



LymphoSign



Guida all'uso del LymphoSign GENEXPATH

Precauzioni dell'utente.



Dispositivo medico-diagnostico *in vitro* conforme alla direttiva (UE) 98/79/CE



Per uso diagnostico *in vitro*

È solo per uso professionale.

Prima dell'uso, leggere tutte le informazioni contenute in questo manuale d'uso.

Contatti:

Produttore: GENEXPATH

+33 (0)2.78.08.98.69

113 avenue des Martyrs de la Résistance

76100 Rouen - France

contact@genexpath.com

support@genexpath.com

Precauzioni importanti	5
Raccomandazioni generali.	5
Icone	5
Uso previsto.....	6
Principio del test	6
Reagenti.....	7
Contenuto del kit di reagenti GENEXPATH LymphoSign.....	7
Formato dei kit di reagenti venduti e quantità:.....	8
Reagenti non forniti nel kit di reagenti	8
Attrezzatura necessaria	9
Prima di iniziare.	9
Campioni biologici.....	9
Soluzioni da preparare	10
Programmazione dei termociclatori.	10
Programma 1: Pre-PCR.....	10
Programma 2: PCR.....	11
Protocollo dettagliato.....	11
Fase 1: trascrizione inversa	11
Reagenti necessari.....	11
Fase 1.a: Trascrizione inversa; denaturazione dell'RNA e ibridazione di esameri casuali.....	12
Fase 1.b: Trascrizione inversa; conversione dell'RNA in cDNA.	12
Fase 2: ibridazione delle sonde.....	12
Reagenti necessari.....	13
Ibridazione delle sonde.	13
Fase 3: Ligazione	13
Reagenti necessari.....	13
Ligazione.....	13
Fase 4: Amplificazione e incorporazione di codici a barre e adattatori.....	14
Reagenti necessari.....	14



Amplificazione	14
Fase 5: Purificazione e analisi delle librerie di sequenziamento.	15
Reagenti necessari.....	15
Fase 5.a: Purificazione delle librerie di sequenziamento.....	15
Fase 5.b: Saggio delle librerie di sequenziamento:.....	16
Fase 6: diluizione, pooling e sequenziamento delle librerie.....	16
Reagenti necessari.....	16
Sequenziamento su un sequenziatore Illumina MiSeq.....	16
• Fase 6.a: Diluizione e pooling delle librerie.....	16
• Fase 6.b: Denaturazione e diluizione del pool di librerie.....	16
• Fase 6.c: Preparazione del primer di sequenziamento.....	17
• Fase 6.d: Preparazione del foglio di iniezione.....	17
• Fase 6.e: inizio del sequenziamento.	17
Sequenziamento su una piattaforma Illumina NextSeq 500/550.....	17
• Fase 6.a: Diluizione e pooling delle librerie.....	17
• Fase 6.b: Denaturazione e diluizione del pool di librerie.....	18
• Fase 6.c: Preparazione del primer di sequenziamento.....	18
• Fase 6.d: Preparazione del foglio di iniezione.....	18
• Fase 6.e: inizio del sequenziamento.	19
Fase 7: Analisi dei risultati.....	19
Limiti della procedura	19
Prestazioni analitiche.....	20
Ripetibilità	20
Interoperabilità	20
Riproducibilità.....	21
Bibliografia.....	22
Tabella dei simboli	22
Note	22

Precauzioni importanti.

Raccomandazioni generali.

- Utilizzabile per la diagnostica *in vitro*
- Seguire le migliori pratiche di laboratorio in termini di manipolazione dei prodotti PCR (indossare tute e guanti monouso, delimitare zone dedicate per la pre e la post-PCR, utilizzare puntali con filtro).
- Adottare inoltre precauzioni per evitare la contaminazione da nucleasi che potrebbe causare la degradazione di RNA e DNA (utilizzare reagenti e materiali di consumo privi di nucleasi).
- Assicurarsi che i termociclatori siano funzionanti e calibrati in base alle raccomandazioni del produttore.
- È particolarmente importante non sostituire i reagenti non inclusi nel kit, in particolare i tamponi e gli enzimi utilizzati durante le fasi di trascrizione inversa, ligazione e amplificazione PCR. È inoltre necessario rispettare le temperature e i tempi di incubazione, nonché i volumi e le concentrazioni.
- I reagenti **GENEXPATH LymphoSign** sono destinati esclusivamente all'uso con le piattaforme di sequenziamento MiSeq o NextSeq 500/550 di Illumina.
- Le schede di sicurezza sono disponibili nell'area riservata agli utenti
- Se l'utente rileva errori nelle istruzioni per l'uso: inviare un'e-mail a contact@genexpath.com
- Qualsiasi incidente grave che si verifichi in relazione al dispositivo deve essere notificato a noi all'indirizzo contact@genexpath.com.

Icone



Punti importanti e fasi critiche del protocollo che potrebbero compromettere la qualità del risultato.



Fasi in cui il protocollo può essere sospeso.

