

## ANALİZ ŞARTNAMESİ

### GENOMİK DNA EKSTRAKSİYON KİTİ TEKNİK ÖZELLİKLERİ

1. Kit insan gaita, anne sütü ve oral örneklerinden yüksek saflıkta genomik DNA ekstraksiyonunu gerçekleştirebilmelidir.
2. Kit peristaltik pompalı yarı otomatik cihazlar ile çalışmalıdır.
3. Kit genomik DNA'yı yüksek miktarda ve saflıkta hapseden 80µm çapında membran filtreye sahip olmalıdır.
4. Kit içeriğinde; 2,5 ml proteinaz K, 25 ml Doku Lizis Solüsyonu, 30 ml lizis solüsyonu, 160 ml yıkama solüsyonu, 100 ml elüsyon solüsyonu, 96 adet DNA saklama tüpü ve kapağı, 96 adet atık tüpü, 96 adet membran filtreli kartuşa sahip olmalı ve ihtiyaç halinde yeniden ekstraksiyon yapılabilirdir.
5. Genomik DNA'nın kırılmasına neden olan santrifüj her aşama yerine sadece lizat hazırlamada kullanılmalıdır.
6. 100 ul den 1 ml'ye kadar miktarlardaki tüm örneklerden DNA 'yı ekstrakte edebilmelidir.
7. Çalışılan cihazda 5 saniyeden daha kısa sürede ölçüm yapılmalı, ilave bir bilgisayar gerekmemeli ve tüm DNA'lara ait ölçüm verileri otomatik olarak verilmelidir.
8. Her örneğin konsantrasyonu en az 100 ng/ul olmalıdır ve jele yüklenerek DNA varlığı doğrulanmalıdır.
9. Nükleik asit'lerin sekans işlemine uygunluğunun kontrolü, nükleik asitlerin floresan boyaları ile konsantrasyonunu belirleyen cihaz kullanılarak yapılmalıdır. Cihaz ışığın doğal emilimini 260 nm'de DNA'yı ölçen bir spektrofotometreye sahip olmalıdır. Cihaz 5 saniyeden daha kısa sürede ölçüm yapmalı ve numunelerin absorbansı ile eş zamanlı olarak konsantrasyon grafiği vermelidir. DNA'ların sekans işlemine uygunluğunun kontrolü için Thermo Fisher Scientific markalı Qubit florometer 2.0 cihazı ile Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS Assay Kit veya dengi kullanılarak Ar-Ge laboratuvarında yapılmalıdır.
10. Çalışılan cihazda floresan boya olarak picogreen boya içeren kitler kullanılmalıdır.
11. Kit 10 pg / uL ila 100 ng / uL aralığında olan numune konsantrasyonlarını tespit edebilmelidir.
12. Kit içeriğinde; 250µL HS reaktifi (Floresan boya), 50mL HS Buffer, 1mL HS Standart\_1 ve 1mL Standart\_2'ye sahip olmalı ve ihtiyaç halinde yeniden ölçüm tekrarlayabilmelidir.
13. Kontaminasyon ve DNA yoğunluğunu gözlemlemek için agaroz jel elektroforez ile de görüntüleme yapılmalıdır.
14. Düşük kalite ve konsantrasyondaki örneklerden tekrar DNA izolasyonu yapılmalıdır.

15. Kit içerikleri oda ısısında saklanabilmelidir. Uygun koşullarda saklandığı taktirde bir yıl raf ömrü olmalıdır.
16. Teklif verecek olan firma yukarıda genomik DNA ekstraksiyon için tanımlaması yapılan cihazın tedarikçisi firmanın distribütörlük belgesini ya da distribütör tarafından verilmiş yetki belgesini sunmalıdır.
17. Firma aynı zamanda aynı örneklerden RNA izolasyonu da gerçekleştirecek saklamalıdır.

#### **NUMUNE TOPLANMASI VE KALİTE KONTROL TEKNİK ÖZELLİKLERİ**

1. Numune alımından önce toplanacak numuneye uygun eğitim uygulamalı olarak firma tarafından verilmelidir.
2. Numunelerin toplanacağı saklama kutuları ve solüsyonları firma tarafından gönderilmelidir.
3. Toplanan tüm numuneler merkezlerden AR-GE merkezi yetki belgesine sahip firma laboratuvarınca soğuk zincir kurallarına uygun olarak (-80°C) teslim alınmalı ve yine soğuk zincir kurallarına uyarak AR-GE laboratuvarına teslim etmelidir.
4. Teslim alınan numunelerin kalite kontrolleri firma tarafından gerçekleştirilmelidir. Kalite kontrol işlemleri Jel elektroforezi ve QUBIT cihazı ile florometrik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmelidir.
5. Numune kaynaklı hataların önüne geçebilmek için her numune 2 alikotlu olarak saklanmalıdır.
6. Firma aynı zamanda ISO 13485, 9001:2015, 14001:2015 ve TSE yeterlilik belgelerine sahip olmalıdır.

