

DATA SHEET

**HT - MSI+****Human Target - Microsatellite Instability Plus**

Kit multiplex para detecção de MSI por análise de fragmento.

Cat. Nº.	Quantidade
<input type="checkbox"/> PCK-400XS	50 reações
<input checked="" type="checkbox"/> PCK-400S	100 reações
<input type="checkbox"/> PCK-400M	200 reações
<input type="checkbox"/> PCK-400L	500 reações

Transporte:

Transportado em gelo reciclável 2 - 8 °C

Condições de Armazenagem:

Armazene a -20 °C (armazenar em ambiente escuro e evitar ciclos de congelamento e descongelamento).

Forma:

Líquida

Validade:

12 meses

Descrição:

O HT-MSI+ foi desenvolvido para a detecção da instabilidade de microsatélite (MSI) por meio da metodologia de PCR multiplex fluorescente seguido da separação de fragmentos por eletroforese capilar. O kit foi otimizado para utilização em amostras de DNA de células tumorais providas tanto de tecido fresco (ex. sangue), congelado ou tecido fixado em formol e incluído em parafina (FFPE). O teste analisa um painel expandido de 6 marcadores microsatélite mononucleotídicos quasimonomórficos, que inclui os cinco marcadores padrão NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, BAT-26 (Goel et al., 2010) e ainda o microsatélite contido no gene HSP110 (repetição T17 no íntron 8), cuja alteração foi diretamente associada a cânceres colorretais MSI positivos (Dorard et al., 2011; Berardinelli et al., 2018). Esses marcadores foram especialmente selecionados por suas características de alta especificidade e sensibilidade em amostras MSI positivas. O marcador HSP110 complementa o painel possibilitando uma melhor definição de casos discordantes nas amostras que contém perfis diferentes devido à deficiência no reparo de inconsistências no DNA replicado. Além disso, eles permitem a análise de MSI sem a necessidade de amostra germinativa referência por meio da determinação do intervalo de variação quasi-monomórfica (QMVR) para cada marcador (Campanella et al, 2014 e Berardinelli et al, 2018). Os 6 marcadores são amplificados em uma única reação hexaplex que utiliza uma DNA polimerase hot start de alta especificidade em uma formulação de tampão especialmente desenvolvida para amostras de origem complexa.

A separação e análise do tamanho dos fragmentos fluorescentes amplificados podem ser realizadas em qualquer sequenciador automático que possui filtros na região do azul, verde, amarelo e vermelho.

Marcadores e sondas utilizados no kit:

Marcador	Fluoróforo	Cor	QMVR para MSI (bps)*
NR-21	6 - FAM	Azul	101-107
BAT-26			174-180
NR-27	JOE	Verde	82-88
BAT-25			142-148
NR-24	Atto550	Amarelo	124-129
HSP-110	Atto565	Vermelho	147-150

*QMVR: o intervalo de variação estabelecido para este conjunto de marcadores para a população brasileira a partir da média do tamanho dos alelos de cada marcador com um intervalo de mais ou menos três nucleotídeos (Goel A, et al., 2010; Campanella et al., 2014 e Berardinelli et al., 2018).

Conteúdo:

Componente	Tampa	Formato	Volume
HT-MSI+ Multiplex MasterMix (2x) Taq DNA Polimerase <i>Hot Start</i> , dATP, dCTP, dGTP, dTTP, tampão de reação com KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgCl ₂ , e estabilizadores.	Roxa	XS	250 µl
		S	500 µl
		M	1.000 µl
		L	2 x 1.250
HT-MSI+ Primer Mix Hexaplex (10x) Solução com 6 pares de primers.	Âmbar	XS	50 µl
		S	100 µl
		M	200 µl
		L	500 µl
HT-MSI+ Controle Positivo PCR Solução controle positivo para amplificação e <u>negativa para MSI</u> .	Amarela	XS	5 µl
		S	10 µl
		M	20 µl
		L	50 µl
HT-MSI+ Água Livre de Nucleases	Branca	XS	200 µl
		S	400 µl
		M	800 µl
		L	2.000 µl

DATA SHEET

**HT - MSI+****Human Target - Microsatellite Instability Plus**

Kit multiplex para detecção de MSI por análise de fragmento.