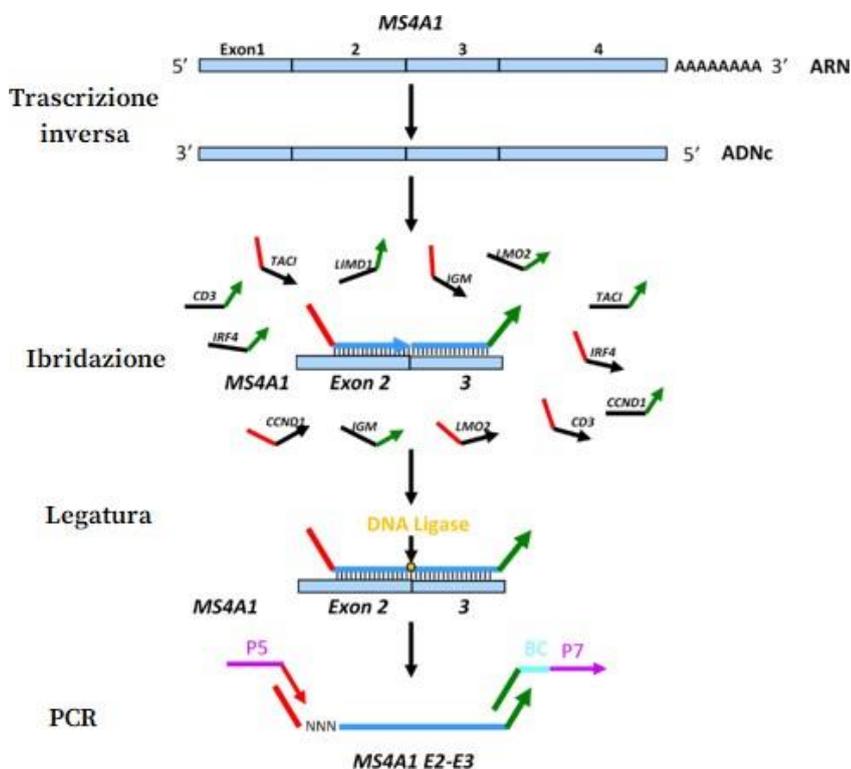
Uso previsto.

Questo protocollo è destinato ai test **GENEXPATH LymphoSign**. Viene utilizzato per preparare le librerie di sequenziamento per i sequenziatori MiSeq o NextSeq 500/550 di Illumina.

I file fastQ generati con questo test contengono dati sui livelli di espressione di oltre 130 geni e marcatori genetici. Vengono analizzati con la piattaforma **GENEXPATH RT-MIS**, che contiene un'applicazione specifica di demultiplexing delle sequenze e un algoritmo di intelligenza artificiale che confronta i profili di espressione ottenuti con quelli dei principali tipi di linfoma non Hodgkin.

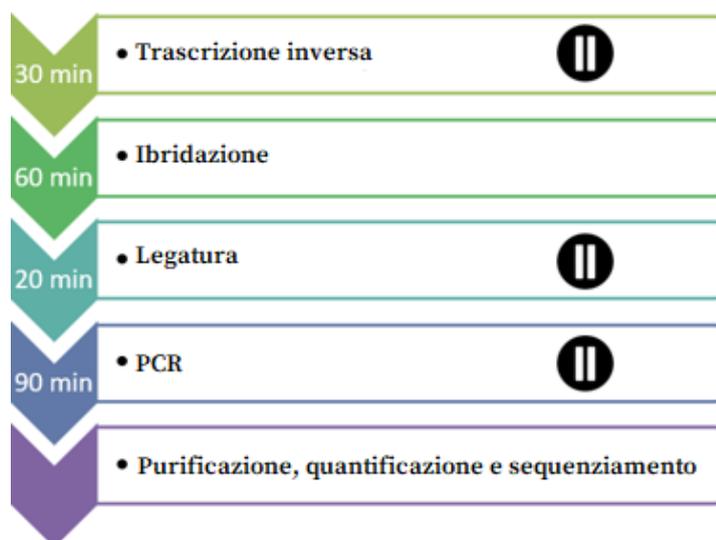
Principio del test.

Il test **GENEXPATH LymphoSign** utilizza un metodo di RT-PCR ligation-dependent (LD-RT-PCR). Questa tecnica semiquantitativa consente di valutare simultaneamente i livelli di espressione di un gran numero di marcatori genetici, come geni, mutazioni somatiche o traslocazioni cromosomiche, utilizzando coppie di sonde oligonucleotidiche specifiche per ciascuno di questi marcatori.



Sono sufficienti quattro passaggi per ottenere librerie da un'estrazione di RNA totale.

- Una fase di trascrizione inversa (RT).
- Una fase di ibridazione di sonde oligonucleotidiche specifiche.
- Una fase di ligazione.
- Una fase di amplificazione PCR.



Non è necessaria alcuna purificazione fino all'ottenimento delle librerie, il che limita le perdite di materiale e garantisce a questa tecnica un'eccellente sensibilità. Inoltre, le sequenze geniche rilevate dalle sonde sono particolarmente corte (tra 40 e 60 basi), il che garantisce un'eccellente robustezza nei confronti della degradazione dell'RNA.

La LD-RT-PCR è quindi un approccio particolarmente appropriato per l'analisi di campioni biologici difficili, come le biopsie di tessuto fissate e incluse in paraffina.

Per ogni campione, sono sufficienti circa 10^5 sequenze per ottenere un profilo di espressione analizzabile, il che consente di analizzare un gran numero di campioni contemporaneamente nella stessa FlowCell di sequenziamento. Per ottimizzare i costi, le librerie **GENEXPATH LymphoSign** possono essere caricate contemporaneamente ad altre librerie di sequenziamento, generate con altri metodi.

Reagenti.

Contenuto del kit di reagenti GENEXPATH LymphoSign.

Miscela di sonde GENEXPATH LymphoSign	GEP-LSPM
Codici a barre GENEXPATH LymphoSign	GEP-BC-xxx
Primer di sequenziamento GENEXPATH LymphoSign	GEP-SP-001

XXX: numero di codice a barre

Una volta ricevuti, questi reagenti devono essere conservati tra -30°C e -15°C.

Sono pronti all'uso e non devono essere diluiti.

La durata di conservazione dei reagenti è di 1 anno.

Riportare alle condizioni di conservazione subito dopo l'uso.

Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Formato dei kit di reagenti venduti e quantità:

	Kit di reagenti - U = numero di analisi			
	8U	16U	24U	48U
Miscela di sonde GEP-LSPM	30 µL	48 µl	54 µl	108 µL
Codici a barre GEP-BC-xxx	8 BC	8 BC	12 BC	24 BC
(da 001 a 032 a seconda del numero di analisi acquistate)	N°001 a 008	N°017 a 024	N°001 a 012	N°009 a 032
BC=codice a barre	5µL/BC	8µL/BC	6µL/BC	6µL/BC
Primer di sequenziamento GEP-SP-001	96 µL	144 µL	180 µL	360 µL

I reagenti vengono forniti in quantità superiori a quelle effettivamente necessarie. Dopo aver completato il numero di analisi ordinate, devono essere scartati. Se viene effettuato un nuovo ordine, verranno forniti nuovi reagenti.

Per un kit di reagenti con più di 8 analisi, ogni codice a barre verrà utilizzato per 2 analisi diverse.

Reagenti non forniti nel kit di reagenti:

Reagenti	Fornitori e referenze
Invitrogen™ M-MLV Reverse Transcriptase (200U/µL)	Fisher Scientific, rif. 10338842
Invitrogen™ dNTPs set (100mM)	Fisher Scientific, rif. 10083252
Invitrogen™ Random Primer	Fisher Scientific, rif. 10646313
SALSA MLPA Buffer (180 µL)	MRC Holland, rif. SMR33
SALSA Ligase Buffer A (360 µL)	MRC Holland, rif. SMR12

SALSA Ligase Buffer B (360 µL)	MRC Holland, rif. SMR13
SALSA Ligase-65 (115 µL)	MRC Holland, rif. SMR20
Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	New England BioLabs, rif. M0494
AMPure XP (Magnetic beads)	Beckman Coulter, rif. A63880
Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Fisher Scientific, rif. 10616763
Sequencing reagents	Illumina
TE buffer (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1 mM EDTA)	Variabile
Etanolo 100%	Variabile
NaOH 1 N	Variabile
Tris Buffer 200 mM pH 7	Variabile
Acqua priva di nucleasi	Variabile

Al momento del ricevimento e tra un utilizzo e l'altro, questi reagenti devono essere conservati secondo le raccomandazioni del fornitore.

Attrezzatura necessaria:

Attrezzatura	Fornitori e referenze
Termociclatore nella zona di pre-PCR	Variabile
Termociclatore nella zona post-PCR	Variabile
Qubit® Fluorometer (or equivalent)	Thermo Fisher Scientific, rif. Q33238
Qubit® Assay Tubes	Fisher Scientific, rif. 12037609
DynaMag™-96 Side Magnet - Magnetic plate (AMPure XP purification)	Thermo Fisher Scientific, rif. 12331D
Piastre e provette per PCR da 200 µL	Variabile

Prima di iniziare.

Campioni biologici.

Il test **GENEXPATH LymphoSign** viene utilizzato per preparare librerie di sequenziamento da estrazioni di RNA totale di biopsie tumorali o linee cellulari umane. Questo test è applicabile solo ai linfomi Non-Hodgkin.

Questi campioni possono essere freschi, congelati o fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).

Per estrarre RNA da tessuti fissati, si consiglia di utilizzare il kit Promega Maxwell® RSC RNA FFPE (Promega, rif. AS1440 e AS4500).

La quantità di RNA da analizzare deve essere compresa tra **50 e 500 ng, in un volume di 2 µL**. Se la concentrazione delle soluzioni da analizzare è troppo alta, l'RNA può essere diluito in acqua priva di nucleasi.

Soluzioni da preparare.

- Esameri casuali (Random Primers, Fisher Scientific, rif. 10646313).
Concentrazione della soluzione di lavoro: 100 µM
- Diluire 100 µL della soluzione iniziale (a 3 µg/µL) aggiungendo 1487 µL di acqua priva di nucleasi.
- Aliquotate e conservate tra -30°C e -15°C.
- dNTPs (dNTPs set, Fisher Scientific, rif. 10083252).
Concentrazione della soluzione di lavoro: 10 mM
- Mescolare le 4 soluzioni madre (250 µL ciascuna) e diluire aggiungendo 1.5 ml di acqua priva di nucleasi.
- Aliquotate e conservate tra -30°C e -15°C.

Programmazione dei termociclatori.

Per limitare i rischi di contaminazione, utilizzare due termociclatori, uno nella zona pre-PCR e uno nella zona post-PCR.

Sono necessari due programmi:

- Il primo è per le prime tre fasi del protocollo: **trascrizione inversa dell'RNA in cDNA, ibridazione delle sonde oligonucleotidiche e ligazione**. Deve essere eseguito sul termociclatore situato nella zona di pre-PCR.
- La seconda viene utilizzata per **amplificare i prodotti di ligazione e incorporare i codici a barre e gli adattatori necessari per il sequenziamento**. Deve essere eseguita sul termociclatore situato nella zona post-PCR.

Programma 1: Pre-PCR.



Poiché i volumi di reazione sono piccoli, assicurarsi che la temperatura del coperchio riscaldato del termociclatore rimanga alta (95°C) in tutte le fasi del programma per evitare l'evaporazione.

Tra le varie fasi del programma sono previste pause a 4°C per aggiungere i reagenti necessari.

Fase 1: trascrizione inversa.

Fase 1a: Denaturazione dell'RNA e ibridazione degli esameri.

- Coperchio riscaldato: 95°C
- 2 Minuti 80°C
- 5 Minuti 37°C
- 4°C infinito

Fase 1b: Trascrizione inversa dell'RNA in cDNA.

