**Załącznik nr 2 do Ogłoszenia**

|  |
| --- |
| **OPIS PRZEDMIOTU ZAMÓWIENIA** |

w postępowaniu o udzielenie zamówienia publicznego, prowadzonym przez Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa, pn. ***Usługa przeprowadzenia analiz proteomicznych i bioinformatycznych****,* znak sprawy: ***AEZ/S-126/2023***

Zadanie: przeprowadzenie analizy proteomicznej ilościowej – porównawczej wykorzystując metodę chromatografii cieczowej sprzężonej z wysokorozdzielczą tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) nie wykorzystującej znakowania (tzw. “label-free”), oraz analiza bioinformatyczna uzyskanych wyników proteomicznych.

Eksperyment polega na porównaniu poziomów białek w dwóch typach materiału pobranego od pacjentów, w czterech punktach czasowych.

Przedmiotem usługi będą:

1. analiza proteomiczna 840 próbek po 420 sztuki każdego z następujących rodzajów materiału biologicznego:
   1. Wyskrobiny – fragmenty tkanki pozyskane podczas oczyszczania rany uczestników badania klinicznego, zabezpieczone preparatem „Allprotect (Qiagen), zamrożone w -80⁰C;
   2. Popłuczyny – płyn transportowy, w którym zawieszone były fragmenty tkanki pozyskane podczas oczyszczania rany uczestników badania klinicznego, przefiltrowany i zamrożony w alikwotach ok. 1ml w -80⁰C.
2. Analiza bioinformatyczna wyników uzyskanych w analizach proteomicznych

Zamawiający (Warszawski Uniwersytet Medyczny) we współpracy z Konsorcjantem Projektu – Uniwersytetem Łódzkim, przekaże do analiz proteomicznych materiał w 4-6 turach zależnych od przyjęć pacjentów. Materiał będzie przekazany jak opisano:

1. Zamawiający przekaże materiał tkankowy tj. Wyskrobiny (w ilości co najmniej 100µg białka całkowitego w postaci porcji homogenatu uzyskanego bez wykorzystania proteinaz. Homogenat wyskrobin będzie umieszczony w probówkach typu „low-bind” o pojemności 1,5ml, zamrożony w temperaturze -80⁰C i w tej postaci dostarczony do Wykonawcy.
2. Zamawiający przekaże materiał płynowy tj. Popłuczyny (w ilości co najmniej 1ml płynu transportowego) w postaci porcji wcześniej przefiltrowanych przez filtr celulozowy o średnicy porów 0,22µm. Popłuczyny zostaną przekazane w probówkach typu „low-bind” o pojemności 1,5ml, zamrożone w -80⁰C. Nie będą przeprowadzane żadne dodatkowe procedury poprzedzające przekazanie materiału.

Wykonawca przeprowadzi wszystkie procedury z wykorzystaniem odczynników o odpowiedniej czystości. W przypadku enzymów i rozpuszczalników organicznych oczekiwana czystości MS-grade lub HPLC grade. Odczynniki redukujące, alkilujące, kwasy organiczne i nieorganiczne o czystości HPLC-grade lub ACS. Końcówki do pipet, próbówki, płytki 96-dołkowe i inne plastiki o jakości „low-bind”, MS-grade lub równoważnej.

Sposób postępowania z próbami:

