

Modulo di monitoraggio del laboratorio di TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO
SOLO PER L'ESTERO

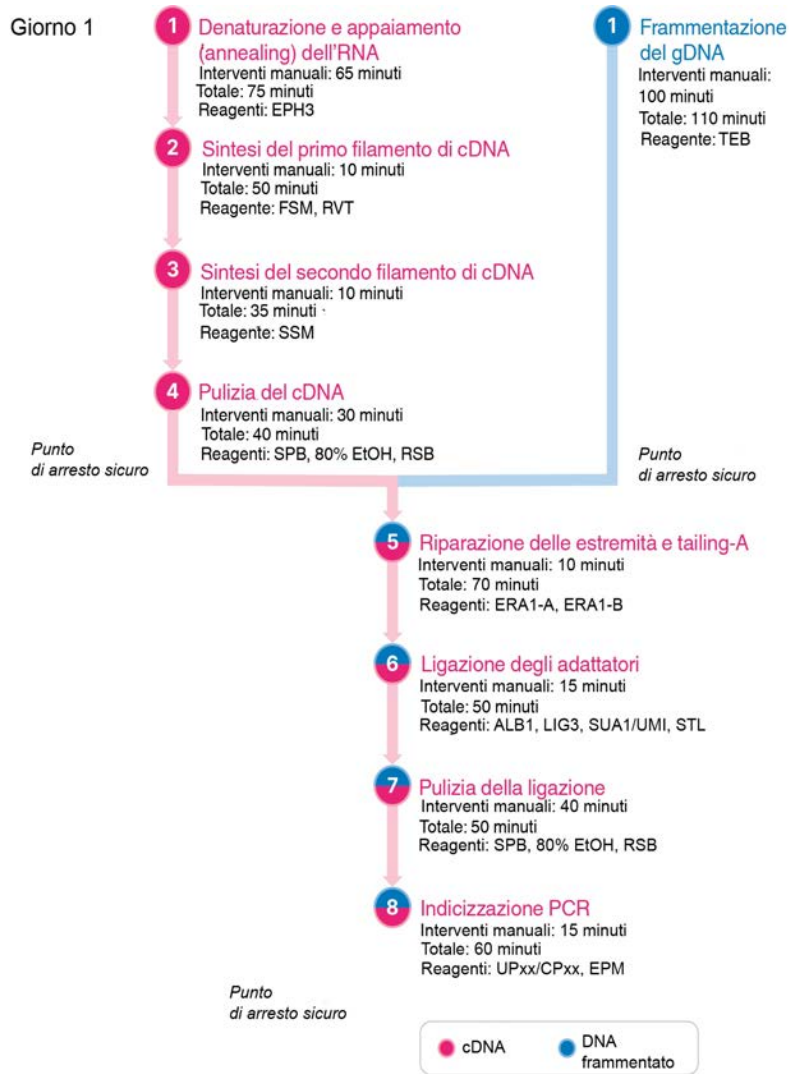
Istruzioni per l'uso

La **Figura 1** e la **Figura 2** mostrano una descrizione generale del flusso di lavoro TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive).

Prima di iniziare il protocollo, rivedere le avvertenze e le precauzioni contenute nell'*Insero della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documento n. 200007789).

Flusso di lavoro di preparazione delle librerie

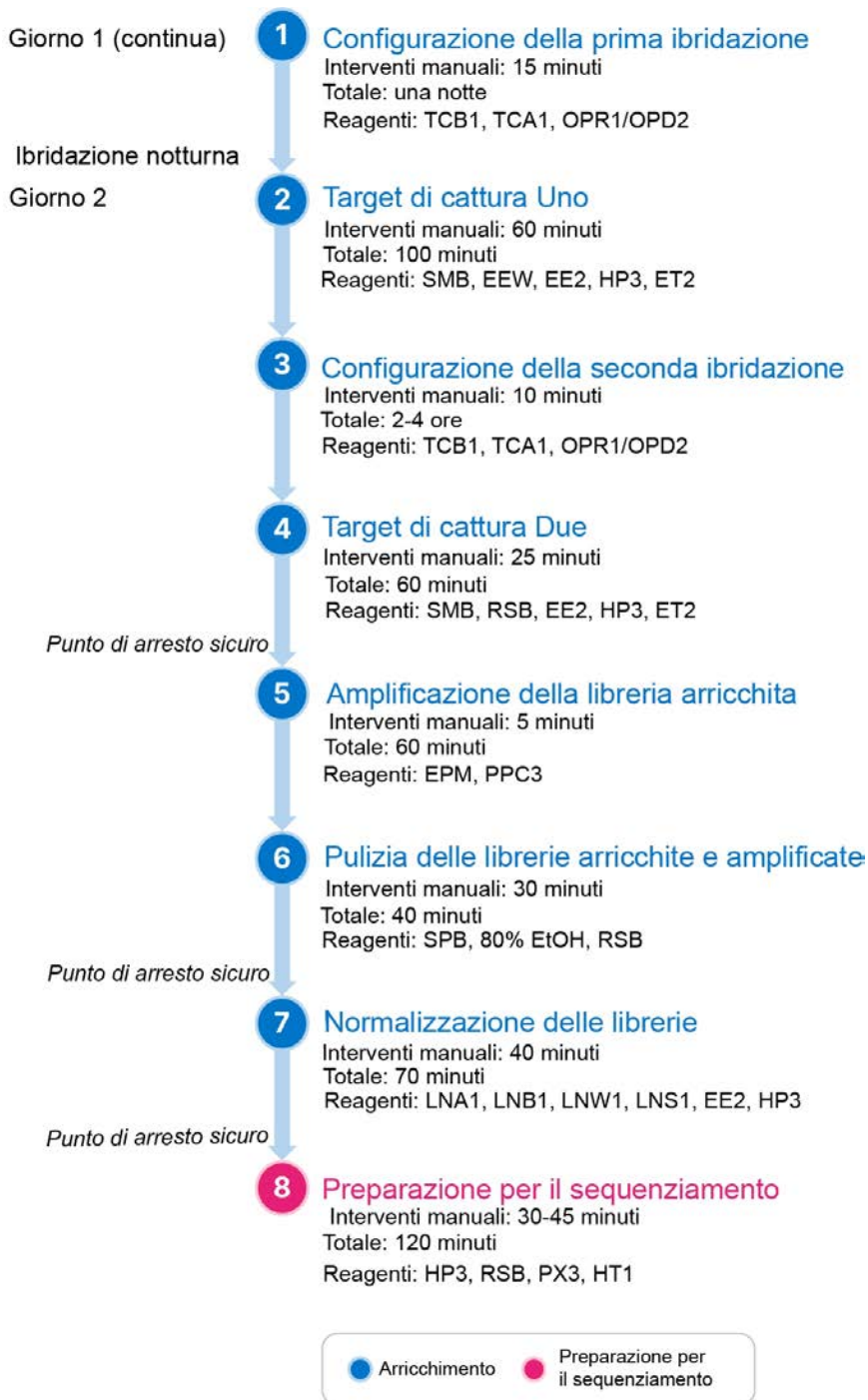
Figura 1 Flusso di lavoro TSO Comprehensive (parte 1)



* I tempi per gli interventi manuali e i tempi totali sono approssimativi.

Flusso di lavoro di arricchimento

Figura 2 Flusso di lavoro TSO Comprehensive (parte 2)



Programmazione dei ciclatori termici

- 1 Prima di avviare il saggio, salvare i seguenti programmi sui ciclatori termici pre- e post-amplificazione.

Tabella 1 Programmi preamplificazione del ciclatore termico

Fase della procedura	Nome del programma	Temperatura del coperchio	Volume di reazione	Parametri del ciclatore termico
Denaturazione e appaiamento (annealing) dell'RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C per 5 minuti • 4 °C per 1 minuto • 4 °C attendere
Sintesi del primo filamento di cDNA	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25 °C per 10 minuti • 42 °C per 15 minuti • 70 °C per 15 minuti • 4 °C per 1 minuto • 4 °C attendere
Sintesi del secondo filamento di cDNA	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16 °C per 25 minuti • 4 °C per 1 minuto • 4 °C attendere

Se la temperatura del coperchio per 2ndSS non può essere impostata su 30 °C, disattivare l'opzione di preriscaldamento del coperchio.

