



Olsztyn, 4.07.2023 r.

L.dz. W/1021/2023/DZP

*Do wszystkich Wykonawców
uczestniczących w postępowaniu*

ODPOWIEDZI NA PYTANIA

Dotyczy: postępowania nr 232/2023/UB/DZP o udzielenie zamówienia publicznego na prowadzonego w trybie zapytania ofertowego pn.: Sekwencjonowanie następnej generacji NGS zaplanowane w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Zamawiający, Uniwersytet Warmińsko – Mazurski w Olsztynie, przedstawia odpowiedzi na otrzymane zapytania:

Pytanie nr 1 (dotyczy części nr 1):

Z jakiego organizmu pochodzi RNA do badania?

Odpowiedź:

Sus scrofa domestica. RNA zostało wyizolowane z użyciem kitów nie obejmujących traktowania DNAzą.

Pytanie nr 2 (dotyczy części nr 1):

Czy biblioteka do badania Total-RNA-Seq ma zostać przygotowana z uwzględnieniem etapu usuwania rybosomalnego RNA?

Odpowiedź:

Tak

Pytanie nr 3 (dotyczy części nr 1):

Czy sekwencjonowanie Small-RNA ma zostać przeprowadzone w trybie SE50 (single end)?

Odpowiedź:

Tak

Pytanie nr 4 (dotyczy części nr 1):

Czy w badaniu Small-RNA-Seq Zamawiający w miejsce platformy HiSeq4000 dopuszcza zastosowanie nowszej platformy NovaSeq?

Odpowiedź:



Nie

Pytanie nr 5 (dotyczy części nr 1):

Czy Zamawiający jest w stanie dostarczyć całkowite RNA w ilości 2,5 mikrograma o wartości RIN 7? Jeśli nie, jakie inne parametry próbki deklaruje Zamawiający?

Odpowiedź:

Zamawiający jest w stanie dostarczyć całkowite RNA w ilości 2,5 mikrograma. Większość wyizolowanych prób charakteryzuje się wartością RIN>7, jednakże nieliczne próby wykazują wartość RIN w przedziale 5,5-7.

Pytanie nr 6 (dotyczy części nr 1):

Czy Zamawiający oczekuje dostarczenia tylko danych z sekwencjonowania czy również ich opracowania bioinformatycznego? Jeśli tak, jakiego zakresu analizy bioinformatycznej oczekuje Zamawiający?

Odpowiedź:

Zamawiający oczekuje opracowania bioinformatycznego danych wraz z ich wizualizacją. Przy analizie Total RNA Seq zamawiający oczekuje następujących podmiotów analizy z wykorzystaniem następującego oprogramowania we wskazanej wersji:

Analysis item	Software	Version/date
Quality control	FastQC	0.10.1
Adapter remove	Cutadapt	1.10
Mapping	TopHat	2.0
Transcripts assembly	StringTie	1.3
Differential expression analysis	R package: Ballgown	2016.09.29
GO and KEGG enrichment analysis	Perl scripts in house	NA
Coding potential	CPC (Coding Potential Calculator)	0.9
Coding potential	CNCI (Coding-Non-Coding Index)	2.0

Analiza zawierać powinna następujące elementy:

- Wyrównanie, klasyfikacja i adnotacja funkcjonalna wszystkich zmapowanych odczytów
- Analiza biostatystyczna – analiza ekspresji, analiza danych wieloparametrowych, rozkład długości, porównania liczby kopii transkrypcji itp.
- Przewidywanie nowych transkryptów
- Analiza adnotacji i wzbogacania GO i KEGG
- Statystyki i adnotacje SNP/Indels
- Analiza alternatywnego splicingu

W przypadku analiz Small RNA-Seq

- Wyrównanie, klasyfikacja i adnotacja funkcjonalna wszystkich zmapowanych odczytów
- Analiza biostatystyczna – analiza ekspresji, analiza danych wieloparametrowych, rozkład długości, porównania liczby kopii transkrypcji itp.
- „Conservation profile” zidentyfikowanych miRNA

- Klastry pre-miRNA
- Analiza wzbogacenia celu miRNA GO i KEGG
- Przewidywanie celu miRNA

Zamawiający poza wykonaniem analiz oczekuje również wizualizacji danych z użyciem grafów takich jak: VolcanoPlot, Heatmap, Barplott, Scatterplot itp., a także ścieżek sygnałowych KEGG.

Zamawiający oczekuje stałego kontaktu w zakresie wykonywanych analiz oraz ich wizualizacji oraz możliwości dokonywania zmian w proponowanych grafikach.

Podyktowane parametry analizy oraz wskazane parametry oprogramowania podyktowane są koniecznością zachowania spójności metodologicznej prowadzonych badań, które są w trakcie kontynuacji.

Pytanie nr 7 (dotyczy części nr 1):

Czy Zamawiający wyrazi zgodę, aby termin realizacji był liczony od momentu zaakceptowania przez Zamawiającego wyniku kontroli ilościowej?