#### **KÜTÜPHANE HAZIRLAMA SEKANS İŞLEMİ VE BİYÖİNFORMATİK ANALİZ TEKNİK ÖZELLİKLERİ**

1. Covaris sonikatör cihazı ile 300bp DNA fragmentleri hazırlanmalıdır.
2. DNA kütüphane hazırlığı sırasıyla end repairing, polyA kuyruğunun eklenmesi, saflaştırma ve PCR amplifikasyonu basamaklarını içermelidir.
3. Qubit 2.0 ile kantitasyonu yapıldıktan sonra 2ng/ul olacak şekilde sulandırılıp Agilent2100 veya dengi cihaz ile ölçülmelidir.
4. En az 3nM seviyede sonuç verdiği qPCR sistemi ile gösterilmelidir.
5. Amplifikasyon işleminde kullanılacak enzim, High Fidelity özelliğinde olan polimeraz enzimi olmalı, mikrolitresinde 2 ünite enzim bulunmalı ve 30 kilobaza kadar amplifikasyon gerçekleştirebilmelidir.
6. Kütüphane hazırlık süresi 3 saatten kısa olmalıdır.
7. Ara saflaştırma basamaklarında Agencourt Ampure Magnetic Beads kullanılmalıdır.

8. Hazırlanan kütüphanelerin kalitesi florometrik ölçüm yöntemi ile kontrol edilmeli ve kalite kontrol sonuçları paylaşılmalıdır.
9. Dizileme, yeni nesil dizileme cihazı, Illumina NovaSeq 6000 veya dengi cihaz ile gerçekleşmelidir.
10. Dizileme flow cell üzerinde yapılmalıdır.
11. Dizileme işlemi için 2x300 bp paired-end okumalarla gerçekleşmelidir.
12. Örnek başına en az 10Gb veri sağlanmalıdır.
13. Okuma boyunun %40'ı Q38 değerinin altında kalan okumalar elemine edilmelidir.
14. Okuma boyunun %10 N olarak okunan diziler elemine edilmelidir.
15. Adaptör dizisi ile örtüşen kısımları olan diziler elemine edilmelidir.
16. Eğer kontaminasyon mevcut ise konak veri tabanında baskı edilerek kontrol edilmelidir.
17. Temizlenen data Soapdenovo veya MEGAHIT ile habitatına göre uygun olarak birleştirilmelidir.
18. Temizlenen data SoapAligner kullanılarak haritalanmalıdır.
19. 500bp'den düşük Scaffitg filtrelenmelidir ve efektif olanlar ileri analizler için kullanılmalıdır.
20. Elde edilen scaffitg verisi ile MetaGeneMark kullanılarak gen prediksyonları yapılmalıdır
21. Bütün benzersiz genler bir araya getirilerek gen kataloğu oluşturulmalıdır.
22. Gen kataloğu annotasyon bilgisi için MicroNR veri tabanı ile blast edilmelidir.
23. Fonksiyonel analizler için KEGG, eggNOG ve CAZy kullanılmalıdır.
24. İstatiksel analizler PCA analizi, örnek cluster analizi, diffuse analizi, yolak analizi içermelidir.
25. Mikrobial komüniteleri ileri analizleri için LEFSE analizi, CCA/RDA analizi, NMDS analizi, PHI annotasyonu, Secretory-Protein prediksyonu, Tip3 "secretion system effector protein" tahmini, VFDB annotasyonu ve direnç gen annotasyonu içermelidir.

## **VERİ PAYLAŞIMI**

1. Elde edilen kalite kontrol verileri, ham veriler (fastq.), işlenmiş veriler (.bam, .vcf, .xls2 ve .fasta) ve sonuç raporu, bulut sunucuya yüklenmeli ve numune sahibine bu sonuçları indirebilmesi için bağlantı sağlanmalıdır.
2. Çalışmaya ait hizmet süresi DNA izolasyon, kütüphane hazırlama toplamda 4 haftayı geçmemelidir.
3. Kütüphane hazırlandıktan sonra okuma ham veri sonuçları en geç 5 iş günü içerisinde paylaşılmalıdır.
4. Firma Biyoinformatik analizin yapılacağı örneklerde aynı zamanda yorumlanmasında da yardımcı olmalıdır.