Tabella 2 Programmi post-amplificazione del ciclatore termico

Fase della procedura	Nome del programma	Temperatura del coperchio	Volume di reazione	Parametri del ciclatore termico
Indicizzazione PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C per 30 secondi • 15 cicli di: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C per 10 secondi • 60 °C per 30 secondi • 72 °C per 30 secondi • 72 °C per 5 minuti • 10 °C attendere
Eseguire la prima ibridazione	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C per 10 minuti • 85 °C per 2 min 30 secondi • 75 °C per 2 min 30 secondi • 65 °C per 2 min 30 secondi • 57 °C Attendere per un periodo da 8 a 24 ore
Esecuzione della seconda ibridazione	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C per 10 minuti • 85 °C per 2 min 30 secondi • 75 °C per 2 min 30 secondi • 65 °C per 2 min 30 secondi • 57 °C Attendere per un periodo da 1,5 a 4 ore
Amplificazione della libreria arricchita	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C per 30 s • 18 cicli di: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C per 10 s • 60 °C per 30 s • 72 °C per 30 s • 72 °C per 5 min • 10 °C attendere

Immissione delle informazioni per la corsa

Per impostare una corsa TSO Comprehensive viene utilizzato il software Local Run Manager con lo strumento NextSeq 550Dx. Per ulteriori informazioni, vedere la *Guida al flusso di lavoro di Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (documento n. 200008661)*.

Inserire le informazioni di configurazione della corsa e del campione direttamente nel modulo di analisi TruSight Oncology Comprehensive.

Impostare i parametri della corsa

- 1 Accedere a Local Run Manager sullo strumento o da un computer collegato in rete.
- 2 Selezionare **Create Run** (Crea corsa), quindi selezionare **TSO Comp (EU)**.
- 3 Immettere un nome che identifichi la corsa dal sequenziamento fino all'analisi e che rispetti i seguenti criteri.
 - ▶ 1-40 caratteri.
 - ▶ Solo caratteri alfanumerici, trattini bassi o trattini.
 - ▶ I trattini bassi e i trattini devono essere preceduti e seguiti da un carattere alfanumerico.
 - ▶ Deve essere univoco e diverso da qualsiasi altra corsa dello strumento.
- 4 **[Facoltativo]** Immettere una descrizione della corsa per facilitare l'identificazione della corsa utilizzando i criteri seguenti.
 - ▶ 1-150 caratteri.
 - ▶ Solo caratteri alfanumerici o spazi.
 - ▶ Gli spazi devono essere preceduti e seguiti da un carattere alfanumerico.

Specificare i campioni per la corsa

Specificare i campioni per la corsa utilizzando una delle seguenti opzioni:

- ▶ **Enter samples manually** (Immissione manuale dei campioni): utilizzare la tabella vuota che si trova nella schermata Create Run (Crea corsa).
- ▶ **Import samples** (Importazione dei campioni): individuare un file esterno il cui formato presenti valori separati da virgola (*.csv). Dalla schermata Create Run (Crea corsa) è possibile scaricare un modello.



ATTENZIONE

La mancata corrispondenza tra i campioni e gli index primer genera risultati errati dovuti alla mancata identificazione del campione. Prima di avviare la preparazione della libreria, immettere gli ID dei campioni e assegnare gli indici in Local Run Manager. Durante la preparazione della libreria, prendere nota degli ID dei campioni, degli indici e dell'orientamento dei pozzetti della piastra per riferimento futuro.



ATTENZIONE

Per evitare la perdita di dati, prima di salvare una corsa, assicurarsi che la KB non sia in fase di installazione.

Immissione manuale dei campioni

- 1 Nel campo Sample ID (ID campione), immettere un ID campione univoco che rispetti i seguenti criteri: **Tutti i campioni di controllo devono essere aggiunti per primi**. Per maggiori informazioni, vedere *Campioni di controllo a pagina 7*.
 - ▶ 1-25 caratteri.
 - ▶ Solo caratteri alfanumerici, trattini bassi o trattini.
 - ▶ I trattini bassi e i trattini devono essere preceduti e seguiti da un carattere alfanumerico.
- 2 **[Facoltativo]** Nel campo Sample Description (Descrizione del campione) immettere una descrizione del campione che rispetti i seguenti criteri:
 - ▶ 1-50 caratteri.

- ▶ Utilizzare solo caratteri alfanumerici, trattini, trattini bassi o spazi.
 - ▶ Spazi, trattini bassi e trattini devono essere preceduti e seguiti da un carattere alfanumerico.
- 3 Selezionare un indice per la libreria di DNA e/o la libreria di RNA preparata a partire dal campione. Assicurarsi che i campioni di RNA e DNA siano in colonne separate. Il campo DNA i7+i5 Sequence (Sequenza DNA i7+i5) viene compilato automaticamente dopo aver selezionato un ID indice del DNA. Il campo RNA i7+i5 Sequence (Sequenza RNA i7+i5) viene compilato automaticamente dopo aver selezionato un ID indice dell'RNA. Per informazioni sulla selezione degli ID indici, vedere il riepilogo qui di seguito illustrato e l'*Insero della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU) (documento n. 200007789)*.
- ▶ Per una libreria di campioni di DNA, selezionare un ID indice univoco (indici UPxx o CPxx) dall'elenco a discesa DNA Index ID (ID indice DNA).
 - ▶ Per una libreria di campioni di RNA, selezionare un ID indice univoco (solo UPxx) dall'elenco a discesa RNA index ID (ID indice RNA).
 - ▶ Se nella corsa vi sono tre librerie in totale, attenersi alle linee guida per la selezione degli indici contenute nell'*Insero della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU) (documento n. 200007789)*.
- 4 Utilizzare il campo Tumor Type (Tipo di tumore) per assegnare un tipo di tumore a ogni campione, selezionando il tipo di tumore più specifico tra quelli a disposizione. Vedere *Selezione di un tipo di tumore a pagina 7*.
- 5 Utilizzare il campo Tumor Type (Tipo di tumore) per assegnare uno dei seguenti tipi di controllo a ciascun controllo. Vedere *Campioni di controllo a pagina 7*.
- DNA External Control (DNA esterno di controllo)
 - RNA External Control (RNA esterno di controllo)
 - DNA No-Template Control (Controllo senza template di DNA)
 - RNA No-Template Control (Controllo senza template di RNA)
- Se si utilizza Consumable Prefix DNA Control, il tipo di controllo è DNA External Control (DNA esterno di controllo). Se si utilizza Consumable Prefix RNA Control, il tipo di controllo è RNA External Control (RNA esterno di controllo).
- 6 Assegnare il sesso
- 7 **[Facoltativo]** Per esportare le informazioni sui campioni in un file esterno, selezionare **Export to CSV** (Esporta in CSV).
- 8 Rivedere le informazioni della schermata Create Run (Crea corsa). Informazioni errate potrebbero influire sui risultati.
- 9 Selezionare **Save Run** (Salva corsa).

Importazione dei campioni

- 1 Selezionare **Import CSV** (Importa CSV) e aprire il percorso del file contenente le informazioni relative al campione. È possibile importare due tipi di file:
- Per scaricare un nuovo modello di informazioni relative al campione, selezionare **Download CSV** (Scarica CSV) nella schermata Create Run (Crea corsa). Il file CSV contiene le intestazioni di colonna e il formato per l'importazione richiesti. In ciascuna colonna, immettere le informazioni sui campioni da analizzare nella corsa. Per la colonna Tumor Type (Tipo di tumore), inserire il termine del tipo di tumore o il codice associato (vedere *Scaricamento dei tipi di tumore a pagina 1*). Il campo Tumor Type (Tipo di tumore) viene utilizzato anche per designare i campioni come controlli (vedere *Campioni di controllo a pagina 7*).
 - Utilizzare un file di informazioni sui campioni esportato dal modulo di analisi TSO Comprehensive utilizzando la funzione Export to CSV (Esporta in CSV).
- 2 Nella schermata Create Run (Crea corsa), rivedere le informazioni importate. Informazioni errate potrebbero influire sui risultati.
- 3 **[Facoltativo]** Per esportare le informazioni sui campioni in un file esterno, selezionare **Export to CSV** (Esporta in CSV).
- 4 Selezionare **Save Run** (Salva corsa).

