

Szanowni Państwo!



Grudniowe wydanie newslettera rozpoczynamy od przeglądu publikacji, w których przedstawiciele polskich grup badawczych przedstawiają wyniki uzyskane techniką sekwencjonowania następnej generacji oraz w oparciu o analizę mikromacierzy. Jest to zestawienie prac z ostatnich kilku miesięcy.

W kolejnym dziale naszego periodyku informujemy o nowościach w ofercie naszych partnerów, jeśli chodzi o panele genowe do sekwencjonowania następnej generacji oraz przedstawiamy nowe aparaty do frakcjonowania prób DNA i białek. Przedstawiamy też listę konferencji i spotkań naukowych planowanych na początku 2015 roku.

Życzymy miłej lektury i twórczej owocnej pracy naukowej w laboratorium w czasie, gdy jesienno-zimowe szarugi panoszą się za oknem. Mamy nadzieję, że umieszczona obok grafika wniesie nieco zimowej atmosfery oraz będzie zapowiedzią radosnych i białych Świąt.

Zespół OpenExome

Publikacje polskich autorów, czyli NGS i macierze w praktyce

Sekwencjonowanie exomu na potrzeby diagnostyki genetycznej pacjenta z ostrym przebiegiem choroby Charcot-Marie-Tooth

"Exome sequencing reveals mutations in MFN2 and GDAP1 in severe Charcot-Marie-Tooth disease." Kostera-Pruszczyk A, Kosinska J, Pollak A, Stawinski P, Walczak A, Wasilewska K, Potulska-Chromik A, Szczudlik P, Kaminska A, Ploski R. *Journal of Peripheral Nervous System*
Źródło: Pubmed, PMID: 25403865

Pogłębiona diagnostyka genetyczna pod kątem BRCA1/2 pacjentek cierpiących na nowotwór jajników

"Mutational analysis of BRCA1/2 in a group of 134 consecutive ovarian cancer patients. Novel and recurrent BRCA1/2 alterations detected by next generation sequencing." Ratajska M, Krygier M, Stukan M, Kuźniacka A, Koczkowska M, Dudziak M, Sniadecki M, Dębniak J, Wydra D, Brozek I, Biernat W, Borg A, Limon J, Wasąg B. *Journal of Applied Genetics*.
Źródło: Pubmed, PMID: 25366421

Analiza metylacji DNA genów uczestniczących w szlaku ErbB u pacjentów z nowotworem jelita grubego

"Aberrant methylation of ERBB pathway genes in sporadic colorectal cancer." Szmida E, Karpiński P, Leszczyński P, Sedziak T, Kielan W, Ostasiewicz P, Sasiadek MM. *Journal of Applied Genetics*.
Źródło: Pubmed, PMID: 25366420

Wydarzenia

[Sukcesy publikacyjne użytkowników produktów Illumina i Multiplicom](#)

[Illumina zwycięzca listy MIT Technological Review](#)

[Kalendarz wydarzeń w 2015](#)

Produkty - ważne informacje

[Przewodnik użytkownika NGS](#)

[TruSeq RNA Access Library Prep](#)

[PED MASTR Multiplicom](#)

[MID for Ion Multiplicom](#)

[PippinHT](#)

[SageELF](#)

NGS w służbie weterynarii i praca nad optymalną i uniwersalną szczepionką przeciw klasycznemu pomorowi świń

"Rovac is the possible ancestor of the Russian lapinized vaccines LK-VNIVViM and CS strains but not the Chinese strain (C-strain) vaccine against classical swine fever."
Zhou W, Gao S, Podgórska K, Stadejek T, Qiu HJ, Yin H, Drew T, Liu L. *Vaccine*.
Źródło: Pubmed, PMID: 25306909

Ocena genomu buhajów w celu doboru markerów charakterystycznych dla najlepszych dawców nasienia

"Genome-wide association study for sperm concentration in holstein-friesian bulls."
Hering D, Olenski K, Kaminski S. *Reproduction in Domestic Animals*
Źródło: Pubmed, PMID: 25465359