*** NÃO INCLUSO NO KIT**

- Marcador interno utilizado para a calibração do tamanho dos fragmentos
- Formamida

1. Preparo da reação de PCR**Materiais necessários ao usuário:**

- Termociclador
- Micro-centrífuga
- Microtubos estéreis de 0,2 ml, 1,5 ml e placa de 96 poços
- Ponteiras com filtro

A Master Mix HT-MSI+ foi otimizada para amplificar DNA genômico a partir da concentração de 50 ng em um volume de reação de 10 µl utilizando o protocolo apresentado abaixo. Ainda assim, devido às diferenças na origem das amostras e protocolo de extração e purificação utilizado para a obtenção do DNA, o ajuste da quantidade de DNA molde é aconselhável para otimizar o rendimento da reação e evitar artefatos da técnica de PCR. O excesso de DNA molde pode causar alteração no tamanho dos picos obtidos excedendo a faixa de detecção do equipamento. Da mesma maneira, uma quantidade insuficiente de DNA molde pode resultar em baixo rendimento da reação de PCR e os picos obtidos podem ficar abaixo da faixa de detecção. A quantificação precisa do DNA é recomendada.

NOTA: é fortemente recomendado o uso de luvas e ponteiras com filtro para prevenir a formação de aerossóis e contaminação cruzada. Todos os materiais pré e pós amplificação devem permanecer em salas separadas e o preparo da reação de PCR deve ser realizado em fluxo laminar com pipetas e equipamentos dedicados exclusivamente para tal.

- Descongele o HT-MSI+ Mix, o MSI Primer Mix e a água livre de nucleases.
- Misture os reagentes utilizando um vortex por 5-10 s antes do uso para ressuspender possíveis precipitados formados no fundo do tubo da Mix HT-MSI+.
- Em gelo, prepare uma quantidade de reação master suficiente para o número de amostras a serem analisadas, incluindo o controle positivo e negativo de PCR e mais uma reação para compensar variações na pipetagem, conforme as tabelas a seguir.

Exemplo de cálculo de número de reações para o preparo da solução master:

Número de Amostras para análise	9
Reação Controle Positivo para PCR	1
Reação Controle Negativo para PCR	1
Número total de reações a ser considerado para o preparo da solução master	12

Preparo da solução master:

Componentes	Volume por reação	Volume para 12 reações
HT-MSI+ Multiplex Master Mix (2x)	5 µl	60 µl
HT-MSI+ Primer Mix Hexaplex (10x)	1 µl	12 µl
HT-MSI+ Água Livre de Nucleases	3 µl	36 µl
Volume Total da Reação Master	9 µl	108 µl

- Para cada amostra de controle positivo e negativo pipete 9 µl da reação master em microtubos de 0,2 ml ou em microplacas de 96 poços devidamente identificadas.
- Em cada tubo ou poço, adicione 1 µl da amostra de DNA molde (50 ng/µl).
- Adicione 1 µl do **HT-MSI+ Controle Positivo PCR** no tubo ou poço do **controle positivo**.
- Adicione 1 µl do **HT-MSI+ Água Livre de Nucleases** no tubo ou poço do **controle negativo**.
- É recomendado centrifugar os tubos ou placa por 3-5 s antes de prosseguir com a PCR.

DATA SHEET

**HT - MSI+****Human Target - Microsatellite Instability Plus**

Kit multiplex para detecção de MSI por análise de fragmento.

NOTA: Armazene o DNA molde em água livre de nucleases ou tampão TE (10mM Tris HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA). Se o tampão TE não estiver com o pH 8.0 ou conter concentrações de EDTA maiores que 0,1 mM, o volume final de DNA não deve exceder 20% do volume final da reação. A eficiência e qualidade da amplificação pode sofrer alterações por variações de pH (devido ao Tris-HCl), concentração de $MgCl_2$, ou demais inibidores da reação de PCR que possivelmente estejam na reação oriundos da fonte e da metodologia de extração de DNA utilizados.

2. Ciclo de Amplificação

- Insira os microtubos ou placas de 96 poços no termociclador.
- Selecione e inicie o protocolo recomendado abaixo.

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclo
Desnaturação inicial	95 °C	15 min	1
Desnaturação	95 °C	30 seg	35 a 40
Anelamento	55 °C	90 seg	
Extensão	72 °C	30 seg	
Extensão final	72 °C	40 seg	1
Final	4 °C	∞	1

- Finalizada a amplificação, armazene as amostras a - 20 °C protegidas da luz.

3. Preparo da reação de análise dos fragmentos amplificados

- Diluir 1 µl do produto de PCR obtido na etapa 1 em 49 - 99 µl de água ultrapura livre de nucleases dependendo da sensibilidade do sequenciador a ser utilizado.
- Transferir 1 µl do produto diluído em microplaca de sequenciamento (ABI)
- Adicionar 8,7 µl de formamida + 0,3 µl do marcador interno do tamanho de fragmentos.