Campioni di controllo

TSO Comprehensive richiede l'uso del controllo del pannello. La designazione di un campione come controllo imposta automaticamente il sesso del campione su Unknown (Sconosciuto). Per assegnare un campione come un controllo, selezionare uno dei quattro tipi di controllo dal campo Tumor Type (Tipo di tumore): DNA External Control (positive DNA control) (DNA esterno di controllo - controllo positivo di DNA), DNA No-Template Control (Controllo senza template di DNA), RNA External Control (positive RNA control) (RNA esterno di controllo - controllo positivo di RNA) o RNA No-Template Control (Controllo senza template di RNA). Per ulteriori informazioni sulla configurazione dei tipi di tumore per tutti i tipi di campioni durante la configurazione della corsa, vedere [Selezione di un tipo di tumore a pagina 7](#).

All'interno di una corsa, è possibile specificare solo un tipo di controllo. Solo una libreria di DNA può essere designata per un DNA External Control (Controllo esterno di DNA) o un DNA No-Template Control (Controllo senza template di DNA). Solo una libreria di RNA può essere designata per un RNA External Control (RNA esterno di controllo) o un RNA No-Template Control (Controllo senza template di RNA). Le librerie designate come controlli senza template di DNA o senza template di RNA non vengono conteggiate per il numero massimo di librerie in una corsa.

Selezione di un tipo di tumore

Per ogni campione, è necessario specificare un tipo di tumore. Ad eccezione dei tipi di controllo, i tipi di tumore disponibili derivano dalla Knowledge Base (KB) installata e potrebbero cambiare con l'aggiornamento della versione della KB.

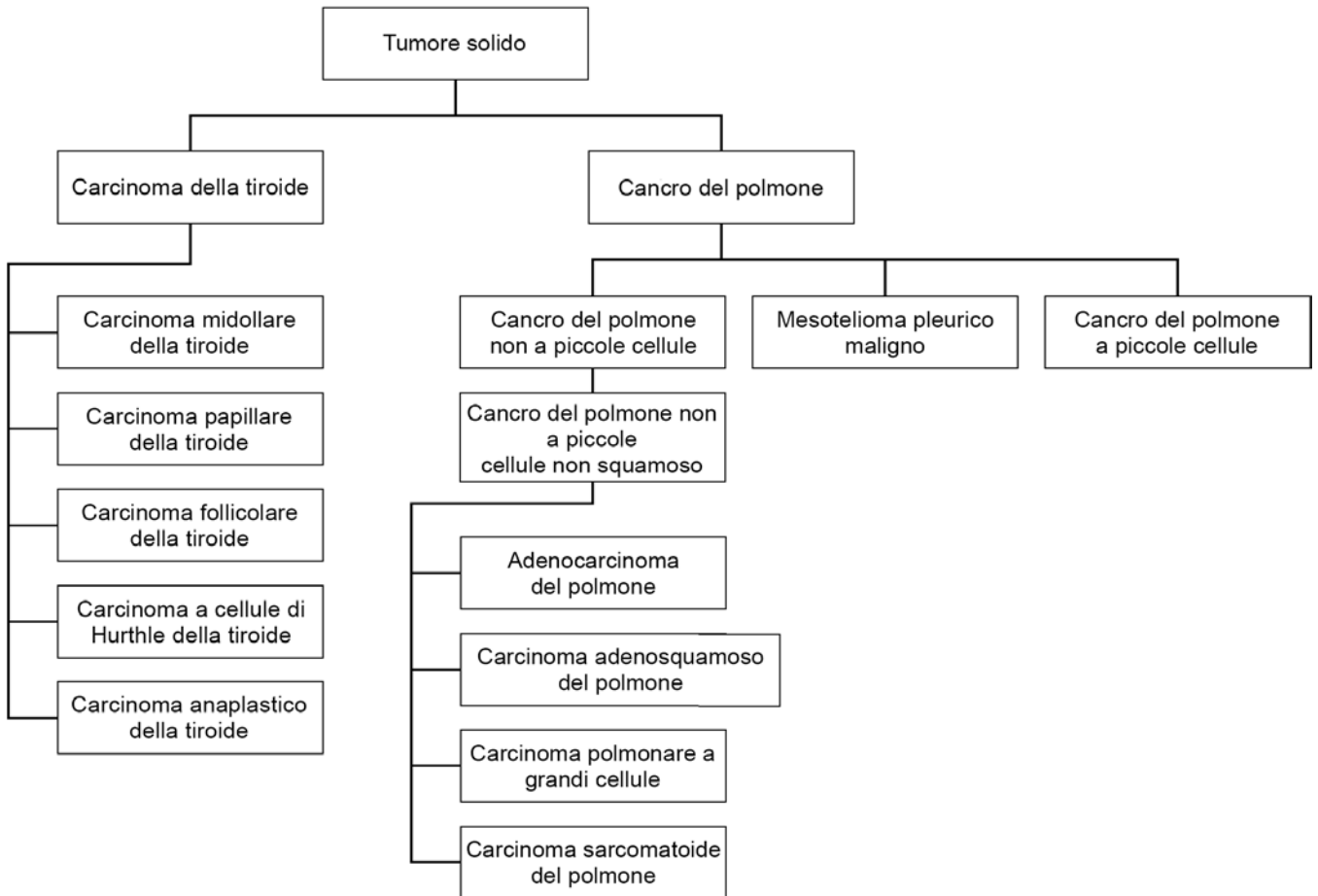


ATTENZIONE

Un'errata selezione del tipo di tumore potrebbe causare risultati errati. Per evitare un'analisi non corretta, risolvere le avvertenze visualizzate quando si specificano i tipi di tumore.

I termini relativi al tipo di tumore derivano da un'ontologia della patologia di tipo gerarchico all'interno della KB; questa è costruita come un insieme di relazioni padre-figlio. Ad esempio, il termine "cancro del polmone non a piccole cellule" è "figlio" del termine "cancro del polmone", in quanto il cancro del polmone non a piccole cellule è un tipo specifico di cancro del polmone. La [Figura 3](#) mostra un esempio di sottoinsieme ontologico di una patologia: il tumore solido è il termine base, mentre i termini "figlio" sono "cancro del polmone" e "carcinoma della tiroide" (altri tipi di tumore non sono qui mostrati). Un termine collegato attraverso relazioni padre-figlio a termini di livello inferiore è detto "antenato". I termini di livello inferiore collegati sono "discendenti" del termine "antenato". Ad esempio, il cancro del polmone è un antenato dell'adenocarcinoma del polmone e del cancro del polmone a piccole cellule, mentre il carcinoma midollare della tiroide è un discendente del carcinoma della tiroide e del tumore solido.

Figura 3 Esempio di sottoinsieme ontologico di una patologia



Il tipo di tumore selezionato per il campione di un paziente ha un impatto su:

- ▶ Quali usi previsti dei test diagnostici di accompagnamento vengono valutati per il campione. Solo i campioni dei pazienti con un tipo di tumore che è una corrispondenza esatta o un "discendente" del tipo di tumore per un uso previsto dei test diagnostici di accompagnamento verranno valutati per la dichiarazione.
- ▶ Quali varianti del profilo tumorale sono incluse nel report TSO Comprehensive.

Le istruzioni seguenti descrivono la procedura per la selezione di un tipo di tumore nella schermata Create Run (Crea corsa). È possibile configurare il tipo di tumore anche importando un file CSV contenente un tipo di tumore (vedere [Importazione dei campioni a pagina 6](#)).

- 1 Per visualizzare i tipi di tumore disponibili fare doppio clic sulla cella Tumor Type (Tipo di tumore) nella riga del campione. I tipi di tumore disponibili vengono visualizzati in un elenco gerarchico organizzato in ordine alfabetico.
Il campo Tumor Type (Tipo di tumore) consente anche di designare un tipo di controllo per i campioni di controllo (vedere [Campioni di controllo a pagina 7](#)).
- 2 Individuare e selezionare il tipo di tumore desiderato interagendo con l'elenco oppure utilizzando la barra di ricerca nella parte superiore della finestra Tumor Type (Tipo di tumore).