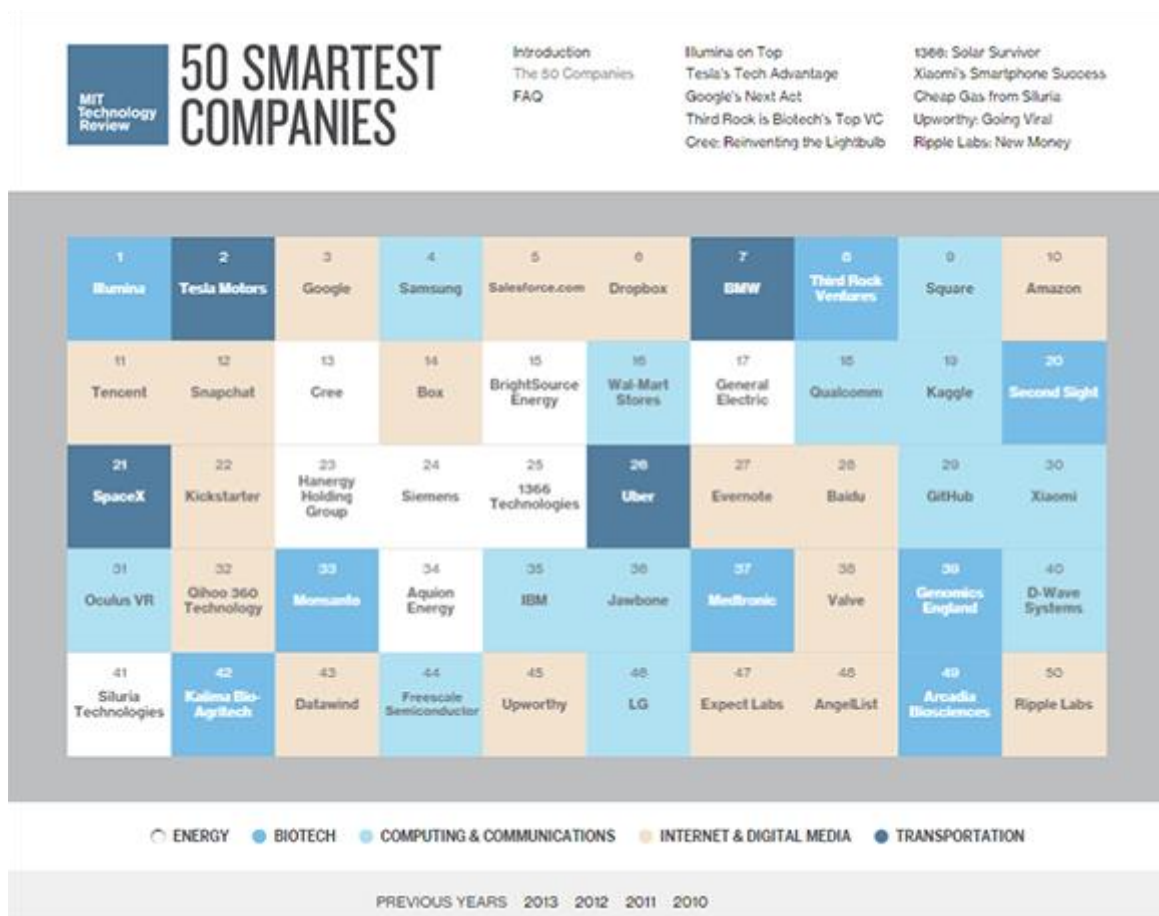
Opisanie sekwencji *Pseudomonas* sp. szczep P482 izolowanego ze strefy korzeniowej pomidora

"Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain P482, a Tomato Rhizosphere Isolate with Broad-Spectrum Antimicrobial Activity."
Krzyzanowska D, Ossowicki A, Jafra S. *Genome Announcements*.
Źródło: Pubmed, PMID: 24970823

Czy wiecie, że...