NOTA: recomendamos a utilização da formamida Hi-Di™ Formamide (Thermo #4311320) e do marcador GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard v2.0 (Thermo #4408399).

- Incubar em termociclador a 95 °C por 5 min para desnaturação.

- Proceder com a análise de fragmento por eletroforese capilar em um sequenciador automático que possui filtros na região do azul, verde, amarelo e vermelho utilizando o protocolo padrão do equipamento.

4. Interpretação de dados:

A reação de amplificação multiplex produz fragmentos das regiões de microssatélites que, depois de separados por eletroforese capilar, são visualizados em eletroferogramas em forma de uma distribuição de picos fluorescentes dentro de uma faixa de tamanhos específicos que correspondem ao comprimento em pares de base de cada um dos 6 marcadores mononucleotídicos analisados nesse kit. Os picos principais de maior sinal fluorescente determinam o tamanho do marcador mononucleotídico, que dependendo do indivíduo, produzirá um pico principal de alelo quando homocigoto (exemplo de homocigoto no painel A, marcador NR-21). Além disso, a amplificação de marcadores microssatélites geralmente gera picos de artefatos denominados picos *stutter*. Os eletroferogramas dos marcadores mononucleotídicos mostram vários picos *stutter* menos intensos em intervalos de 1 pb a partir do pico do alelo mais proeminente ou verdadeiro. A presença de MSI par um marcador é reconhecida como alterações nos comprimentos do microssatélite devido à deleção ou inserção de unidades de repetição, que produz um novo alelo de comprimento diferente do DNA avaliado. Os marcadores mononucleotídicos incluídos neste painel são quasi-monomórficos, de modo que a variação do tamanho dos marcadores dos indivíduos é pequena para o mesmo alelo de um determinado marcador. A presença de picos proeminentes **fora do QMVR** de um dado marcador **confere instabilidade nesse marcador**.

Geralmente, as amostras nas quais ≥ 2 dos marcadores microssatélites estão alterados são classificados como **MSI-positivo, MSI⁺** (painel B). Amostras com ≤ 1 dos marcadores alterados podem ser classificados como **MSI-negativo, MSI⁻** (painel A). No entanto, a ocorrência de até um marcador alterado em células com proficiência em reparo MMR é incomum, e a repetição do ensaio MSI ou execução de métodos adicionais de análise podem ser necessárias para classificar com precisão as amostras.

DATA SHEET

**HT - MSI+****Human Target - Microsatellite Instability Plus**

Kit multiplex para detecção de MSI por análise de fragmento.