- Coperchio riscaldato: 95°C
- 15 Minuti 37°C
- 2 Minuti 98°C
- 4°C infinito

Fase 2: ibridazione delle sonde.

- Coperchio riscaldato: 95°C
- 2 Minuti 95°C
- 60°C infinito (1 ora di ibridazione)

Fase 3: ligazione.

- Coperchio riscaldato: 95°C
- 54°C infinito (distribuzione della miscela di ligazione)
- 15 minuti 54°C
- 5 minuti 98°C
- 4°C infinito

Programma 2: PCR.

- Coperchio riscaldato: 95°C
- 6 minuti 94°C
- 35 x (30 secondi 94°C; 30 secondi 58°C; 30 secondi 72°C)
- 4 minuti 72°C
- 4°C infinito

Protocollo dettagliato.

Fase 1: trascrizione inversa.

Questa fase deve essere completata nella zona pre-PCR.

Reagenti necessari.

- dNTPs 10 mM, Esameri casuali 100 µM, kit M-MLV RT (Reverse transcription buffer 5X, DTT 100 mM, enzima M-MLV RT), estrazione dell'RNA totale da analizzare (da 25 a 250 ng/µL).



Si raccomanda di eseguire l'intera procedura in piastre o provette PCR da 200 μ L.

Fase 1.a: Trascrizione inversa; denaturazione dell'RNA e ibridazione di esameri casuali.

- Scongellare i seguenti reagenti, quindi conservarli in ghiaccio o in un rack di raffreddamento:
 - Reverse transcription buffer 5 x
 - DTT 100 mM
 - dNTPs 10 mM
 - Esameri 100 μ M
- Preparare una miscela per la trascrizione inversa. Per ogni campione, mescolare (per un volume totale di 3.75 μ L per reazione):
 - Reverse transcription buffer 1.25 μ L
 - DTT 0.5 μ L
 - dNTPs 1 μ L
 - Esameri 1 μ L
- Distribuire la miscela in provette PCR da 200 μ L (3.75 μ L per provetta) conservate in ghiaccio o in un rack di raffreddamento:
- Aggiungere 2 μ L di ciascuna soluzione di RNA totale (da 50 a 500 ng) nelle diverse provette.
- Vortex, centrifugare brevemente.
- Posizionare le provette nel termociclatore nella zona di pre-PCR e procedere alla **fase 1.a del programma di pre-PCR** (denaturazione e ibridazione degli esameri).

Fase 1.b: Trascrizione inversa; conversione dell'RNA in cDNA.

- Al termine della fase 1a, quando la temperatura del termociclatore è scesa a 4°C, centrifugare brevemente le provette, quindi metterle in ghiaccio o in un rack di raffreddamento.
- Aggiungere 0.5 μ L di Reverse transcriptase (M-MLV RT) a ciascuna provetta.
- Centrifugare brevemente.
- Rimettere le provette nel termociclatore.
- Controllare la temperatura del coperchio riscaldato (95°C).
- Procedere alla **fase 1.b del programma di pre-PCR** (trascrizione inversa dell'RNA in cDNA).



Procedere quindi direttamente alla fase 2, oppure conservare i prodotti di ligazione tra -30°C e -15°C.

Fase 2: ibridazione delle sonde.

Questa fase deve essere completata nella zona pre-PCR.

Reagenti necessari.

- Miscela di sonde **GENEXPATH LymphoSign** (GEP-LSPM), SALSA MLPA buffer.

Ibridazione delle sonde.

- **Al termine della fase 1b**, quando la temperatura del termociclatore è scesa a 4°C, rimuovere le provette, centrifugarle brevemente e metterle in ghiaccio o in un rack di raffreddamento.
- Scongellare il Salsa MLPA buffer e la miscela di sonde **GENEXPATH LymphoSign**, quindi conservarli in ghiaccio o in un rack di raffreddamento.
- Preparare una miscela di ibridazione. Per ogni campione, mescolare (per un volume totale di 3 µL per reazione):
 - o Salsa MLPA Buffer 1.5 µL
 - o Miscela di sonde **GENEXPATH LymphoSign** 1.5 µL
- Vortex, centrifugare brevemente.
- Aggiungere 3 µL di questa miscela a ciascuna provetta di cDNA.
- Centrifugare brevemente.
- Rimettere le provette nel termociclatore.
- Controllare la temperatura del coperchio riscaldato (95°C).
- Procedere alla **fase 2 del programma di pre-PCR** (ibridazione delle sonde).

Fase 3: Ligazione.

Questa fase deve essere completata nella zona pre-PCR.

Reagenti necessari.

SALSA Ligase Buffer A, SALSA Ligase Buffer B, SALSA Ligase 65, acqua priva di nucleasi.

Ligazione.

- 15 minuti prima della fine della fase 2a, scongelare SALSA Ligase Buffer A e SALSA Ligase Buffer B e conservarli in ghiaccio o in un rack di raffreddamento.
- Posizionare l'enzima Salsa Ligase 65 su ghiaccio o in un rack di raffreddamento.
- Preparare una miscela di ligazione. Per ogni campione, mescolare (per un volume totale di 32 µL per reazione):

- Acqua priva di nucleasi 25 µL
- Salsa Ligasi A buffer 3 µL
- Salsa Ligasi B buffer 3 µL

- Vortex, centrifuga brevemente
 - Salsa ligasi 65 1 µL

- Vortex, centrifugare brevemente.

- Dopo 60 minuti di incubazione, procedere alla **fase 3 del programma di pre-PCR (ligazione)**.

- Abbassare la temperatura del blocco riscaldato a 54°C.

- Aggiungere 32 µL di miscela di ligazione direttamente in ogni provetta, senza rimuoverle dal blocco riscaldato.