ILLUMINA ZOSTAŁA LIDEREM LISTY „50 SMARTEST COMPANIES 2014” WG MIT TECHNOLOGY REVIEW

Od kilku lat redaktorzy i wydawcy przeglądu MIT Technology Review sporządzają listę 50 firm, które ich zdaniem są najbardziej innowacyjne i które wprowadziły na rynek przełomowe produkty. Lista obejmuje przedsiębiorstwa z rozmaitych sektorów, takich jak rozwiązania IT, transport, energia czy biotechnologia. W rankingu na rok 2014 pierwsze miejsce zajmuje koncern Illumina, który wyprzedził w swojej kategorii m.in. firmę Monsanto. Warto dodać, że w tym roku do czołowej pięćdziesiątki innowacyjnych firm nie został zaliczony, żaden inny producent platform NGS.



Źródło: MIT Technology Review

ILLUMINA

Nowy przewodnik użytkownika NGS – praktyczny przegląd szlaków przygotowania bibliotek i sekwenatorów

Polecamy korzystanie z najnowszej broszury Illumina, która zawiera szereg konkretnych informacji o odczynnikach, urządzeniach i rozwiązaniach bioinformatycznych stosowanych w czasie różnego typu analiz NGS. Bazując na tym dokumencie, nawet początkujący użytkownik NGS będzie w stanie skutecznie zaplanować kolejne etapy swojego doświadczenia i sporządzić listę produktów potrzebnych do wykonania danej reakcji NGS.

Dokument podzielony został na trzy rozdziały: „Applications”, „Instruments” oraz „Analysis tools”. Najobszerniejszy jest pierwszy rozdział, w którym kolejno przedstawiono kilkanaście szlaków przygotowania bibliotek (od bibliotek całotranskryptomowych, bibliotek eksomowych poprzez biblioteki mRNA i miRNA, aż po biblioteki do celowanego sekwencjonowania, czyli tzw. panele genowe). Autorzy broszury wskazali odpowiednie zestawy odczynników wraz z informacją o ilości indeksów w nich uwzględnionych oraz ilości prób, z których można przygotować bibliotekę. Druga część przewodnika to charakterystyka dostępnych platform do sekwencjonowania (MiSeq, NextSeq 500, HiSeq 2500, HiSeq X-Ten oraz automatycznej stacji do przygotowania bibliotek NeoPrep). W ostatniej części tego dokumentu znajdziecie Państwo porównanie cech BaseSpace i BaseSpace On Site, a także opisy programów i aplikacji, które warto wykorzystać na etapie opracowania wyników reakcji sekwencjonowania.

[Przewodnik użytkownika NGS](#)

TruSeq RNA Access Library Prep

Pracownikom zmagającym się na co dzień z próbkami, z których trudno pozyskać dobrej jakości RNA (np. preparaty z tkanek przygotowane metodą FFPE lub inne próby biologiczne uniemożliwiające pozyskanie RNA o wysokim parametrze RIN) polecamy zestaw odczynników do przygotowania bibliotek o nazwie TruSeq RNA Access Library Prep. Produkt ten pozwala na przygotowanie biblioteki do RNA-Seq z zaledwie 10 ng dobrej jakości RNA lub 20 ng degradującego RNA (izolowanego z tzw. „trudnych prób”). Zatem niosąca wiarygodne informacje analiza transkryptomu na bazie niskiej jakości wyjściowej próbki RNA jest obecnie wykonalna. Dostępne są dwa typy zestawów TruSeq Access Library Prep różniące się doбором indeksów. Każdy z zestawów pozwala na przygotowanie do 48 prób/bibliotek RNA-Seq.

Szczegółowy opis tego szlaku przygotowania biblioteki RNA-Seq dostępny jest na stronie internetowej producenta: <http://products.illumina.com/products/truseq-rna-access-kit.html>.

<http://products.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet-truseq-rna-access.pdf>

Multiplicom

PED MASTR™ Plus - zestaw do identyfikacji mutacji związanych z pierwotnie elektrycznymi chorobami serca (Primary Electrical Disorders - PED) predysponującymi do arytmii komorowej

Jesień to czas premiery kolejnego zestawu z serii MASTR™ firmy Multiplicom. Nasz belgijski partner wprowadził na rynek zestaw służący do wzbogacania bibliotek do sekwencjonowania na platformach NGS - PED MASTR™ Plus. Zestaw służy do molekularnej identyfikacji wszystkich mutacji w 51 genach ([lista 51 genów](#)), leżących u podstaw PED.