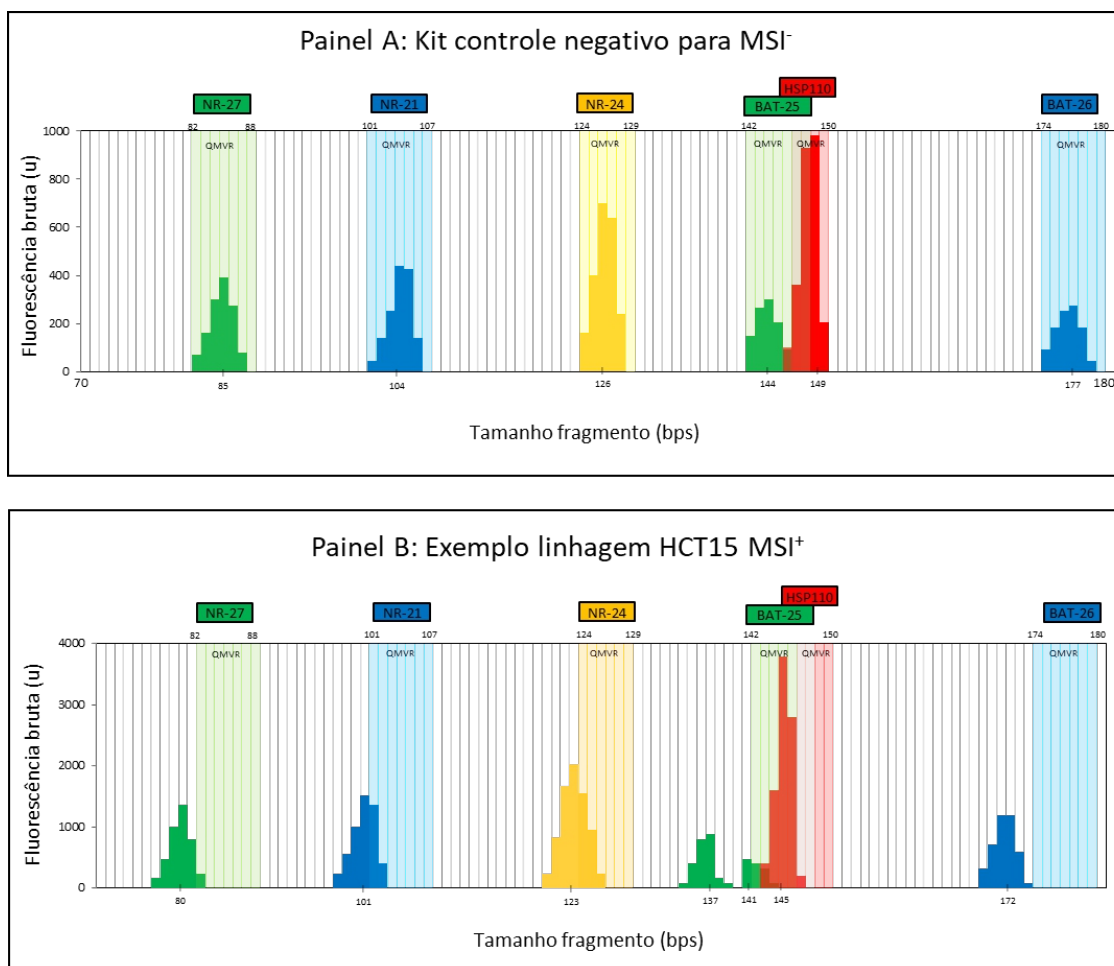
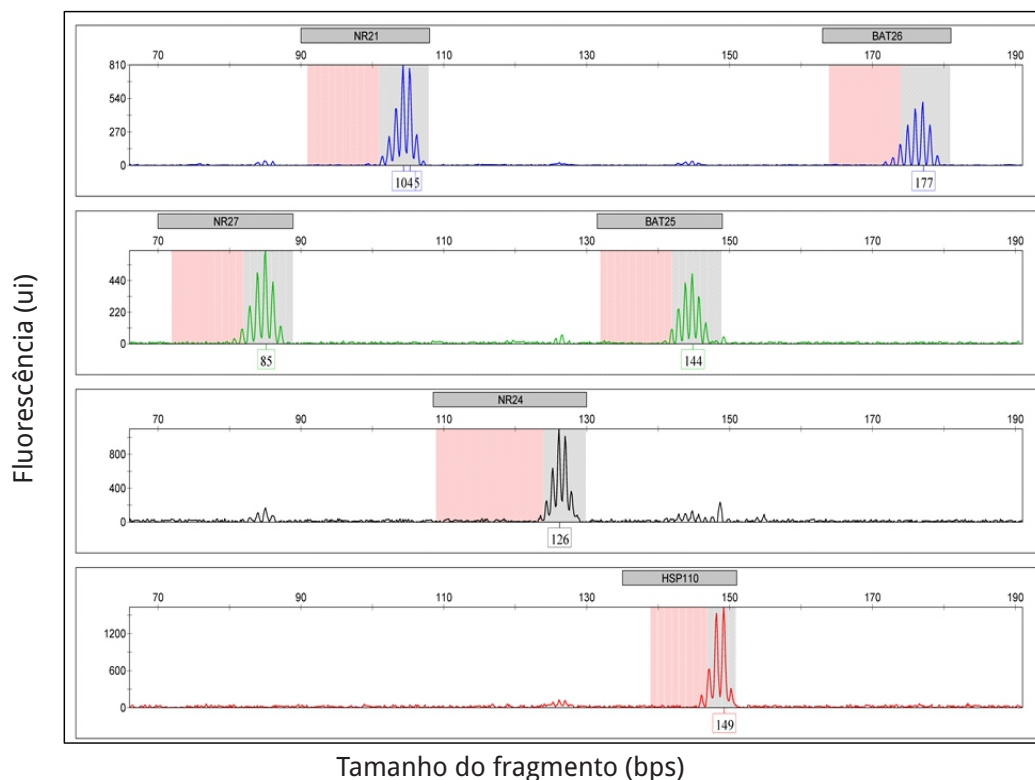
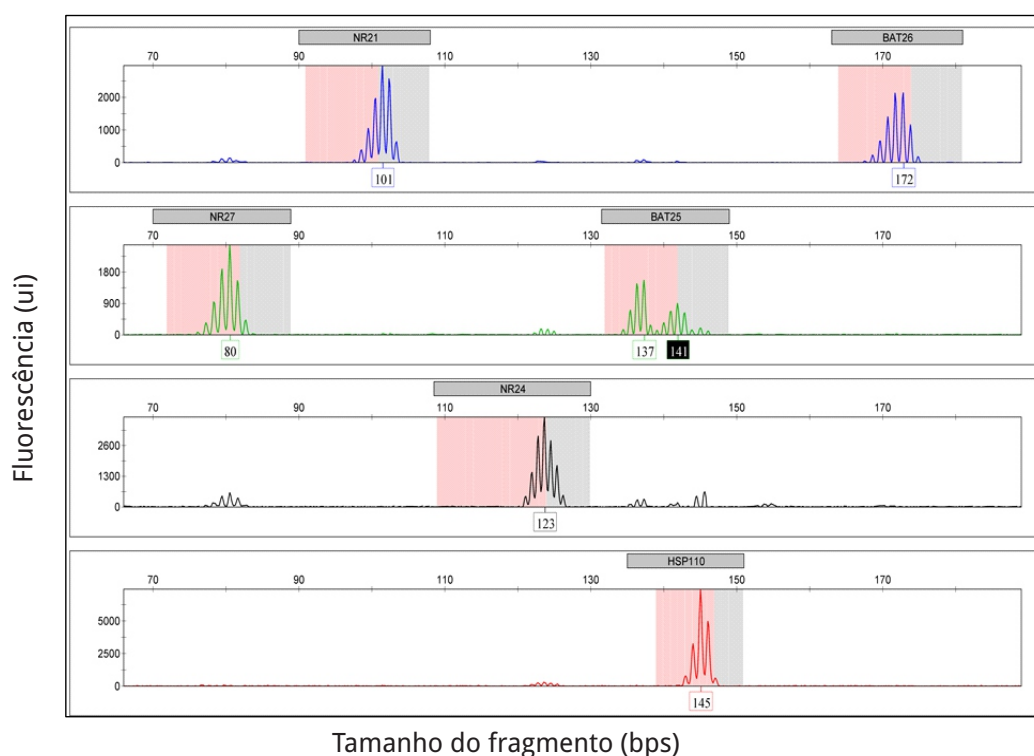


