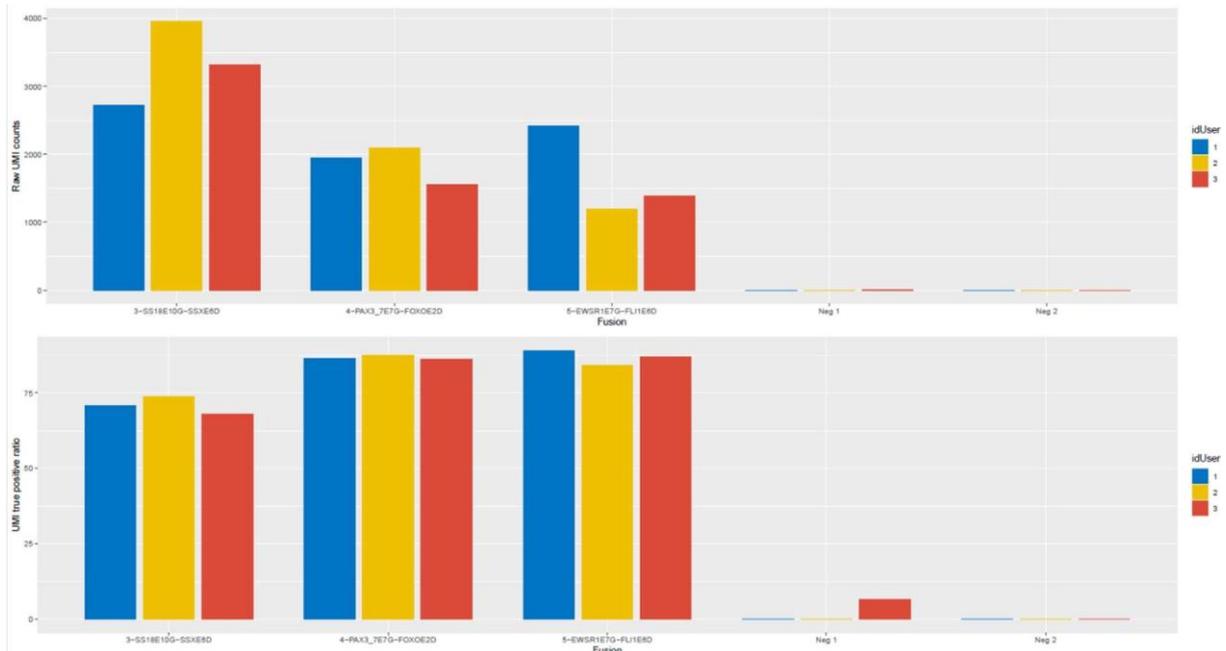


Abbildung 3: Die Histogramme stellen oben die Rohzahl der erkannten UMI und unten die Rohzahl der UMI bezogen auf die Gesamtzahl der UMI der Stichprobe entsprechend der erwarteten Fusion und des Benutzers dar.

Analytische Sensibilität

Die analytische Sensitivität des SarcomaFusion-Tests ist definiert als seine Fähigkeit, Translokationen als Funktion der RNA-Menge in der Probe und des Prozentsatzes der Tumorzellen in der Probe zu erkennen.

Um diese beiden Empfindlichkeitsgrenzen zu bestimmen, wurden zwei serielle Verdünnungen aus 2 Proben durchgeführt:

- Eine Verdünnung in Wasser, um einen Abfall der RNA-Menge zu simulieren
- Eine Verdünnung der zu testenden Probe in universeller RNA, um eine Abnahme der Tumoranreicherung zu simulieren

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

Die Verdünnung von zwei Kontrollproben auf Anfangsmengen von 529 und 489 ng RNA in nuclease-freem Wasser zeigt, dass die erwarteten Fusionen noch bei 4 ng RNA-Mengen nachgewiesen werden. Auch wenn die Quantifizierung der Fusionen von der Tumoranreicherung der getesteten Probe abhängt, liegt der erhaltene Grenzwert deutlich unter den Empfehlungen für die Verwendung des SarcomaFusion-Tests (zwischen 50 und 500 ng).

