



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Příloha č. 1a – Technická specifikace pro část 1 VZ

Technická specifikace:

Část jedna - RNA sekvenování za použití “Next-Generation Sequencing” (NGS)

Illumina technologie

Cíl:

Výsledky RNA sekvenování budou použity pro analýzu transkriptomů (za použití kvalitativních i kvantitativních přístupů).

Biologické vzorky pro analýzy transkriptomů:

RNA z rostlinného pletiva: kořeny a listy dubů *Quercus suber* (genome je dostupný) a *Quercus variabilis*. Některé vzorky budou infikovány *Phytophthora cinnamomi* (genome je dostupný). Vzorky budou získány z rostlin kultivovaných v *in vitro* podmínkách a z dvouletých rostlin.

Kontaktní osoby:

Záležitosti ohledně veřejné zakázky a vzorků:

Marília Horta Jung (marilia.jung@mendelu.cz nebo mariliahortajung@gmail.com) a Josef Janoušek (josef.janousek@mendelu.cz nebo janousek.jose@gmail.com)

Záležitosti ohledně výsledků sekvenování:

Marília Horta Jung (marilia.jung@mendelu.cz nebo mariliahortajung@gmail.com) a Tomáš Kudláček (tomas.kudlacek@mendelu.cz nebo Kudlak@seznam.cz)

Služby jsou požadovány následovně:

1) kvalita poskytnutých vzorků a jejich transport

RNA budou připraveny zadavatelem a poskytovatel služby zajistí jejich vyzvednutí a transport na suchém ledu. Transport bude co nejrychlejší, aby bylo zabráněno degradaci RNA vzorků.



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Vzorky budou odesílány po 24 nebo 48 nebo 96 vzorcích (toto umožní poskytovateli služby připravit mix těchto vzorků a sekvenovat ho najednou).

RNA vzorky budou odeslány ve 2 ml zkumavkách obsahujících $\geq 20 \mu\text{l}$ s RNA o koncentraci alespoň $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ a $\text{RIN} \geq 7$. V případě, že budou vzorky poskytnuty ve snížené kvalitě, poskytovatel služby o tom bude informován.

2) Kontrola kvality (QC) vzorků

Poskytovatel služby provede kontrolu kvality vzorků (kapilární elektroforézou nebo porovnatelnou metodou vhodnou pro vyhodnocení kvality RNA a koncentrace v každém vzorku) a provede také případnou úpravu koncentrace RNA před přípravou cDNA knihoven. V případě komplikací v této fázi zpracování vzorků (např. špatná kvalita RNA), poskytovatel služby bude kontaktovat Marília Horta Jung.

3) Odstranění rRNA

Odstranění rRNA bude provedeno před přípravou cDNA knihoven. Použití poly(A) enrichment nebo rRNA depletion kitu bude provedeno na základě domluvy s kontaktní osobou (Marília Horta Jung) – a to po kontrole kvality RNA vzorků, pokud toto nebude specifikováno již dříve.

3a) poly(A) obohacení

Poly(A) obohacení bude provedeno poly(A) enrichment kitem (viz požadované parametry kapitola č. 10 tohoto dokumentu).

3b) rRNA deplece

rRNA deplece bude provedena za použití rRNA deplečního kitu (viz požadované parametry kapitola č. 10 tohoto dokumentu) a za použití oligonukleotidů, které budou zaslány poskytovateli služby zároveň s odesláním vzorků.

4) Příprava RNA (cDNA) knihoven



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



RNA (cDNA) knihovny budou připraveny s “unique dual indexes” a pomocí kitu pro přípravu RNA (cDNA) knihoven pro sekvenování na Illumina platformě (viz požadované parametry kapitola č. 10 tohoto dokumentu).

5) Next Generation Sequencing (NGS)

NGS bude provedeno na přístroji Illumina – NovaSeq 6000 s nastavením “paired-end 150 bp” (oboustranné čtení v délce 150 bp). Sekvenační reagentie a počty drah (“lanes”) jsou specifikovány v příloze číslo 2a (to se odvíjí od počtu odeslaných vzorků k sekvenaci).

6) Očekávané výstupy, bioinformatické analýzy a kontrola kvality (QC)

Je očekáváno získání alespoň 100 milionů “reads” ve vysoké kvalitě z každého vzorku (tj. 50 milionů klusterů z 2x 150 bp run). Nižší počet “reads” je přijatelný pro vzorky poskytnuté v horší kvalitě. Požadavek na kvalitu dat: $\geq 85\%$ bazí vyšší než Q30 při 2×150 bp nastavení. Zadavatel také požaduje od poskytovatele služby dodat „raw“ data a také data částečně zpracovaná (po “de-multiplexing”, odstříhnutí adaptorů, vyhodnocení “index hopping”, etc.). Sekvenační data budou dodána elektronicky, prostřednictvím zabezpečeného serveru.