Preparazione delle fasi del protocollo

- 1 Decontaminare accuratamente le aree di lavoro con un detergente inibitore di RNasi/DNasi.

**ATTENZIONE**

Tutte le procedure del flusso di lavoro richiedono un ambiente privo di RNasi/DNasi.

- 2 Impostare i programmi di preamplificazione del ciclatore termico. Vedere *Programmazione dei ciclatori termici a pagina 4*.
- 3 Impostare il sonificatore a ultrasuoni secondo le istruzioni del produttore.
- 4 Se si elaborano solo campioni di DNA, passare direttamente alla fase *Frammentazione del gDNA a pagina 13*.
- 5 Rimuovere i controlli RNA dal luogo deputato alla conservazione.
- 6 Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 3 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (n. codice 20031127)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
EPH3	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Denaturazione e appaiamento (annealing) dell'RNA
FSM	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Sintesi del primo filamento di cDNA
RVT	Da -25 °C a -15 °C	Conservare in ghiaccio.	Sintesi del primo filamento di cDNA
SSM	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Sintesi del secondo filamento di cDNA

Tabella 4 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (n. codice 20031119)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SPB (etichetta verde chiaro)	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Pulizia del cDNA
RSB	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Pulizia del cDNA

Denaturazione e appaiamento (annealing) dell'RNA

Preparazione

- 1 Preparare i seguenti reagenti:
 - ▶ EPH3: mettere da parte.
 - ▶ FSM: miscelare tramite vortex. Centrifugare brevemente, quindi pipettare per miscelare. Verificare la presenza di precipitati. Se sono presenti, pipettare per miscelare fino a far dissolvere i precipitati.
 - ▶ RVT: centrifugare brevemente, quindi pipettare per miscelare. Conservare in ghiaccio.

NOTA RVT è una soluzione viscosa. Pipettare sempre lentamente per evitare di creare bolle.

- 2 Per preparare una miscela master FSM+RVT, combinare i seguenti volumi in una provetta da microcentrifuga.

Tabella 5 Miscela master FSM+RVT

Componente miscela master	3 campioni di RNA (µl)	8 campioni di RNA (µl)	16 campioni di RNA (µl)	24 campioni di RNA (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, vedere la sezione Manipolazione dei reagenti contenuta nell'*Insero della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documento n. 200007789).

- 3 Pipettare dieci volte per miscelare.
- 4 Posizionare la miscela master FSM+RVT in ghiaccio fino al momento della fase *Sintesi del primo filamento di cDNA a pagina 10*.

Procedura

- 1 Scongellare i campioni di RNA estratti e i controlli di RNA in ghiaccio.
Per la parte restante del protocollo, elaborare i controlli di RNA come campioni.
Per quantificare i campioni, vedere *l'Insero della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU) (documento n. 200007789)*.
- 2 Pipettare ogni campione di RNA 10 volte per miscelare.
- 3 Preparare 40 ng di ciascun campione di RNA in un volume finale di 8,5 µl (4,7 ng/µl) utilizzando acqua priva di DNasi/RNasi.
Per i controlli dell'RNA, utilizzare la concentrazione indicata sull'etichetta della provetta.
- 4 Apporre un'etichetta "CF" (Frammenti di cDNA) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
- 5 Aggiungere 8,5 µl di ciascun campione di RNA a un unico pozzetto della piastra CF PCR.
- 6 Durante la configurazione della corsa, assicurarsi che il layout della piastra campioni e gli indici di ogni campione corrispondano alla corsa pianificata in Local Run Manager.
- 7 Miscelare EPH3 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 8 Aggiungere 8,5 µl di EPH3 a ciascun pozzetto del campione.
- 9 Applicare il sigillo adesivo alla piastra CF PCR.



ATTENZIONE

Assicurarsi di sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.

- 10 Agitare a 1.200 giri/min per un minuto.
- 11 Centrifugare a 280 × g per un minuto.
- 12 Posizionare sul ciclatore termico ed eseguire il programma LQ-RNA.
Vedere *Programmazione dei ciclatori termici a pagina 4*.
- 13 Quando i campioni raggiungono i 4 °C, attendere un minuto, quindi passare immediatamente alla fase successiva.

Sintesi del primo filamento di cDNA

Procedura

Data e ora di inizio _____

- 1 Rimuovere la piastra CF PCR dal ciclatore termico.
- 2 Pipettare 5 volte per miscelare la miscela master FSM+RVT.
- 3 Aggiungere 8 µl di miscela master FSM+RVT a ciascun pozzetto del campione.
- 4 Pipettare 5 volte per mescolare.
- 5 Eliminare la miscela master FSM+RVT rimanente.
- 6 Applicare il sigillo adesivo alla piastra CF PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
- 7 Agitare a 1.200 giri/min per un minuto.
- 8 Centrifugare a 280 × g per un minuto.
- 9 Posizionare su un ciclatore termico ed eseguire il programma 1stSS.
Vedere *Programmazione dei ciclatori termici a pagina 4*.
- 10 Quando i campioni raggiungono i 4 °C, passare immediatamente alla fase successiva.
I campioni del primo filamento possono essere tenuti a 4 °C per un massimo di cinque minuti.

Sintesi del secondo filamento di cDNA

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Preparare il seguente reagente:

- ▶ **SSM:** capovolgere 10 volte per mescolare. Centrifugare brevemente.

Procedura

- 1 Rimuovere la piastra CF PCR dal ciclatore termico.
- 2 Aggiungere 25 µl di SSM a ciascun pozzetto del campione.
- 3 Applicare il sigillo adesivo alla piastra CF PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
- 4 Agitare a 1.200 giri/min per un minuto.
- 5 Centrifugare a 280 × g per un minuto.
- 6 Posizionare su un ciclatore termico ed eseguire il programma 2ndSS.
Vedere *Programmazione dei ciclatori termici a pagina 4*.
- 7 Quando i campioni raggiungono i 4 °C, attendere un minuto, quindi passare immediatamente alla fase successiva.

Pulizia del cDNA

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Preparare i seguenti reagenti:
 - ▶ **SPB:** verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
 - ▶ **RSB:** mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
- 2 Preparare al momento una soluzione all'80% di EtOH in una provetta conica da 15 o 50 ml.

Reagente	3 campioni	8 campioni	16 campioni	24 campioni
Alcol etilico al 100%, puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Acqua priva di DNasi/RNasi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Miscelare l'EtOH all'80% preparato al momento tramite vortex.
- 4 Apporre un'etichetta "BIND1" (legame di cDNA) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
- 5 Coprire e mettere da parte.
- 6 Preparare il magnete.

Procedura

Legame

- 1 Rimuovere la piastra CF PCR dal ciclatore termico.
- 2 Miscelare tramite vortex l'SPB per un minuto per risospendere le microsfere.
- 3 Aggiungere immediatamente 90 µl di SPB a ciascun pozzetto del campione della piastra BIND1 MIDI.
Se si utilizza una vaschetta per dispensare SPB, includere un fattore in eccesso di 1,05 quando si aliquota sufficiente materiale per campione. Una volta aggiunto SPB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.
- 4 Trasferire l'intero volume (50 µl) di ciascun campione dalla piastra CF PCR al pozzetto corrispondente della piastra BIND1 MIDI.
- 5 Eliminare la piastra CF PCR vuota.
- 6 Applicare il sigillo adesivo alla piastra BIND1 PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 7 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 8 Incubare a temperatura ambiente per cinque minuti.
- 9 Posizionare la piastra BIND1 MIDI su un supporto magnetico per cinque minuti.

- 10 Usare una pipetta P200 impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

Lavaggio

- 1 Lavare le microsfere come descritto di seguito.
 - a Tenere sul supporto magnetico e aggiungere a ciascun pozzetto 200 µl di EtOH all'80% preparato al momento.
 - b Attendere 30 secondi.
 - c Rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto.
- 2 Lavare le microsfere una **seconda** volta.
- 3 Rimuovere l'EtOH residuo da ogni pozzetto. Utilizzare una pipetta P20 con punte fini.
- 4 Eliminare l'EtOH all'80% non utilizzato.