- Dopo aver distribuito la miscela, procedere alla fase successiva del programma (15 minuti a 54°C, 5 minuti a 98°C).



Al termine di questa fase, quando la temperatura del blocco PCR scende a 4°C, procedere immediatamente alla fase 4 (amplificazione PCR) o congelare i prodotti di ligazione (tra -30°C e -15°C).



Dopo questa fase, non conservare i prodotti a temperature più elevate (e.g. 4°C o temperatura ambiente) per evitare ligazioni non specifiche che potrebbero derivare dall'attività residua dell'enzima.

Fase 4: Amplificazione e incorporazione di codici a barre e adattatori.

In questa fase, i prodotti di ligazione vengono amplificati mediante PCR grazie a code aggiuntive all'estremità delle sonde. Queste amplificazioni vengono eseguite utilizzando coppie di primer forniti nelle provette di codice a barre **GENEXPATH LymphoSign** (GEP-BC-xxx).

Per consentire l'analisi di più campioni nella stessa FlowCell, il primer 3' della PCR ha un codice a barre molecolare che sarà riconosciuto dall'algoritmo di demultiplexing della piattaforma **GENEXPATH RT-MIS**.

Reagenti necessari.

GENEXPATH LymphoSign barcodes (GEP-BC-xxx), Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, acqua priva di nucleasi.

Amplificazione.

- Preparare una miscela di amplificazione nella zona di pre-PCR. Per ogni campione, miscelare (per un volume totale di 18 µL per reazione):

- Q5® High-Fidelity 2X Master Mix 12.5 µL
- Acqua priva di nucleasi 5.5 µL

- Vortex, centrifugare brevemente.
- Distribuire 18 µL di questa miscela di amplificazione nei diversi pozzetti di una piastra PCR.
- Aggiungere 5 µL di prodotti di ligazione generati al punto 3 in ciascuno dei pozzetti.
- Aggiungere 2 µL di codice a barre **GENEXPATH LymphoSign** in ciascun pozzetto.



Utilizzare codici a barre BEP-BC-xxx diversi per ogni campione analizzato.

- Posizionare la piastra nel termociclatore nella **zona post-PCR**.
- Avviare il **programma 2** (PCR).



Al termine del programma, quando la temperatura del termociclatore scende a 4°C, procedere rapidamente alla fase 5 (purificazione) o congelare i prodotti dell'amplificazione tra -30°C e -15°C.



Non conservare questi prodotti a temperature elevate per un lungo periodo (e.g. 4°C nel termociclatore o a temperatura ambiente).

Fase 5: Purificazione e analisi delle librerie di sequenziamento.

Al termine della fase di amplificazione, le librerie di sequenziamento devono essere purificate per eliminare i primer PCR e i nucleotidi non incorporati. Per questa purificazione si utilizzano le microsfere magnetiche AMPure XP. Le librerie devono essere analizzate mediante fluorimetria prima di essere caricate nel sequenziatore.

Reagenti necessari.

Etanolo 100%, acqua priva di nucleasi, microsfere AMPure XP, tampone TE (10 mM Tris-Acetato pH 8.0, 1 mM EDTA), Qubit® dsDNA HS Assay.

Fase 5.a: Purificazione delle librerie di sequenziamento.



Assicurarsi che le microsfere siano completamente risospese prima dell'uso.

- Purificare 25 µL di prodotti PCR con 45 µL di microsfere AMPure XP (seguendo le raccomandazioni del produttore).
- Eluire i prodotti di PCR purificati in 50 µL di tampone TE.



Dopo la purificazione, le librerie possono essere conservate tra -30°C e -15°C prima del sequenziamento.

Fase 5.b: Saggio delle librerie di sequenziamento:

- Analizzare 10 µL di ciascuna libreria di sequenziamento mediante fluorimetria (kit Qubit dsDNA HS Assay, secondo le raccomandazioni del fornitore).

Fase 6: Diluizione, pooling e sequenziamento delle librerie.

Dopo la purificazione, le librerie **GENEXPATH LymphoSign** devono essere diluite, raggruppate e caricate nel sequenziatore.



Per ottenere risultati ottimali, è necessario leggere almeno 10^5 sequenze per ogni campione.

A differenza della maggior parte delle librerie di sequenziamento classiche, la lettura dei codici a barre molecolari necessari per il demultiplexing delle sequenze **GENEXPATH LymphoSign** avviene durante la lettura¹. Queste sequenze non vengono quindi demultiplexate automaticamente dal sequenziatore e saranno salvate in file fastQ "Undetermined". Il demultiplexing viene eseguito utilizzando l'algoritmo specifico fornito sulla piattaforma **GENEXPATH RT-MIS**.

Reagenti necessari.

Primer di sequenziamento **GENEXPATH LymphoSign** (GEP-SP-001), reagenti di sequenziamento Illumina.

Sequenziamento su un sequenziatore Illumina MiSeq.

Per informazioni dettagliate sulla diluizione e la denaturazione delle librerie, sulla preparazione del primer di sequenziamento, sul foglio di iniezione e sull'avvio del sequenziamento, consultare la guida Illumina al sistema MiSeq.

- **Fase 6.a: Diluizione e pooling delle librerie.**

- Diluire ogni libreria **GENEXPATH LymphoSign** a una concentrazione compresa tra 2 nM e 4 nM, considerando una dimensione media del frammento amplificato di 150 pb.
- Mettere in pool le librerie **GENEXPATH LymphoSign** nel volume equivalente.
- Se altre librerie vengono sequenziate sulla stessa FlowCell, regolare le concentrazioni dei diversi pool, quindi combinarli per ottenere il numero di sequenze desiderato (minimo 10^5 sequenze per ciascuna libreria **GENEXPATH LymphoSign**).