Der zweite Bereich von Verdünnungen aus zwei positiven Proben und universeller RNA zeigt, dass die erwarteten Anomalien immer bei 3% der Tumorprobe nachgewiesen werden. Bei 0% positiver RNA weist der Test keine Spuren der Fusionen mehr nach.

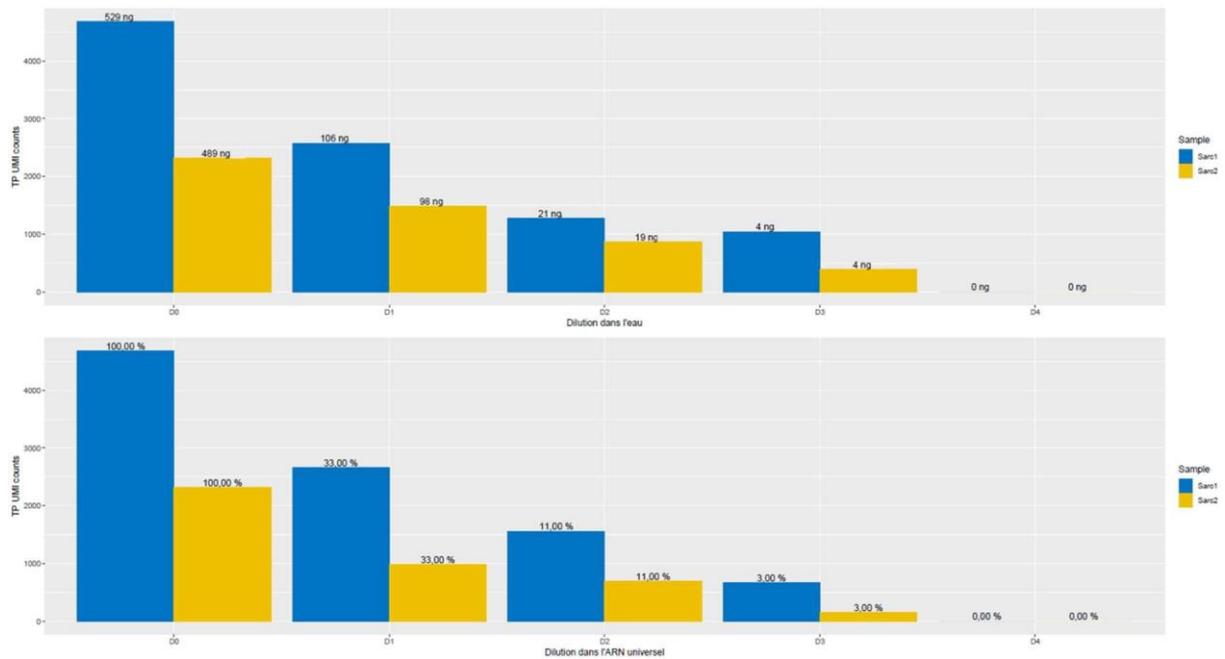


Abbildung 4: Die Histogramme stellen die rohe Anzahl der UMIs dar, die aus den erwarteten Fusionen in zwei Proben gemäß den Verdünnungsbereichen in Wasser (oben) oder in universeller RNA (unten) nachgewiesen wurden.

Literatur

Detection of sarcoma fusions by a next-generation sequencing based-ligation-dependent multiplex RT-PCR assay. Lanic MD et al., Mod Pathol 2022 (PMID: 35075283).

Symboltabelle

 Hersteller	REF Bezeichnung des Reagenz
 Herstellungsdatum	 Zulässiger Temperaturbereich
 Verwendbar bis	 Gebrauchsanweisung lesen
LOT Chargennummer	CE CE-Kennzeichnung – europäische Konformität
	IVD <i>In-vitro</i> -Diagnostikum

Hinweise

Die **GENEXPATH SarcomaFusion**-Reagenzien sind durch geistige Eigentumsrechte geschützt und dürfen ohne Genehmigung des Herstellers nicht verändert, vervielfältigt, verkauft oder übertragen werden.

Änderungen am Inhalt dieses Dokuments sind vorbehalten.