Eluizione

- 1 Rimuovere la piastra BIND1 MIDI dal supporto magnetico.
- 2 Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
- 3 Aggiungere 22 µl di RSB a ciascun pozzetto del campione.
- 4 Applicare il sigillo adesivo alla piastra BIND1 PCR. Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 5 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 6 Incubare a temperatura ambiente per due minuti.
- 7 Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
- 8 Apporre un'etichetta "PCF" (frammenti di cDNA purificati) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti. Se ci si ferma al **PUNTO DI ARRESTO SICURO** a pagina 12, usare una piastra PCR.
- 9 Trasferire 20 µl di eluato da ogni pozzetto del campione della piastra BIND1 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra PCF.
- 10 Eliminare la piastra BIND1 MIDI vuota.
- 11 Aggiungere 30 µl di RSB a ciascun pozzetto del campione della piastra PCF.
- 12 Pipettare 10 volte per mescolare.
- 13 Applicare il sigillo adesivo alla piastra PCF e tenerla in ghiaccio.
- 14 Riportare EPH3, FSM, RVT e SSM nel luogo deputato alla conservazione.
- 15 Se si stanno elaborando solo campioni derivati da RNA (cDNA) e non ci si ferma al punto di arresto sicuro, procedere con la fase **Riparazione delle estremità e tailing-A** a pagina 15.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se è necessario fermarsi, centrifugare la piastra PCF PCR a 280 × g per un minuto e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 7 giorni.

Data e ora di arresto _____

Preparazione delle fasi del protocollo

- 1 Rimuovere i controlli DNA dal luogo deputato alla conservazione.
- 2 Rimuovere la provetta di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 6 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (n. codice 20031119)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
TEB	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Frammentazione del gDNA

Frammentazione del gDNA

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Per quantificare i campioni, attenersi scrupolosamente alle raccomandazioni contenute nell'*Inserto della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU) (documento n. 200007789)*.
- 2 Preparare il seguente reagente:
 - ▶ **TEB:** invertire o miscelare tramite vortex.

Procedura

Preparare la piastra

- 1 **Selezionare una delle seguenti tre opzioni per preparare la piastra:**
 - ▶ **Opzione 1:** elaborare i campioni di gDNA contemporaneamente ai campioni di cDNA nella piastra PCF MIDI.
 - a Apporre un'etichetta "LP" (Preparazione della libreria) alla piastra PCF MIDI.
 - b Posizionare in ghiaccio e mettere da parte per utilizzarli nella fase *Trasferimento del DNA frammentato a pagina 14*.
 - ▶ **Opzione 2:** elaborare i campioni di gDNA contemporaneamente ai campioni di cDNA e la piastra PCF PCR è congelata.
 - a Scongellare la piastra PCF PCR a temperatura ambiente.
 - b Centrifugare a 280 x g per un minuto.
 - c Pipettare 10 volte per miscelare.
 - d Apporre un'etichetta "LP" (Preparazione della libreria) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
 - e Trasferire tutti i 50 µl di ciascun campione dalla piastra PCF PCR al pozzetto corrispondente della piastra LP MIDI.
 - f Eliminare la piastra PCF PCR.
 - g Applicare il sigillo adesivo alla piastra e conservarla in ghiaccio fino al *Trasferimento del DNA frammentato a pagina 14*.
 - ▶ **Opzione 3:** elaborare solo campioni di gDNA.
 - a Apporre un'etichetta "LP" (Preparazione della libreria) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
 - b Se ci si ferma al *PUNTO DI ARRESTO SICURO a pagina 14*, usare una piastra PCR.
 - c Coprirla e metterla da parte per utilizzarla nella fase *Trasferimento del DNA frammentato a pagina 14*.

Diluizione del gDNA

- 1 Scongellare i campioni di gDNA e i controlli del DNA a temperatura ambiente.
Per la parte rimanente del protocollo, elaborare i controlli di DNA come campioni.
- 2 Pipettare ogni campione di gDNA 10 volte per miscelare.
- 3 Centrifugare brevemente la provetta per raccogliere le goccioline.
- 4 Invertire o miscelare tramite vortex il TEB.
- 5 Utilizzare il TEB per preparare 40 ng di ogni campione di gDNA in un volume finale di 52 µl (0,77 ng/µl).
Il saggio richiede una concentrazione minima di estrazione di 3,33 ng/µl, per consentire almeno 40 µl di TEB dei 52 µl di volume. Per i controlli del DNA, utilizzare la concentrazione indicata sull'etichetta della provetta. Per evitare perdite di campione, non pipettare meno di 2 µl di campione in questa diluizione.

Frammentazione

- 1 Aggiungere 52 µl di ciascun campione di gDNA in un distinto pozzetto della provetta del sonificatore a ultrasuoni.
- 2 Prendere nota dell'orientamento della striscia.
- 3 Frammentare il gDNA in frammenti con un sonificatore a ultrasuoni.

Trasferimento del DNA frammentato

- 1 Durante la configurazione della corsa, assicurarsi che il layout della piastra campioni e gli indici di ogni campione corrispondano alla corsa pianificata in Local Run Manager.
- 2 Per recuperare il campione, seguire le istruzioni del produttore del sonificatore a ultrasuoni. Per alcuni tipi di provette del sonificatore a ultrasuoni, potrebbe essere necessario eseguire la centrifugazione per consolidare il campione all'interno.
- 3 Per ogni campione di gDNA frammentato, utilizzare una pipetta p20 con punte fini per eseguire 3 trasferimenti di 16,7 µl in un pozzetto vuoto della piastra LP MIDI.
- 4 Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP MIDI.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se è necessario fermarsi, applicare un sigillo adesivo alla piastra LP PCR e centrifugare a 280 × g per un minuto. Conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 7 giorni.

Data e ora di arresto _____

Preparazione delle fasi del protocollo

- 1 Preparare un contenitore portagiaccio.
- 2 Rimuovere la provetta di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 7 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (n. codice 20031118)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
ERA1-A	Da -25 °C a -15 °C	Conservare in ghiaccio.	Riparazione delle estremità e tailing-A
ERA1-B	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Riparazione delle estremità e tailing-A
ALB1	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Ligazione degli adattatori
LIG3	Da -25 °C a -15 °C	Conservare in ghiaccio.	Ligazione degli adattatori
SUA1 (tappo blu)	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Ligazione degli adattatori
UMI (tappo bianco)	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Ligazione degli adattatori
STL	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Ligazione degli adattatori
EPM	Da -25 °C a -15 °C	Conservare in ghiaccio.	Indicizzazione PCR

Tabella 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (n. codice 20031119)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SPB (etichetta verde chiaro)	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Pulizia della ligazione
RSB	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Pulizia della ligazione

Tabella 9 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (n. codice 20031120)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
UPxx	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare le provette di index primer appropriate a temperatura ambiente.	Indicizzazione PCR

Tabella 10 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (n. codice 20031126)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
CPxx	Da -25 °C a -15 °C	Scongelare le provette di index primer appropriate a temperatura ambiente.	Indicizzazione PCR

Riparazione delle estremità e tailing-A

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Preriscaldare due incubatori per microcampioni con inserti di blocco termico MIDI nel modo descritto di seguito.
 - ▶ Preriscaldare un incubatore per microcampioni a 30 °C.
 - ▶ Preriscaldare un incubatore per microcampioni a 72 °C.
- 2 Preparare i seguenti reagenti:
 - ▶ ERA1-A: centrifugare brevemente, quindi pipettare per miscelare. Conservare in ghiaccio.
 - ▶ ERA1-B: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente. Verificare la presenza di precipitati. Se presenti, scaldare la provetta a 37 °C, quindi pipettare per miscelare fino al dissolvimento dei precipitati.
- 3 Preparare la miscela master ERA1 in una provetta da microcentrifuga.