1. **Próbki lizatu „wyskrobin”.** Zamawiający wymaga określenia stężenia białek obecnych w poszczególnych próbkach. Kolejno pobranie takiej samej ilości całkowitego białka na podstawie oznaczeń stężenia, z dopuszczalnym błędem <20% (dla ilości 20ug) do dalszej preparatyki. Ze względu na możliwą obecność, w próbkach „wyskrobin”, detergentów i innych związków małocząsteczkowych Zamawiający wymaga włączenia do procedur etapu oczyszczenia materiału ze związków mogących wpływać negatywnie (m.in. supresja sygnału) na jakość pomiaru metodą spektrometrii mas LC-MS/MS. Etap oczyszczenia może być przeprowadzony na dowolnym etapie preparatyki poprzedzającej pomiar. Przykładowe metody to sp3, sp4, HiPPR™ Detergent Removal Resin. Efektywność oczyszczenia ma zostać skonsultowana z Zamawiającym i zatwierdzona do dalszego stosowania
2. **Próbki „popłuczyn”.** Zamawiający wymaga określenia stężenia białek obecnych w poszczególnych próbkach. Kolejno pobranie takiej samej ilości całkowitego białka na podstawie oznaczeń stężenia, z dopuszczalnym błędem <20% (dla ilości 20ug) do dalszej preparatyki. Zamawiający wymaga poddania próbek „popłuczyn” procedurze deplecji najbardziej licznych białek osocza w celu zwiększenia liczby identyfikowanych białek. Efektywność procedury deplecji ma zostać potwierdzona za pomocą żelu SDS-PAGE, na którym rozwinięte zostanie 5 tych samych próbek popłuczyn w stanie natywnym oraz poddanych deplecji. Próbki te mają zostać również zmierzone metodą LC-MS/MS w celu wstępnego porównania efektywności procedury. Efektywność deplecji ma zostać skonsultowana z Zamawiającym i zatwierdzona do dalszego stosowania.

Uzyskane próbki obu typów mają zostać poddane standardowej procedurze redukcji/alkilacji mostków di-siarczkowych w białkach, za pomocą jednej z kombinacji odczynników: DTT/IAA, TCEP/CAA, TCEP/IAA, DTT/CAA. Trawienie proteolityczne ma zostać przeprowadzone z wykorzystaniem układu proteaz LysC/trypsyna, w celu uzyskania większego pokrycia jak i liczby identyfikowanych białek. Wstępny etap trawienia ma zostać przeprowadzony w warunkach denaturujących w obecności >6M mocznika i być prowadzony w temperaturze 37⁰C przez okres 2 do 4 godzin z wytrząsaniem. Następnie uzupełniające trawienie w warunkach niedenaturujących z użyciem trypsyny w temp. 37⁰C z wytrząsaniem przez noc.

Uzyskane mieszaniny peptydów mają zostać odsolone za pomocą jednej z metod/złóż: ZipTip C18, HLB Waters, ZebaSpin lub równoważnej. Próbki mają zostać osuszone a kolejno zawieszone w buforze do nastrzyku na układ HPLC sprzężony ze spektrometrem mas. W buforze służącym do zawieszenia próbki mają być dodane peptydy kalibracyjne czasu retencji np. iRT Biognosys, które zostaną wykorzystane podczas analizy danych.

Zamawiający wymaga wykonania pomiarów na układzie wysokorozdzielczej tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową. Zamawiający wymaga wykonania pomiarów w trybie DIA, tj. “data independent acquisition”, na przykład SWATH. W celu uzyskania satysfakcjonujących wyników pomiarów Zamawiający wymaga od Wykonawcy dysponowania:

1. Tandemowym chromatografem cieczowym równoważnym, połączonym online ze spektrometrem mas zapewniającym możliwość przeprowadzenia analizy cechujących się następującymi parametrami:
   1. Możliwość uzyskania prędkość przepływów w zakresie 0,1-10µl/min;
   2. Możliwość pracy z kolumnami chromatograficznymi o długości 15-50cm i średnicy <0,5mm dla układów „kapilarnych” lub <0,15mm dla układów „nano”;
   3. Możliwość wykorzystania układu odwróconych faz C18 (z gradientem narastającego stężenia acetonitrylu w zakresie 5-45%);
   4. Możliwość dobrania długości gradientu zapewniającej dostarczenie nie mniej niż 1000 identyfikowanych białek z materiału typu „popłuczyny” i 3000 z materiału typu „wyskrobiny”;
   5. Szybkość skanowania nie mniejszą niż 133Hz;
   6. Możliwość przeprowadzenia fragmentacji w trybach CID oraz ETD, opcjonalnie EAD oraz CAD zapewniając przy tym rozdzielczość pracy powyżej 40000 przy m/z = 900 na poziomie MS i MS/MS;
   7. Zachowanie błędu pomiarowego na poziomie <5ppm;
   8. Konstrukcja detektora wykorzystująca układy typu np. TOF, Orbitrap lub pochodne.
2. Zasobem komputerowym i oprogramowaniem do identyfikacji peptydów i białek oraz analizy bioinformatycznej ich funkcjonalności, przykładowo: Spectronaut Biognosys lub FragPipe.