Test Multiplicom PED MASTR™ Plus jest gotowym do użycia zestawem, zapewniającym dobrą wydajność wzbogacania interesujących genów przy minimalnym czasie pracy manualnej. Opakowanie zawiera wszystkie odczynniki niezbędne do wykonania multipleksowej amplifikacji 952 amplikonów (300-440 bp) w 11 reakcjach PCR, dającej pełne pokrycie wszystkich sekwencji kodujących. Produkt jest przeznaczony wyłącznie do badań naukowych (RUO).

Protokół MASTR "Plus" jest uproszczeniem znanego protokołu MASTR. Po pierwszym etapie reakcji PCR (11 multipleksowych reakcji PCR na próbkę), indywidualne próby miesza się według wstępnie zdefiniowanego w protokole schematu. Otrzymana biblioteka amplikonowa jest następnie oczyszczana z resztkowych małych fragmentów DNA, a następnie rozcieńczana przed drugim etapem PCR: Universal PCR. Łączenie multipleksowych produktów PCR przed etapem Universal PCR pozwala na istotne skrócenie etapów pracy manualnej.

Test jest kompatybilny z większością obecnych na rynku sekwenatorów nowej generacji. Więcej informacji na stronie producenta: <http://www.multiplicom.com/products/ped-mastr-plus>.

MID for Ion PGM Systems

Nowością w ofercie Multiplicom są również długo oczekiwane zestawy umożliwiające przyłączanie adapterów i indeksów do próbek wzbogacanych za pomocą paneli MASTR™, sekwencjonowanych w aparatach Ion PGM™ System (Ion Torrent/Thermo Fisher Scientific).

W drugiej reakcji PCR (np. Universal PCR), amplikony MASTR są oznakowane w wyniku inkorporacji indeksów (MID) przy jednoczesnym dobudowaniu adapterów A oraz P1 wymaganych do sekwencjonowania w systemie Ion PGM™ System. Dla każdego miksu PCR przeprowadzane są dwie oddzielne reakcje, dzięki czemu możliwe jest dwukierunkowe sekwencjonowanie amplikonów.

Zawartość:

- każdy zestaw zawiera 8 określonych mieszanek starterów MID
- odczynniki do "Universal PCR": 24 podwójne reakcje PCR dla każdego indeksu MID (1-8), w sumie 192 reakcje
- odczynniki do barwienia GeneScan, w sumie 192 reakcje

Produkt jest przeznaczony wyłącznie do celów badawczych (RUO).

Zestawy MID for Ion PGM™ System zostały zweryfikowane pod kątem amplifikacji i pokrycia genomowego w połączeniu z zestawami CFTR MASTR Dx, FMF MASTR Dx, EGFR 18-24 MASTR i Somatic 1 MASTR. Wyniki sekwencjonowania z określeniem wariantów dla wymienionych konfiguracji wymagają walidacji. Stosowanie MID for Ion PGM™ System wraz z którymkolwiek zestawem MASTR przeznaczonym do diagnostyki in vitro* (MASTR Dx, CE-IVD) wymaga walidacji całego protokołu.

* Użycie zestawu BRCA MASTR Dx z systemem Ion PGM™, wymaga zastosowania dodatkowego etapu Multiplicom Short Read Amplification, następującego po zakończeniu etapów przygotowania biblioteki zgodnie z protokołem Life Technologies (Ion PGM™ DNA Sequencing Decision Tree). Protokół taki wymaga walidacji do celów diagnostycznych (<http://www.multiplicom.com/products/mid-ion-pgm-system>).

SageScience

Pippin HT

PippinHT to elektroforetyczny system selekcji fragmentów DNA adresowany do pracowni, w których prowadzone są reakcje sekwencjonowania następnej generacji na skalę średnio- lub wysokoprzepustową. Aparat opracowano i optymalizowano w oparciu o doskonale już sprawdzoną technologię systemów z grupy Pippin, modyfikując konstrukcję urządzenia oraz zmieniając układ kaset żelowych. System PippinHT pozwala na jednoczesny rozdział do 24 prób DNA. Zależnie od potrzeb i wyboru użytkownika możliwe jest prowadzenie elektroforezy z wykorzystaniem jednej lub dwóch 12-dołkowych kaset żelowych. Dostępne obecnie rodzaje kaset żelowych pozwalają na rozdział elektroforetyczny DNA z zakresu 90 pz – 2 000 pz.