Tabella 11 Miscela master ERA1

Componente miscela master	3 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, vedere la sezione Manipolazione dei reagenti contenuta nell'*Inserto della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documento n. 200007789).

- 4 Pipettare lentamente 10 volte per miscelare, centrifugare brevemente e poi posizionare la miscela master ERA1 in ghiaccio.
- 5 Per preparare la piastra, selezionare l'opzione appropriata tra le (due) seguenti:
 - ▶ **Opzione 1:** se i campioni sono in una piastra MIDI.
 - a Rietichettare la piastra MIDI con l'indicazione LP2 (Preparazione della libreria 2).
Se alcuni campioni sono in piastre MIDI separate, spostare tutti i campioni in pozzetti separati della stessa piastra MIDI in base al layout della piastra.
 - ▶ **Opzione 2:** se la piastra è congelata.
 - a Scongelare la piastra PCF PCR o la piastra LP PCR a temperatura ambiente.
 - b Centrifugare la piastra a 280 × g per un minuto.
 - c Pipettare 10 volte per miscelare.
 - d Apporre un'etichetta "LP2" (Preparazione della libreria 2) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
 - e Trasferire tutti i 50 µl di ciascun campione dalla piastra PCF PCR o dalla piastra LP PCR al pozzetto corrispondente della piastra LP2 MIDI.
 - f Eliminare la piastra PCF PCR o LP PCR.

Procedura

- 1 Aggiungere 10 µl di miscela master ERA1 a ciascun pozzetto della piastra LP2 MIDI.
- 2 Eliminare la miscela master ERA1 rimanente.
- 3 Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.

- 4 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 5 Incubare nell'incubatore per microcampioni preriscaldato a 30 °C per 30 minuti.
- 6 Trasferire immediatamente in un secondo incubatore per microcampioni preriscaldato e incubare a 72 °C per 20 minuti.
- 7 Posizionare la piastra LP2 MIDI su ghiaccio per cinque minuti.

Ligazione degli adattatori

Questo processo lega gli adattatori alle estremità dei frammenti di cDNA e/o gDNA.

Il saggio TSO Comprehensive include adattatori SUA1 e adattatori UMI.

- ▶ Per i campioni di RNA, utilizzare gli adattatori SUA1.
- ▶ Per i campioni di DNA, utilizzare gli adattatori UMI.

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Preparare i seguenti reagenti:
 - ▶ ALB1: miscelare tramite vortex per almeno 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ LIG3: centrifugare brevemente, quindi pipettare per miscelare. Conservare in ghiaccio.
 - ▶ SUA1: miscelare tramite vortex per almeno 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ UMI: miscelare tramite vortex per almeno 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ STL: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.

Procedura

- 1 Rimuovere la piastra LP2 MIDI dal ghiaccio.
- 2 Aggiungere 60 µl di ALB1 a ciascun pozzetto del campione della piastra LP2 MIDI, assicurandosi di pipettare lentamente.
- 3 Aggiungere 5 µl di LIG3 a ciascun pozzetto del campione.
- 4 Aggiungere gli adattatori.
 - Non** combinare diversi tipi di adattatore.
 - **Pozzetti campione di RNA:** 10 µl di SUA1 (tappo blu) per ogni campione derivato da RNA.
 - **Pozzetti campione di DNA:** 10 µl di UMI (tappo bianco) per ogni campione derivato da DNA.
- 5 Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 6 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 7 Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti.
- 8 Miscelare l'STL tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 9 Aggiungere 5 µl di STL a ciascun pozzetto del campione della piastra LP2 MIDI.
- 10 Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
- 11 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.

Pulizia della ligazione

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Preparare i seguenti reagenti:
 - ▶ SPB: assicurarsi che le microsferi siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
 - ▶ RSB: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
- 2 Preparare al momento una soluzione all'80% di EtOH in una provetta conica da 15 o 50 ml.

Reagente	3 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
Alcol etilico al 100%, puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Acqua priva di DNasi/RNasi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Miscelare l'EtOH all'80% preparato al momento tramite vortex.
- 4 Preparare il magnete.

Procedura

Legame

- 1 Miscelare tramite vortex l'SPB per un minuto per rispendere le microsfere.
- 2 Aggiungere immediatamente 112 µl di SPB a ciascun pozzetto del campione nella piastra LP2 MIDI.
Se si utilizza una vaschetta per dispensare SPB, includere un fattore in eccesso di 1,05 quando si aliquota sufficiente materiale per campione. Una volta aggiunto SPB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.
- 3 Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 4 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 5 Incubare a temperatura ambiente per cinque minuti.
- 6 Posizionare la piastra LP2 MIDI sul supporto magnetico per 10 minuti.
- 7 Usare una pipetta P200 impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

Lavaggio

- 1 Lavare le microsfere come descritto di seguito.
 - a Tenerle sul supporto magnetico e aggiungere a ciascun pozzetto 200 µl di EtOH all'80% preparato al momento.
 - b Attendere 30 secondi.
 - c Rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto senza alterare il pellet di microsfere.
- 2 Lavare le microsfere una **seconda** volta.
- 3 Rimuovere l'EtOH residuo da ogni pozzetto.
Utilizzare una pipetta P20 con punte fini.
- 4 Eliminare l'EtOH all'80% non utilizzato.

Eluizione

- 1 Rimuovere la piastra LP2 MIDI dal supporto magnetico.
- 2 Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
- 3 Aggiungere 27,5 µl di RSB a ciascun pozzetto del campione.
- 4 Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 5 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 6 Incubare a temperatura ambiente per due minuti.
- 7 Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
- 8 Apporre un'etichetta "LS" (Campioni di libreria) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
- 9 Trasferire 25 µl di ogni eluato dalla piastra LP2 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra LS PCR.
- 10 Eliminare la piastra LP2 MIDI vuota.
- 11 Applicare il sigillo adesivo alla piastra LS PCR.

Indicizzazione PCR

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Preparare i seguenti reagenti:
 - ▶ EPM: conservare in ghiaccio.
 - ▶ UPxx: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente. UPxx è l'index primer selezionato nella schermata Create Run (Crea corsa) nel software Local Run Manager durante la configurazione della corsa.
 - ▶ CPxx: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente. CPxx è l'index primer selezionato nella schermata Create Run (Crea corsa) nel software Local Run Manager durante la configurazione della corsa.
- 2 Assicurarsi che gli indici per ciascun campione corrispondano alla corsa pianificata in Local Run Manager durante la configurazione della corsa. Per la selezione degli indici, attenersi scrupolosamente alle istruzioni contenute nell'*Inserito della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documento n. 200007789).



ATTENZIONE

Le discordanze tra campioni e index primer causano la segnalazione di risultati errati a causa della perdita dell'identificazione positiva del campione.

Procedura

- 1 Aggiungere 5 µl dell'index primer appropriato (UPxx o CPxx) al pozzetto del campione corrispondente nella piastra LS PCR in base agli indici selezionati nella schermata Create Run (Crea corsa) nel software Local Run Manager durante la configurazione della corsa.



ATTENZIONE

Maneggiare e aprire solo una provetta di index primer alla volta. Richiudere ogni provetta di indice immediatamente dopo l'uso. Non combinare gli index primer tra loro.

- 2 Miscelare l'EPM tramite vortex per 5 secondi, quindi centrifugare brevemente.
- 3 Aggiungere 20 µl di EPM a ciascun pozzetto del campione.
- 4 Applicare il sigillo adesivo alla piastra LS PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
- 5 Agitare a 1.200 giri/min per un minuto.
- 6 Ricollocare i reagenti di preamplificazione nel luogo deputato alla conservazione.



ATTENZIONE

Eseguire tutti i passaggi successivi in un'area post-amplificazione per evitare il carry-over del prodotto dell'amplificazione.

- 7 Centrifugare la piastra LS PCR a 280 × g per un minuto.
- 8 Posizionare sul ciclatore termico post amplificazione preprogrammato ed eseguire il programma I-PCR.
Vedere *Programmazione dei ciclatori termici a pagina 4*.

NOTA Se si prosegue con la fase di *Configurazione della prima ibridazione a pagina 19*, seguire le istruzioni di scongelamento nella sezione Preparazione delle fasi del protocollo.