7) Časový harmonogram požadovaných služeb

Zadavatel zašle objednávku poskytovateli služby, který tuto objednávku potvrdí do dvou pracovních dní (nepotvrzená objednávka je považována druhý pracovní den za přijatou). Na základě potvrzené objednávky je poskytovatel služby povinen zajistit vyzvednutí RNA vzorků do 3 pracovních dní od data přijetí objednávky.

Zadavatel požaduje po poskytovateli služby provedení kontroly kvality vzorků a případnou úpravu koncentrace před přípravou cDNA knihoven do 10 pracovních dní od data vyzvednutí RNA vzorků.

Zadavatel požaduje po poskytovateli služby obdržení sekvenačních výsledků do 6 týdnů od data kontroly kvality RNA vzorků.

Zadavatel požaduje po poskytovateli služby uchování sekvenačních výsledků (dat) po dobu minimálně 8 týdnů.



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



8) Obecné požadavky a očekávání

Zadavatel požaduje, aby zbývající RNA vzorky byly skladovány poskytovatelem služby po dobu minimálně 4 týdnů až 12 týdnů od data dodání sekvenačních výsledků zadavateli.

Všechny služby musí být provedeny poskytovatelem služby v souladu s běžnou laboratorní praxí a postupy, počínaje kontrolou kvality vzorků až po bioinformatické vyhodnocení.

Poskytovatel služby je povinen prokázat předchozí zkušenosti s požadovanými službami a poskytnout kontakty na předchozí tři zákazníky, které mohou být použity jako reference (viz čl. 5.7. Výzvy k podání nabídek).

Zadavatel požaduje od poskytovatele služby v rámci plnění každé dílčí objednávky dodání podrobného popisu použitých metod pro přípravu knihoven ve formě reportu, který bude obsahovat informace o konkrétním použitém kitu pro přípravu cDNA knihoven a protokol (s uvedením všech úprav a přidaných kroků). Protokol bude také zahrnovat jednotlivé kroky kontroly kvality (včetně výsledků Qubit HS DNA Assay nebo kapilární elektroforézy), nastavení sekvenačních běhů a postup zpracování dat a vyhodnocení jejich kvality.

Poskytovatel služby je povinen zajistit 6 hodin konzultací se zadavatelem (zejména ohledně vyhodnocení sekvenačních dat, bioinformatické podpory, a také případně ohledně zpracování vzorků; formou on-line diskuze nebo formou osobní konzultace)

Komunikace mezi poskytovatelem služby a zadavatelem bude probíhat v anglickém jazyce (protokoly, emailová komunikace, online konzultace a další komunikace).

Cena musí zahrnovat všechny nezbytné související náklady. Žádné další poplatky nejsou povoleny.

9) Shrnutí požadovaných výstupů a následná fakturace

Zadavatel požaduje, aby na základě každé dílčí objednávky obdržel vždy:

- 1) raw data (viz bod 6)
- 2) částečně zpracovaná data „pre-processed data“ a vyhodnocená data (viz bod 6)



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



3) report (bod 8)

V návaznosti na dodání výše uvedených výsledků (raw dat, pre-processed dat, vyhodnocených dat a reportního protokolu) provede zadavatel během 15 pracovních dní jejich kontrolu a potvrdí jejich akceptaci a možnost provedení fakturace. V případě, že zadavatel akceptaci dat nepotvrdí do 15 pracovních dní, může po uplynutí této lhůty dodavatel provést fakturaci i bez předchozího potvrzení ze strany zadavatele.

10) Požadované specifikace kitů :

1) poly(A) enrichment kit

- kit, který je kompatibilní s následnou přípravou RNA (cDNA) knihoven pro NGS sekvenování
- ponechává intaktní mRNA
- kit musí být vhodný pro poly(A) enrichment z „celkové RNA“ (total RNA)

2) rRNA depletion kit

- rRNA depleční kit, který umožňuje použití vlastních ssDNA sond (custom probes)
- přibližné rozmezí vstupní RNA: 10 ng - 1 µg
- kit musí být vhodný i pro vzorky s nízkou kvalitou RNA
- princip fungování deplečního kitu musí být založený na principu degradace RNA enzymem RNase H
- ssDNA sondy budou poskytnuty zadavatelem (budou navrhnuty na základě rRNA sekvencí získaných z jednotlivých druhů dubů)
- RNA musí být následně vhodná pro přípravu RNA (cDNA) knihoven pro NGS sekvenování

3) kit pro přípravu RNA (cDNA) knihoven pro sekvenování na Illumina platformě

- plně kompatibilní s RNA po polyA obohacení i s RNA po rRNA depleci
- plně kompatibilní s následnou sekvenací na NovaSeq přístroji (Illumina)
- vstupní množství RNA přibližně v rozsahu: 10 ng – 1 µg (tj. knihovny lze připravit i při uvedeném limitním nízkém množství RNA)



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

- kit musí zachovat informaci ohledně vlákna DNA, ze kterého byl transkript získán (strand-specific metoda přípravy knihoven)
- DNA polymeráza, která je součástí kitu, musí být alespoň 200x přesnější než-li *Taq* polymeráza (tato specifikace označuje chybovost (error rate) polymerázy)