Zalety systemu PippinHT:

- usprawnienie procedury i zapewnienie powtarzalności sposobu przygotowania bibliotek do analiz NGS
- oszczędność czasu (zależnie od obranych parametrów frakcjonowanie 24 prób trwa od 30 do 90 minut)
- minimalizacja błędów wynikających z subiektywnej oceny badacza. Wybór frakcji fragmentów DNA o określonym przedziale długości odbywa się sposobem automatyczny dla całej puli prób poddanych elektroforezie

<http://www.sagescience.com/products/pippinht>

ELFSystem

System SageELF to urządzenie do elektroforezy preparatywnej pozwalające na frakcjonowanie próbek DNA lub próbek białkowych pod względem masy makromolekuł. Urządzenie to pozwala na uzyskanie do 12 frakcji z jednej próbki. Zasilacz systemu ELF umożliwia wykorzystanie techniki elektroforezy pulsowej (PFGE) zapewniając tym samym efektywny rozdział dużych cząsteczek DNA.

Parametry dla każdej z frakcji definiowane są przez użytkownika z poziomu oprogramowania sterującego Systemem ELF. Kolejne frakcje z rozdzielanej próbki pozyskiwane są do buforu (bez konieczności wycinania fragmentu żelu i eluowania materiału z wycinka żelu). Rozdział elektroforetyczny i frakcjonowanie próbki odbywa się w kasetach żelowych, które dobierane są zależnie od składu rozdzielanej próbki oraz od tego jakie frakcje winny być pozyskane. W jednej kasecie żelowej prowadzone jest frakcjonowanie pojedynczej próbki. System ELF pozwala na równoczesną elektroforezę preparatywną w dwóch kasetach żelowych.

Zalety systemu SageELF:

- pozwala na precyzyjną analizę złożonych próbek
- umożliwia jednoczesne przygotowanie bibliotek DNA różniących się wielkością insertów
- w przypadku prób unikalnych pozwala na pozyskanie frakcji DNA do bieżących analiz oraz na potrzeby przyszłych projektów badawczych

Zastosowania:

- analizy proteomiczne, w tym oznaczenia metodą spektrometrii masowej
- przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania w trybie sparowanych końców
- identyfikacja wariantów splajsingowych

<http://www.sagescience.com/products/sageelf>

Przypominamy o terminach zbliżających się ...

... seminariów on-line (tzw. webinars) prowadzonych przez specjalistów aplikacyjnych firmy Illumina

Illumina prowadzi szkolenia on-line dotyczące prowadzenia badań z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania następnej generacji oraz mikromacierzy.

W tym miesiącu eksperci zespołu Illumina Technical Support omówią następujące tematy:

- optymalizacja gęstości klastrów w systemach NGS
- sekwencjonowanie bibliotek amplikonowych w sekwenatorze MiSeq
- analiza danych uzyskanych w reakcjach RNA-Seq

Uczestnictwo w seminariach (webinarach) Illumina wymaga dostępu do internetu oraz aktywnego połączenia telefonicznego (połączenie bezpłatne). Aby wziąć udział w danym seminarium należy dokonać uprzedniej rejestracji drogą elektroniczną. Kompletną listę grudniowych seminariów oraz linki rejestracyjne znajdziecie Państwo na stronach WWW naszej firmy oraz Illumina: <http://support.illumina.com/training/sequencing.ilmn>.