Odpowiedź:

Nie

Pytanie nr 8 (dotyczy części nr 2):

Z jakiego organizmu pochodzi RNA do badania?

Odpowiedź:

Sus scrofa domestica. RNA zostało wyizolowane z użyciem kitów nie obejmujących traktowania DNAzą.

Pytanie nr 9 (dotyczy części nr 2):

Czy Zamawiający oczekuje dostarczenia tylko danych z sekwencjonowania czy również ich opracowania bioinformatycznego? Jeśli tak, jakiego zakresu analizy bioinformatycznej oczekuje Zamawiający?

Odpowiedź:

Zamawiające oczekuje opracowania bioinformatycznego danych wraz z ich wizualizacją. Przy analizie zamawiający oczekuje następujących podmiotów analizy z wykorzystaniem następującego oprogramowania we wskazanej wersji:

Analysis item	Software	Version/date
Quality control	FastQC	0.10.1
Adapter remove	Cutadapt	1.10
Mapping	HISAT	2.0
Transcripts assembly	StringTie	1.3
Differential expression analysis	Ballgown	2016.09.29
GO and KEGG enrichment analysis	Perl scripts in house	NA
SNP/Indel analysis	samtools	0.7
SNP/Indel annotation	ANNOVAR	2017.09
Alternative splicing	ASprofile	1.0

Zamawiający oczekuje przeprowadzenia wszystkich etapów obróbki danych obejmujących kolejno:

- czyszczenie surowych danych.
- usuwanie odczytów o niskiej jakości i rejonów adaptorowych,
- mapowanie do genomu, wraz z przedstawieniem statystyk dotyczących mapowanego regionu,
- przedstawienia lokalizacji mRNA na genomie,
- przewidywanie nowych transkryptów,
- przedstawienia szczegółowych statystyk sekwencjonowania genu transkryptu (ekspresja, min, mediana, średnia, odchylenie standardowe, suma)
- wizualizacji ekspresji genu/transkryptu w postaci boxplot,
- przedstawienia danych dotyczących „FPKM (Fragments Per Kilobase per Million mapped fragments) Interval”,
- profilowania ekspresji genów/transkryptów,
- profilowania genów/ transkryptów o zróżnicowanej ekspresji,
- wizualizacji genów/ transkryptów o zróżnicowanej ekspresji w postaci VolcanoPlot,
- wizualizacji genów/ transkryptów o zróżnicowanej ekspresji w postaci HeatMap,
- przeprowadzenie analizy gene ontology wraz ze wskazaniem istotnych terminów,

obliczonych wg wzoru
$$P = 1 - \sum_{i=0}^{S-1} \frac{\binom{B}{i} \binom{TB-B}{TS-i}}{\binom{TB}{TS}}$$
 (TB gene number=number of total genes; TS gene number=number of differentially expressed genes in total genes; B gene number=total number of gene in all GO terms; S gene number=number of differentially expressed genes in this GO term),

- przedstawienie istotnych statystycznie terminów GO w postaci wykresów: Barplot i Scatterplot,
- przeprowadzenie analizy KEGG wraz ze wskazaniem istotnych szlaków obliczonych wg

wzoru:
$$P = 1 - \sum_{i=0}^{S-1} \frac{\binom{B}{i} \binom{TB-B}{TS-i}}{\binom{TB}{TS}}$$
 (TB gene number=number of total genes; TS gene number=number of differentially expressed genes in total genes; B gene number=total number of genes in KEGG pathways; S gene number=number of differentially expressed genes in this KEGG pathway),

- przedstawienie istotnych statystycznie ścieżek KEGG w postaci wykresu Scatterplot,
- przygotowanie grafik map ścieżek KEGG dla wybranych szlaków,
- przeprowadzenie analizy SNP (Single Nucleotide Polymorphism),
 - przedstawienie statystyk,
 - wskazanie typów SNP,



- przeprowadzenie analizy alternatywnego składania genów, wraz z przedstawieniem statystyk oraz wizualizacji poszczególnych typów alternatywnego składania genów z podziałem na jego typy w postaci graficznej.

Zamawiający oczekuje stałego kontaktu w zakresie wykonywanych analiz oraz ich wizualizacji oraz możliwości dokonywania zmian w proponowanych grafikach.

Podyktowane parametry analizy oraz wskazane parametry oprogramowania podyktowane są koniecznością zachowania spójności metodologicznej prowadzonych badań, które są w trakcie kontynuacji.

Pytanie nr 10 (dotyczy części nr 2):

Czy Zamawiający wyrazi zgodę, aby termin realizacji był liczony od momentu zaakceptowania przez Zamawiającego wyniku kontroli ilościowej?

Odpowiedź:

Nie

Pytanie nr 11 (dotyczy części nr 1):

Czy Zamawiający dopuści wykonanie sekwencjonowanie small RNA przy użyciu platformy NovaSeq6000?

Odpowiedź:

Nie

Pytanie nr 12 (dotyczy części nr 1):

Czy wszystkie próbki będą wysłane w jednej transzy?