Esempio: Per un pool di 10 librerie **GENEXPATH LymphoSign** che richiedono 1 M di sequenze (10^5 sequenze per ogni libreria), sequenziate con un pool di librerie B alla stessa concentrazione e che richiedono 3 M di sequenze, mettere insieme 1 µL del pool di librerie **GENEXPATH LymphoSign** e 3 µL del pool di librerie B.

- **Fase 6.b: Denaturazione e diluizione del pool di librerie.**

- Denaturare e diluire il pool finale in base alle raccomandazioni contenute nella guida Manuale d'uso **GENEXPATH LymphoSign**

Illumina al sistema MiSeq, per ottenere una concentrazione di carico finale di 8-10 pM.

- **Fase 6.c: Preparazione del primer di sequenziamento.**

- Se il pool di librerie **GENEXPATH LymphoSign** viene sequenziato da solo, aggiungere 3 μL del primer di sequenziamento **GENEXPATH LymphoSign** (GEP-SP-001) a 597 μL di tampone HT1, quindi inserire questi 600 μL nel pozzetto 18 della cartuccia di reagenti MiSeq.
- Se il pool di librerie **GENEXPATH LymphoSign** è caricato con altre librerie sequenziate con primer di sequenziamento Illumina, pipettare l'intero contenuto del pozzetto 12 (circa 600 μL), aggiungere 3 μL di primer di sequenziamento **GENEXPATH LymphoSign**, quindi inserire questa miscela nel pozzetto 18 della cartuccia.

- **Fase 6.d: Preparazione del foglio di iniezione.**

- Se la libreria **GENEXPATH LymphoSign** viene sequenziata da sola, creare il foglio di iniezione per generare file FASTQ con 120 cicli in lettura 1.
- Se le librerie **GENEXPATH LymphoSign** sono combinate con altre librerie di sequenziamento, generare il foglio di iniezione utilizzando i parametri abituali, senza inserire i campioni **GENEXPATH LymphoSign**.
- Specificare l'uso della personalizzazione durante l'impostazione della corsa (con Local Run Manager nella pagina Create Run. In modalità di esecuzione manuale, nella schermata Run Setup).



In tutti i casi, assicurarsi che la lettura 1 sia eseguita con un minimo di 120 cicli e che sia specificato l'uso di un primer di sequenziamento personalizzato.

- In tutti i casi, le sequenze della libreria **GENEXPATH LymphoSign** non saranno demultiplexate dal sequenziatore, ma saranno salvate in un file FastQ "Undetermined", che sarà poi caricato sulla piattaforma **GENEXPATH RT-MIS**.

- **Fase 6.e: Inizio del sequenziamento.**

- Avviare il sequenziamento seguendo la procedura descritta nella guida Illumina al sistema MiSeq.

Sequenziamento su piattaforma Illumina NextSeq 500/550.

Per informazioni dettagliate sulla diluizione e la denaturazione delle librerie, sulla preparazione del primer di sequenziamento, foglio di iniezione e avvio del sequenziamento, consultare la guida Illumina al sistema NextSeq.

- **Fase 6.a: Diluizione e pooling delle librerie.**

- Diluire ogni libreria **GENEXPATH LymphoSign** a una concentrazione compresa tra 0.5nM e 4 nM, considerando una dimensione media del frammento amplificato di 150 pb.



- Mettere in pool le librerie **GENEXPATH LymphoSign** nel volume equivalente.
- Se altre librerie vengono sequenziate sulla stessa FlowCell, regolare le concentrazioni dei diversi pool, quindi combinarli per ottenere il numero di sequenze desiderato (minimo 10^5 sequenze per ciascuna libreria **GENEXPATH LymphoSign**).

Esempio: Per un pool di 10 librerie **GENEXPATH LymphoSign** che richiedono 1 M di sequenze (10^5 sequenze per ogni libreria), sequenziate con un pool di librerie B alla stessa concentrazione e che richiedono 3 M di sequenze, mettere insieme 1 μ L del pool di librerie **GENEXPATH LymphoSign** e 3 μ L del pool di librerie B.

- **Fase 6.b: Denaturazione e diluizione del pool di librerie.**

- Denaturare e diluire il pool finale in base alle raccomandazioni contenute nella guida Illumina al sistema NextSeq, per ottenere una concentrazione di carico finale compresa tra 0.8 pM e 1 pM.

- **Fase 6.c: Preparazione del primer di sequenziamento.**

- Se il pool di librerie **GENEXPATH LymphoSign** viene sequenziato da solo, diluire 6 μ L del primer di sequenziamento **GENEXPATH LymphoSign** in 1994 μ L di tampone HT1, quindi inserire questi 2 mL nel pozzetto 7 della cartuccia di reagenti NextSeq.
- Se il pool di librerie **GENEXPATH LymphoSign** viene combinato con altre librerie sequenziate con i primer di sequenziamento Illumina, pipettare l'intero contenuto (circa 2 mL) del pozzetto 20, aggiungere 6 μ L del primer di sequenziamento GEP-SP, quindi inserire questa miscela nel pozzetto 7 della cartuccia.

- **Fase 6.d: Preparazione del foglio di iniezione.**

- Se la libreria **GENEXPATH LymphoSign** viene sequenziata da sola, creare il foglio di iniezione per generare file FASTQ con 120 cicli in lettura 1.
- Se le librerie **GENEXPATH LymphoSign** sono combinate con altre librerie di sequenziamento, generare il foglio di iniezione utilizzando i parametri abituali, senza inserire i campioni **GENEXPATH LymphoSign**.
- Specificare l'uso della personalizzazione durante l'impostazione della corsa (con Local Run Manager nella pagina Create Run. In modalità di esecuzione manuale, nella schermata Run Setup).