- 9 Al termine del programma I-PCR, centrifugare la piastra LS PCR a 280 × g per un minuto.
- 10 Rietichettare la piastra apponendo l'indicazione ALS (Campioni di libreria amplificati).

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se è necessario fermarsi, centrifugare conservare la piastra ALS PCR a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

Data e ora di arresto _____

Preparazione delle fasi del protocollo

- 1 Assicurarsi che i programmi di post-amplificazione del ciclatore termico siano impostati. Vedere *Programmazione dei ciclatori termici a pagina 4.*
- 2 Rimuovere la provetta di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 12 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
TCB1	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione

Tabella 13 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
TCA1	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione

Tabella 14 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n. codice 20031122)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
OPR1 (tappo rosso)	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione
OPD2 (tappo bianco)	Da -25 °C a -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione

Configurazione della prima ibridazione**Preparazione**

Data e ora di inizio _____

- 1 Preparare i seguenti reagenti:
 - ▶ TCB1: scaldare la provetta a 37 °C per cinque minuti. Miscelare tramite vortex per 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ TCA1: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ OPR1: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ OPD2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 2 Se la piastra ALS PCR è stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, quindi centrifugare a 280 × g per un minuto. Quindi pipettare per miscelare.
- 3 Apporre un'etichetta "HYB1" (Ibridazione 1) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.

Procedura

- 1 Trasferire 20 µl di ciascuna libreria cDNA e/o gDNA dalla piastra ALS PCR al pozzetto corrispondente della piastra HYB1 PCR.
- 2 Applicare il sigillo adesivo alla piastra ALS PCR e metterla da parte. Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 3 Verificare che non siano presenti precipitati nel TCB1. Se presenti, scaldare nuovamente la provetta e agitarla tramite vortex fino a far dissolvere i cristalli.
- 4 Aggiungere 15 µl di TCB1 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra HYB1 PCR.

- 5 Aggiungere 10 µl di TCA1 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra HYB1 PCR.
- 6 Aggiungere le sonde.
 - Non** combinare diversi tipi di sonde.
 - ▶ **Pozzetti della libreria di RNA:** 5 µl di OPR1 a ogni libreria derivata dall'RNA.
 - ▶ **Pozzetti della libreria di DNA:** 5 µl di OPD2 a ogni libreria derivata dal DNA.
- 7 Applicare il sigillo adesivo alla piastra HYB1 PCR.

**ATTENZIONE**

Assicurarsi di sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.

- 8 Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
- 9 Posizionare sul ciclatore termico ed eseguire il programma HYB1.
 - Vedere *Programmazione dei ciclatori termici a pagina 4.*
- 10 Ibridare a 57 °C per un minimo di 8 ore e fino a un massimo di 24 ore.
- 11 Ricollocare i reagenti di ibridazione nel luogo deputato alla conservazione.
- 12 Conservare la piastra ALS PCR a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

Preparazione delle fasi del protocollo

- 1 All'inizio del secondo giorno, rimuovere la provetta di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SMB (etichetta blu scuro)	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Target di cattura Uno Target di cattura Due
ET2	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno Target di cattura Due
HP3	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno Target di cattura Due Normalizzazione delle librerie
TCB1	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione
RSB	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Target di cattura Due Pulizia delle librerie arricchite e amplificate

Tabella 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
EE2	Da -25 °C a -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno Target di cattura Due Normalizzazione delle librerie
EEW	Da -25 °C a -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno
TCA1	Da -25 °C a -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione

Tabella 17 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n. codice 20031122)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
OPR1 (tappo rosso)	Da -25 °C a -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione
OPD2 (tappo bianco)	Da -25 °C a -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione

Target di cattura Uno

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Preriscaldare un incubatore per microcampioni con un inserto di blocco termico MIDI a 57 °C.
- 2 Preparare i seguenti reagenti:
 - ▶ EEW: miscelare tramite vortex per un minuto.
 - ▶ EE2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ HP3: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ SMB: verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
 - ▶ Per questa procedura, assicurarsi di utilizzare **SMB** e non SPB.
 - ▶ ET2: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
- 3 Preparare al momento la miscela di eluizione EE2+HP3 in una provetta per microcentrifuga.

Tabella 18 Miscela di eluizione EE2+HP3 per target di cattura Uno

Componente della miscela di eluizione	3 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1.368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, vedere la sezione Manipolazione dei reagenti contenuta nell'*Inserto della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documento n. 200007789).

- 4 Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2+HP3, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte per la fase *Eluizione*.
- 5 Apporre un'etichetta "CAP1" (Cattura 1) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
- 6 Preparare il magnete.

Procedura

Legame

- 1 Rimuovere la piastra HYB1 PCR dal ciclatore termico.
- 2 Centrifugare la piastra HYB1 PCR a 280 × g per un minuto.
- 3 Miscelare tramite vortex l'SMB per un minuto per risospendere le microsfere.
- 4 Aggiungere immediatamente 150 µl di SMB a ciascun pozzetto della libreria della piastra CAP1 MIDI.
Se per dispensare SMB si utilizzano vaschette, includere un fattore di eccesso di 1,15 quando si aliquota sufficiente materiale per campione. Una volta aggiunto SMB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.
- 5 Impostare la pipetta a 50 µl e trasferire l'intero volume di ciascuna libreria dalla piastra HYB1 PCR al pozzetto corrispondente della piastra CAP1 MIDI.
- 6 Eliminare la piastra HYB1 PCR vuota.
- 7 Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP1 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
- 8 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 9 Incubare nell'incubatore per microcampioni preriscaldato a 57 °C per 25 minuti.
- 10 Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
- 11 Mentre la piastra CAP1 MIDI si trova sul supporto magnetico, utilizzare una pipetta P200 impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto della libreria senza alterare il pellet di microsfere.



ATTENZIONE

Passare immediatamente alla fase successiva (**Lavaggio**). Non lasciare il pellet di microsfere a riposo per un periodo di tempo eccessivo senza la presenza di liquido.

Lavaggio

- 1 Lavare le microsfere come descritto di seguito.
 - a Rimuovere la piastra CAP1 MIDI dal supporto magnetico.
 - b Aggiungere 200 µl di EEW a ciascun pozzetto.
 - c Impostare il volume della pipetta su 150 µl e pipettare almeno 10 volte per mescolare. Assicurarsi che tutte le microsfere siano risospese.



ATTENZIONE

Assicurarsi che non siano presenti pellet di microsfere; per farlo, aspirare attentamente la soluzione totale di microsfere del pozzetto nella punta. Quindi ispezionare il fondo di ogni pozzetto per assicurarsi che non sia presente del pellet. Durante le fasi di lavaggio, per far fuoriuscire il pellet, disporre ad angolo la punta della pipetta verso il pellet di microsfere. Assicurarsi che il pellet di microsfere sia completamente in soluzione. La soluzione deve avere un aspetto marrone scuro e una consistenza omogenea.

- d Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP1 MIDI.
 - e Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
 - f Agitare a 1.800 giri/min per quattro minuti.
 - g Incubare in un incubatore per microcampioni a 57 °C per cinque minuti.
 - h Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
 - i Tenere sul supporto magnetico e rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto senza alterare il pellet di microsfere.
- 2 Lavare le microsfere una **seconda** volta.
 - 3 Lavare le microsfere una **terza** volta.
 - 4 Rimuovere il surnatante residuo da ogni pozzetto.
Utilizzare una pipetta P20 con punte fini.

Eluizione

- 1 Rimuovere la piastra CAP1 MIDI dal supporto magnetico.
- 2 Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2+HP3 preparata al momento, quindi centrifugare brevemente.
- 3 Aggiungere 17 µl di miscela di eluizione EE2+HP3 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra CAP1 MIDI.
- 4 Eliminare la miscela di eluizione EE2+HP3 rimanente.
- 5 Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP1 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 6 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 7 Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
- 8 Apporre un'etichetta "ELU1" (Eluizione 1) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
- 9 Miscelare l'ET2 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 10 Aggiungere 5 µl di ET2 a ciascun pozzetto della libreria corrispondente nella nuova piastra ELU1 PCR.
- 11 Trasferire con attenzione 15 µl di eluato da ogni pozzetto della libreria della piastra CAP1 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra ELU1 PCR.
- 12 Eliminare la piastra CAP1 MIDI vuota.
- 13 Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU1 PCR.
- 14 Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.