Zamawiający wymaga aby Wykonawca pomiędzy pomiarami próbek wykonywał pomiar próbek kontrolnych np. trawiony, referencyjny lizat hodowli komórkowej (takiej jak HeLa). W przypadku odnotowania spadku jakości i ilości identyfikacji lub sygnału Wykonawca przerywa pomiar i doprowadza układ pomiarowy do właściwego stanu, który potwierdza kolejnym pomiarem próbki kontrolnej.

Zamawiający wymaga od Wykonawcy przeprowadzenia próby procesowej, na dodatkowym materiale dostarczonym przez Zamawiającego w celu optymalizacji procesów pomiaru i analiz.

Wykonawca przeanalizuje zebrane surowe dane pod kątem zachowania pożądanych parametrów technicznych po zakończeniu pomiarów wszystkich próbek przekazanych w ramach danej tury. Wykonawca przekaże cząstkowe dane do Zamawiającego i jednocześnie je zarchiwizuje. Po zmierzeniu wszystkich próbek przewidzianych zleceniem Wykonawca zanalizuje je jednocześnie, względem stworzonej biblioteki widm wygenerowanej w oparciu o reprezentatywną liczbę próbek (nie mniej niż połączenie 100 różnych próbek). Do analiz Wykonawca użyje ludzkiego proteomu referencyjnego pochodzącego z nadzorowanych baz danych, przykładowo Uniprot.org. Zamawiający wymaga od Wykonawcy przeprowadzenia analiz danych z wykorzystaniem oprogramowania dedykowanego do identyfikacji białek i ich analizy ilościowej. Oprogramowanie powinno cechować się możliwością bezpośredniego importu surowych plików wygenerowanych podczas pomiarów LC-MS/MS w trybie DIA. Oprogramowanie musi posiadać funkcjonalność identyfikacji białek na podstawie stworzonej biblioteki widm jak w trybie bez biblioteki. Przykładowe oprogramowania: Spectronaut Biognosys lub FragPipe. Analiza statystyczna uzyskanych danych ilościowych opisujących dane białko może być prowadzona za pomocą zewnętrznego oprogramowania, którym Wykonawca będzie dysponował. Wszystkie prace przeprowadzone na materiale i danych przez Wykonawcę powinny odbywać się pod nadzorem Eksperta Bioinformatyka.

Zamawiający wymaga od Wykonawcy, że uzyskane wyniki będą cechować się identyfikacją co najmniej 3000 białek z materiału tkankowego, oraz 1000 białek w płynie ustrojowym. Przy założeniu, że każde z białek będzie zidentyfikowane za pomocą co najmniej dwóch unikalnych peptydów.

Zamawiający wymaga od Wykonawcy aby białka zidentyfikowane po kątem ilościowym zostały zinterpretowane pod kątem ich roli w procesach biologicznych za pomocą narzędzi bioinformatycznych. Ze szczególnym naciskiem na szlaki metaboliczne, ich funkcję i procesy w jakie są zaangażowane. Zamawiający oczekuje od Wykonawcy wykorzystania dedykowanego oprogramowania (takiego jak np. Ingenuity Pathway Analysis) umożliwiającego wielowymiarową interpretację danych biologicznych pod kątem aktywacji, czy wyciszenia poszczególnych szlaków biologicznych.

Zamawiający wymaga przekazania danych w postaci elektronicznej na adres korespondencyjny wskazany w umowie.