In tutti i casi, assicurarsi che la lettura 1 sia eseguita con un minimo di 120 cicli e che sia specificato l'uso di un primer di sequenziamento personalizzato.

- In tutti i casi, le sequenze della libreria **GENEXPATH LymphoSign** non saranno demultiplexate dal sequenziatore, ma saranno salvate nel file FastQ "Undetermined", che sarà poi caricato sulla piattaforma **GENEXPATH RT-MIS**.

- **Fase 6.e: inizio del sequenziamento.**

- Avviare il sequenziamento seguendo la procedura descritta nella guida Illumina al sistema NextSeq.

Fase 7: analisi dei risultati.

I file di sequenza generati dalla piattaforma di sequenziamento Illumina (MiSeq o NextSeq) in formato FastQ devono essere analizzati con il software **GENEXPATH RT-MIS** disponibile nello spazio clienti al seguente indirizzo: <https://connect.genexpath.com/>.



Per facilitare il download del file FastQ, questo non deve essere decompresso (fastq.gz).

Questo software è una soluzione bioinformatica completa che include diversi algoritmi di elaborazione dei dati. Esegue il demultiplexing per assegnare le sequenze a ciascun campione. Quindi identifica con precisione i marcatori di espressione genica e li quantifica.

Il test **GENEXPATH LymphoSign** si basa sia sulla quantificazione di marcatori quantitativi (espressione genica) sia su marcatori qualitativi (presenza o assenza di mutazioni e traslocazioni cromosomiche).

GENEXPATH RT-MIS include un algoritmo di intelligenza artificiale per aiutare l'utente a utilizzare i suoi risultati. Genera reports concisi e trasparenti che vanno dall'implementazione delle reazioni di sequenziamento all'analisi automatizzata dei risultati del sequenziamento.

GENEXPATH RT-MIS richiede il caricamento dei file di sequenziamento in formato FASTQ e l'elenco dei codici a barre utilizzati durante i test.

GENEXPATH RT-MIS valuta la qualità del sequenziamento di ciascun campione quantificando il numero di letture identificate e il numero di UMI (identificatori molecolari unici) rilevati.

Per ogni campione, **GENEXPATH RT-MIS** genera un grafico per aiutare l'utente ad analizzare i dati. I dati di identificazione per ciascun marcatore e per ciascun campione sono disponibili per il download.

GENEXPATH RT-MIS comprende una guida per l'utente accessibile direttamente online che spiega come utilizzare lo strumento, descrive tutti i risultati generati e spiega la presentazione dei risultati.

La società **GENEXPATH** non memorizza in modo permanente i risultati generati dal software **GENEXPATH RT-MIS**. I dati devono essere scaricati direttamente dopo ogni analisi e salvati dall'utente nel proprio sistema di gestione dei documenti.

Limiti della procedura

- Il test LymphoSign consente di valutare simultaneamente i livelli di espressione di un gran numero di marcatori genetici come geni, mutazioni somatiche o traslocazioni cromosomiche utilizzando sonde specifiche. È destinato alla diagnosi del linfoma non-Hodgkin. I campioni analizzati devono essere biopsie di tessuto FFPE o congelate.

- Le prestazioni dimostrate nel paragrafo "Prestazioni analitiche" sono state convalidate secondo le istruzioni sopra riportate.
- Una bassa quantità di RNA o un campione di bassa qualità possono causare un risultato non interpretabile.
- Il sequenziamento deve essere eseguito con sequenziatori di tecnologia Illumina (Miseq e NextSeq).

Prestazioni analitiche

Ripetibilità

La ripetibilità del test LymphoSign è definita come la sua capacità di quantificare accuratamente ciascuno dei marcatori del test. È stato studiato lo stesso campione analizzato in triplo dalla firma LymphoSign. Per ciascun marcatore, le dispersioni tra i valori misurati e i valori medi attesi sono riportate nel grafico di Bland Altman nella Figura 1. La bassa dispersione delle misurazioni dimostra la capacità di quantificare con precisione ciascun marcatore. La bassa dispersione delle misurazioni dimostra l'elevata ripetibilità della firma LymphoSign per lo stesso campione.