Odpowiedź:

Tak

Pytanie nr 13 (dotyczy części nr 1):

Czy do sekwencjonowania mRNA Zamawiający wymaga 40M odczytów czy 40M odczytów sparowanych?

Odpowiedź:

40M odczytów sparowanych

Pytanie nr 14 (dotyczy części nr 1):

Czy do sekwencjonowania small RNA Zamawiający zaakceptuje odczyty 1x50bp?

Odpowiedź:

Tak

Pytanie nr 15 (dotyczy części nr 1):



Czy Zamawiający zgodzi się na wydłużenie terminu wykonania zamówienia do 35 dni kalendarzowych?

Odpowiedź:

Nie

Pytanie nr 16 (dotyczy części nr 2):

Czy Zamawiający wymaga 40M odczytów czy 40M odczytów sparowanych?

Odpowiedź:

40M odczytów sparowanych

Pytanie nr 17 (dotyczy części nr 2):

Jakich analiz bioinformatycznych wymaga Zamawiający?

Odpowiedź:

Zamawiające oczekuje opracowania bioinformatycznego danych wraz z ich wizualizacją. Przy analizie zamawiający oczekuje następujących podmiotów analizy z wykorzystaniem następującego oprogramowania we wskazanej wersji:

Analysis item	Software	Version/date
Quality control	FastQC	0.10.1
Adapter remove	Cutadapt	1.10
Mapping	HISAT	2.0
Transcripts assembly	StringTie	1.3
Differential expression analysis	Ballgown	2016.09.29
GO and KEGG enrichment analysis	Perl scripts in house	NA
SNP/Indel analysis	samtools	0.7
SNP/Indel annotation	ANNOVAR	2017.09
Alternative splicing	ASprofile	1.0

Zamawiający oczekuje przeprowadzenia wszystkich etapów obróbki danych obejmujących kolejno:

- czyszczenie surowych danych.
- usuwanie odczytów o niskiej jakości i rejonów adaptorowych,
- mapowanie do genomu, wraz z przedstawieniem statystyk dotyczących mapowanego regionu,
- przedstawienia lokalizacji mRNA na genomie,
- przewidywanie nowych transkryptów,
- przedstawienia szczegółowych statystyk sekwencjonowania genu transkryptu (ekspresja, min, mediana, średnia, odchylenie standardowe, suma)
- wizualizacji ekspresji genu/transkryptu w postaci boxplot,
- przedstawienia danych dotyczących „FPKM (Fragments Per Kilobase per Million mapped fragments) Interval”,
- profilowania ekspresji genów/transkryptów,
- profilowania genów/ transkryptów o zróżnicowanej ekspresji,

- wizualizacji genów/ transkryptów o zróżnicowanej ekspresji w postaci VolcanoPlot,
- wizualizacji genów/ transkryptów o zróżnicowanej ekspresji w postaci HeatMap,
- przeprowadzenie analizy gene ontology wraz ze wskazaniem istotnych terminów,

obliczonych wg wzoru
$$P = 1 - \sum_{i=0}^{S-1} \frac{\binom{B}{i} \binom{TB-B}{TS-i}}{\binom{TB}{TS}}$$
 (TB gene number=number of total genes; TS gene number=number of differentially expressed genes in total genes; B gene number=total number of gene in all GO terms; S gene number=number of differentially expressed genes in this GO term),

- przedstawienie istotnych statystycznie terminów GO w postaci wykresów: Barplot i Scatterplot,
- przeprowadzenie analizy KEGG wraz ze wskazaniem istotnych szlaków obliczonych wg

wzoru:
$$P = 1 - \sum_{i=0}^{S-1} \frac{\binom{B}{i} \binom{TB-B}{TS-i}}{\binom{TB}{TS}}$$
 (TB gene number=number of total genes; TS gene number=number of differentially expressed genes in total genes; B gene number=total number of genes in KEGG pathways; S gene number=number of differentially expressed genes in this KEGG pathway),

- przedstawienie istotnych statystycznie ścieżek KEGG w postaci wykresu Scatterplot,
- przygotowanie grafik map ścieżek KEGG dla wybranych szlaków,
- przeprowadzenie analizy SNP (Single Nucleotide Polymorphism),
 - przedstawienie statystyk,
 - wskazanie typów SNP,
- przeprowadzenie analizy alternatywnego składania genów, wraz z przedstawieniem statystyk oraz wizualizacji poszczególnych typów alternatywnego składania genów z podziałem na jego typy w postaci graficznej.

Zamawiający oczekuje stałego kontaktu w zakresie wykonywanych analiz oraz ich wizualizacji oraz możliwości dokonywania zmian w proponowanych grafikach.

Podyktowane parametry analizy oraz wskazane parametry oprogramowania podyktowane są koniecznością zachowania spójności metodologicznej prowadzonych badań, które są w trakcie kontynuacji.

Pytanie nr 18 (dotyczy części nr 2):

Czy próbki będą wysyłane w jednej transzy?

Odpowiedź:

Tak

Z poważaniem,

KANCLERZ
mgr inż. Bogusław Stec



Sporządziła: Dorota Borkowska