Seminaria on-line, które cieszyły się szczególnym zainteresowaniem są dostępne w formie zarejestrowanych nagrań na stronie internetowej Illumina:
<http://support.illumina.com/training/webinars/sequencing/sequencing-archive.html>
<http://support.illumina.com/training/webinars/array/array-archive.html>

... konferencji i sympozjów w Polsce:

**7th International Conference of Contemporary Oncology
Personalized Cancer Medicine and Big Data Analysis**
25-27.03.2015. Poznań
[link](#)

RECOMB 2015 - 19th Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology
12-15.04.2015. Warszawa
[link](#)

... konferencji zagranicznych:

International Plant and Animal Genome XXIII (PAG)
10-14.01.2015. San Diego, CA, USA
[link](#)

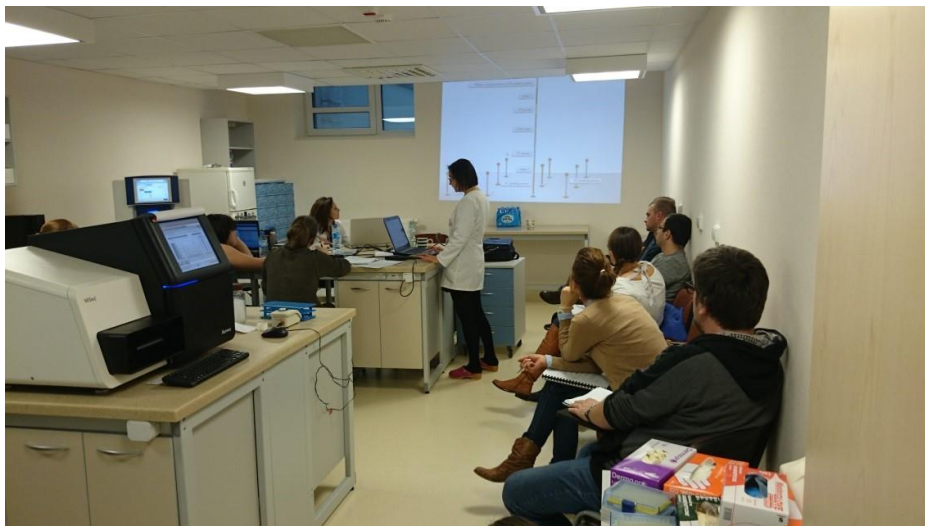
Genomic Medicine for Clinicians
28-30.01.2015. Hinxton, UK
[link](#)

**qPCR & NGS 2015 Event. Advanced Molecular Diagnostics for Biomarker Discovery
7th international qPCR & NGS Event. Symposium, Industrial Exhibition & Application Workshops**
23-27.03.2015. Weihenstephan, Germany
[link](#)

Podsumowanie seminariów i szkoleń Analityk i OpenExome w 2014

W mijającym roku dołożyliśmy starań, aby odpowiedzieć na Państwa prośby dotyczące tematycznych seminariów, konferencji oraz szkoleń praktycznych. Nasze firmy zdołały zorganizować dwie kolejne ogólnopolskie trasy "road-show": w kwietniu, poświęconą sekwencjonowaniu następnej generacji oraz w czerwcu – dotyczącą genomiki pojedynczych komórek. Dodatkowo odbyła się mini-konferencja na temat badań genetycznych związanych z diagnostyką preimplantacyjną i prenatalną. Wielokrotnie mieliśmy też przyjemność gościć w salach seminaryjnych Państwa Uczelni i Instytutów, gdzie na Państwa zaproszenie opowiadaliśmy o określonych rozwiązaniach metodycznych.

Z ogromną radością i zdumieniem obserwowaliśmy jak dużą popularnością cieszyły się dwie pierwsze edycje praktycznych warsztatów z przygotowania bibliotek NGS. Serdecznie dziękujemy za liczny udział w szkoleniach i seminariach. I zapewniamy, że kalendarz wydarzeń organizowanych przez Analityk i OpenExome będzie wypełniony ciekawymi spotkaniami.



Komentarze i opinie czytelników newslettera

Drodzy Czytelnicy! Będziemy wdzięczni, jeśli zechcecie podzielić się z nami swoimi opiniami dotyczącymi newslettera OpenExome. Jeśli nasuwają się Państwu komentarze na temat treści kolejnych wydań newslettera lub sugestie tematów, które warto poruszyć w tym periodyku, prosimy o przesyłanie ich na adres: community@openexome.pl.