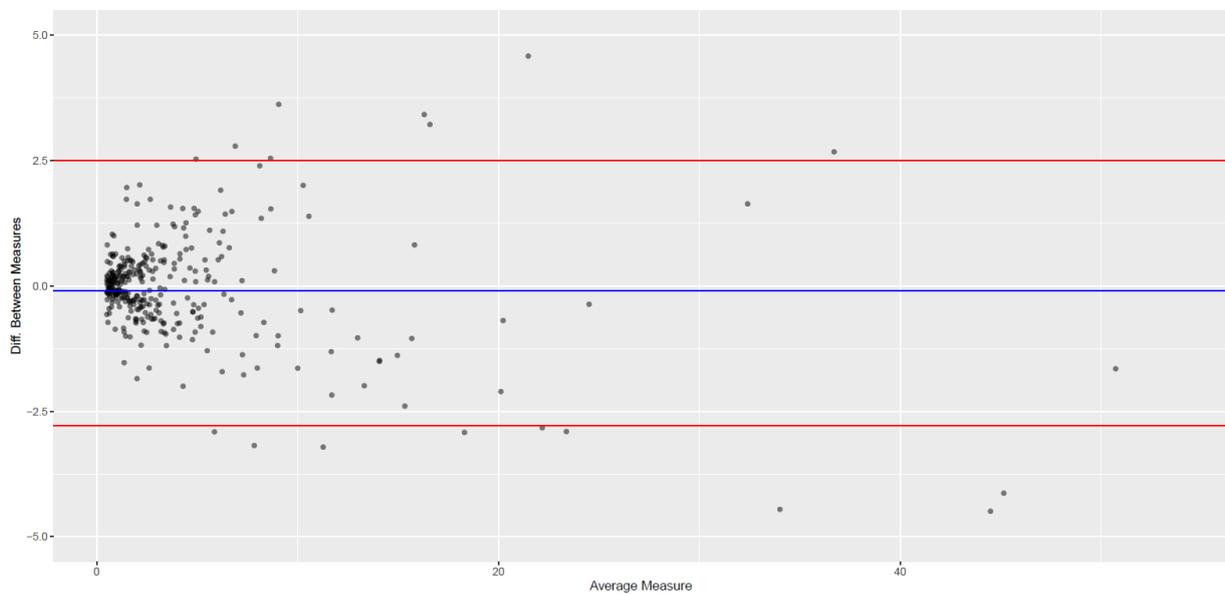


Figura 1: Differenza tra le misurazioni osservate e quelle previste di ciascun marcatore di prova per lo stesso campione. La linea blu rappresenta la deviazione media osservata tra i valori medi di ciascun marcatore e i valori misurati. Le linee rosse rappresentano gli intervalli di confidenza al 95%.

Interoperabilità

Il test Lymphosign è compatibile con la tecnologia di sequenziamento Illumina. Per valutare l'impatto della natura del sequenziatore sui risultati, sono stati analizzati 15 campioni su entrambi i sequenziatori MiSeq e NextSeq. I dati generati sono perfettamente comparabili con un coefficiente di correlazione di Pearson $r=0.99$ ($p < 2.2e^{-16}$) (Figura 2).

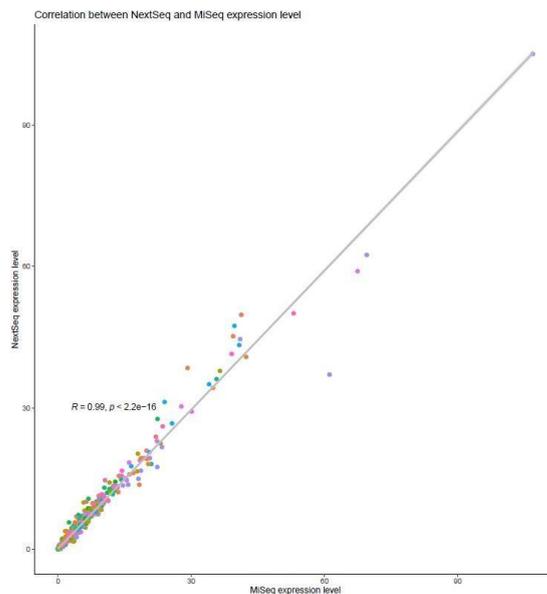


Figura 2: Correlazione tra i livelli di espressione dei marcatori di 15 campioni sequenziati su MiSeq e NextSeq. Il coefficiente e il p-value riportati sono quelli di un test di correlazione lineare di Pearson.

Riproducibilità

La riproducibilità tra due utenti è stata studiata in base ai livelli di espressione di ciascuno dei marcatori del test su 2 campioni (Figura 3). I dati sono perfettamente comparabili con una perfetta riproducibilità della misurazione dell'espressione di ciascuno dei marcatori (Persona: $r \approx 1$, $p < 2.2e^{-16}$).

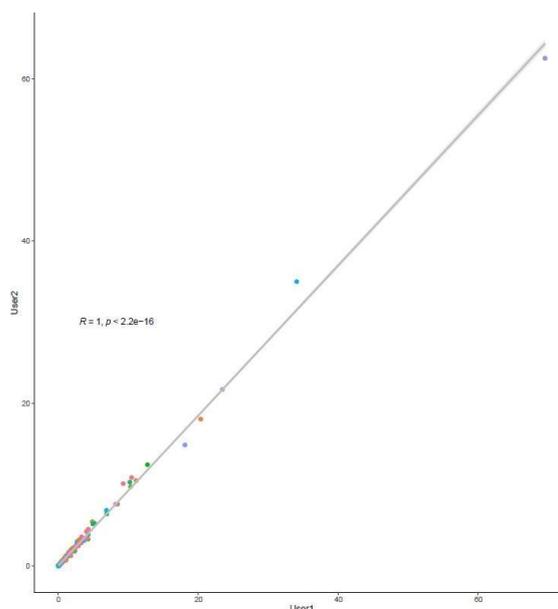


Figura 3: Correlazione tra i livelli di espressione dei marcatori tra due utenti. Il coefficiente e il p-value riportati sono quelli di un test di correlazione lineare di Person.

Bibliografia

[Combining gene expression profiling and machine learning to diagnose B-cell non-Hodgkin lymphoma](#). Bobée V, Drieux F, Marchand V, Sater V, Veresezan L, Picquenot JM, Viailly PJ, Lanic MD, Viennot M, Bohers E, Oberic L, Copie-Bergman C, Molina TJ, Gaulard P, Haioun C, Salles G, Tilly H, Jardin F, Ruminy P. Blood Cancer J. 2020 May 22;10(5):59.

Tabella dei simboli

 produttore	 nome del reagente
 data di produzione	 limite di temperatura
 durata di conservazione	 vedere il manuale di istruzioni
 codice lotto	 Marchio CE conformità europea
	 dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>

Note

I reagenti **GENEXPATH LymphoSign** sono protetti da diritti di proprietà intellettuale e non possono essere modificati, riprodotti, venduti o trasferiti senza l'autorizzazione del produttore.

Le informazioni contenute nel presente documento possono subire variazioni.