Figura 1: Eletroferogramas de duas amostras de DNA representando a distribuição de tamanho de fragmentos de 6 marcadores mononucleotídicos NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, BAT-26 e HSP110. AS cores dos picos representam o comprimento de onda correspondente à cada marcador fluorescente. A região sombreada destacada mostra o intervalo de variação de tamanho (QMVR) de cada marcador que não apresenta instabilidade. O marcador com tamanho fora dessa área apresenta instabilidade de microsatélite. **Painel A:** Eletroferograma da distribuição do tamanho dos marcadores do controle negativo incluso nesse kit, mostrando amostra MSI⁻. **Painel B:** Eletroferograma da distribuição do tamanho dos marcadores de uma amostra de linhagem de células de câncer de colo retal HCT-15, mostrando instabilidade para os 6 marcadores analisados e portanto MSI⁺.

DATA SHEET

**HT - MSI+****Human Target - Microsatellite Instability Plus**

Kit multiplex para detecção de MSI por análise de fragmento.

Painel A: Kit controle negativo para MSI**Painel B: Linhagem HCT - 15 MSI⁺**

DATA SHEET

**HT - MSI+****Human Target - Microsatellite Instability Plus**

Kit multiplex para detecção de MSI por análise de fragmento.

Figura 2: Painéis obtidos com o equipamento Applied Biosystems™ 3500 Series Genetic Analyzer e analisados com o GeneMapper® Software Version 4.1 (Applied Biosystems). Esses painéis correspondem exatamente aos exemplos dos painéis da figura 1 do controle negativo contido nesse kit e da linhagem celular HCT15, porém com os 6 marcadores sendo exibidos separadamente de acordo com o comprimento de onda: azul para os marcadores NR-21 e BAT-26; verde para NR-27 eBAT-25; amarelo (eletroferograma representado em preto) para NR-24 e vermelho para HSP110. As áreas sombreadas em cinza representam o intervalo de variação de tamanho (QMVR) e as áreas em vermelho onde a variação de tamanho indica **instabilidade** do marcador.

5. Referências

- Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Durães R, Antônio de Oliveira M, Guimarães D, Reis RM. Advantage of HSP110 (T17) marker inclusion for microsatellite instability (MSI) detection in colorectal cancer patients. *Oncotarget*. 2018 Jun 19;9(47):28691-28701.
- Campanella NC, Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Viana D, Palmero EI, Pereira R, Reis RM. Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in Brazilian population: correlation with ancestry markers. *Eur J Hum Genet*. 2014 Jul;22(7):875-80.
- Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One*. 2010 Feb 24;5(3).