- 15 Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
- 16 Riportare l'EEW nel luogo deputato alla conservazione.

Configurazione della seconda ibridazione

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Preparare i seguenti reagenti:
 - ▶ TCB1: scaldare la provetta a 37 °C per cinque minuti. Miscelare tramite vortex per 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ TCA1: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ OPR1: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ OPD2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.

Procedura

- 1 Verificare che non siano presenti precipitati nel TCB1. Se presenti, scaldare nuovamente la provetta e miscelarla tramite vortex fino a far dissolvere i cristalli.
- 2 Aggiungere 15 µl di TCB1 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra ELU1 PCR.
- 3 Aggiungere 10 µl di TCA1 a ciascun pozzetto della libreria.
- 4 Aggiungere le sonde.

Non combinare diversi tipi di sonde.

 - ▶ **Pozzetti della libreria di RNA:** 5 µl di OPR1 a ogni libreria derivata dall'RNA.
 - ▶ **Pozzetti della libreria di DNA:** 5 µl di OPD2 a ogni libreria derivata dal DNA.
- 5 Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU1 PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
- 6 Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
- 7 Posizionare su un ciclatore termico ed eseguire il programma HYB2.
Vedere *Programmazione dei ciclatori termici a pagina 4*.
- 8 Ibridare a 57 °C per un minimo di 1.5 ore e fino a un massimo di 4 ore.
- 9 Riportare TCA1, TCB1, OPR1 e OPD2 nel luogo deputato alla conservazione.

Target di cattura Due

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Preriscaldare un incubatore per microcampioni con inserto di blocco termico MIDI a 57 °C.
- 2 Preparare i seguenti reagenti:
 - ▶ EE2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ HP3: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ SMB: verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
 - ▶ Per questa procedura, assicurarsi di utilizzare **SMB** e non SPB.
 - ▶ RSB: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
 - ▶ ET2: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
- 3 Preparare al momento la miscela di eluizione EE2+HP3 in una provetta per microcentrifuga.

Tabella 19 Miscela di eluizione EE2+HP3 per target di cattura Due

Componente della miscela di eluizione	3 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1.368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, vedere la sezione Manipolazione dei reagenti contenuta nell'*Insero della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documento n. 200007789).

- 4 Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte per la fase **Eluizione**.
- 5 Apporre un'etichetta "CAP2" (Cattura 2) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
- 6 Preparare il magnete.

Procedura

Legame

- 1 Rimuovere la piastra ELU1 PCR dal ciclatore termico.
- 2 Centrifugare la piastra ELU1 PCR a 280 × g per un minuto.
- 3 Miscelare tramite vortex l'SMB per un minuto per risospendere le microsfere.
- 4 Aggiungere immediatamente 150 µl di SMB a ciascun pozzetto della libreria della piastra CAP2 MIDI.
Se per dispensare SMB si utilizzano vaschette, includere un fattore di eccesso di 1,15 quando si aliquota sufficiente materiale per campione. Una volta aggiunto SMB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.
- 5 Impostare la pipetta a 50 µl e trasferire l'intero volume di ciascuna libreria dalla piastra ELU1 PCR al pozzetto corrispondente della piastra CAP2 MIDI.
- 6 Eliminare la piastra ELU1 PCR vuota.
- 7 Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
- 8 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 9 Incubare in un incubatore per microcampioni a 57 °C per 25 minuti.

NOTA Se si prosegue con la fase **Amplificazione della libreria arricchita a pagina 25**, seguire le istruzioni di scongelamento dei reagenti nella sezione Preparazione delle fasi del protocollo.

- 10 Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
- 11 Mantenere la piastra CAP2 MIDI sul supporto magnetico e utilizzare una pipetta P200 impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto della libreria senza alterare il pellet di microsfere.



ATTENZIONE

Passare immediatamente alla fase successiva (**Lavaggio**). Non lasciare il pellet di microsfere a riposo per un periodo di tempo eccessivo senza la presenza di liquido.

Lavaggio

- 1 Rimuovere la piastra CAP2 MIDI dal supporto magnetico.
- 2 Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
- 3 Aggiungere 200 µl di RSB a ciascun pozzetto.
- 4 Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 5 Agitare a 1.800 giri/min per quattro minuti.
- 6 Posizionare sul supporto magnetico per due minuti.
- 7 Tenere la piastra CAP2 MIDI sul supporto magnetico e rimuovere ed eliminare tutto il surnatante senza alterare il pellet di microsfere.
- 8 Rimuovere il surnatante residuo da ogni pozzetto.
Utilizzare una pipetta P20 con punte fini.

Eluizione

- 1 Rimuovere la piastra CAP2 MIDI dal supporto magnetico.

- 2 Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2+HP3 preparata al momento, quindi centrifugare brevemente.
- 3 Aggiungere 22 µl di miscela di eluizione EE2+HP3 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra CAP2 MIDI.
- 4 Eliminare la miscela di eluizione EE2+HP3 rimanente.
- 5 Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 6 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 7 Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
- 8 Apporre un'etichetta "ELU2" (Eluizione 2) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
- 9 Miscelare l'ET2 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 10 Aggiungere 5 µl di ET2 a ciascun pozzetto della libreria corrispondente nella nuova piastra ELU2 PCR.
- 11 Trasferire con attenzione 20 µl di eluato da ogni pozzetto della libreria della piastra CAP2 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra ELU2 PCR.
- 12 Eliminare la piastra CAP2 MIDI vuota.
- 13 Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU2 PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
- 14 Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
- 15 Riportare SMB, EE2, HP3 e ET2 nel luogo deputato alla conservazione.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se è necessario fermarsi, centrifugare la piastra ELU2 PCR a 280 x g per un minuto e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 7 giorni. Riportare l'RSB nel luogo deputato alla conservazione.

Data e ora di arresto _____

Preparazione delle fasi del protocollo

- 1 Preparare un contenitore portaghiaccio.
- 2 Rimuovere la provetta di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
PPC3	Da -25 °C a -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Amplificazione della libreria arricchita
EPM	Da -25 °C a -15 °C	Conservare in ghiaccio.	Amplificazione della libreria arricchita

Tabella 21 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SPB (etichetta verde chiaro)	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Pulizia delle librerie arricchite e amplificate
RSB	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Pulizia delle librerie arricchite e amplificate Preparazione per il sequenziamento

Amplificazione della libreria arricchita

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Se la piastra ELU2 è stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, quindi centrifugare a 280 × g per un minuto.

Procedura

- 1 Miscelare il PPC3 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 2 Aggiungere 5 µl di PPC3 a ciascun pozzetto della libreria della piastra ELU2 PCR.
- 3 Miscelare l'EPM tramite vortex per 5 secondi, quindi centrifugare brevemente.
- 4 Aggiungere 20 µl di EPM a ciascun pozzetto della libreria.
- 5 Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU2 PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
- 6 Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
- 7 Posizionare su un ciclatore termico ed eseguire il programma EL-PCR.
Vedere *Programmazione dei ciclatori termici a pagina 4*.

NOTA Se si prosegue con la *Normalizzazione delle librerie a pagina 28*, seguire le istruzioni di scongelamento nella sezione Preparazione delle fasi del protocollo.

- 8 Riportare PPC3 ed EPM nel luogo deputato alla conservazione.

Pulizia delle librerie arricchite e amplificate

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Preparare i seguenti reagenti:
 - ▶ SPB: verificare che le microsfele siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
 - ▶ Per questa procedura, assicurarsi di utilizzare **SPB** e non SMB.
 - ▶ RSB: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
- 2 Preparare al momento una soluzione all'80% di etanolo in una provetta conica da 15 o 50 ml.

Reagente	3 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
Alcol etilico al 100%, puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Acqua priva di DNasi/RNasi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Miscelare l'EtOH all'80% preparato al momento tramite vortex.
- 4 Apporre un'etichetta "BIND2" (Legame di pulizia) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
- 5 Preparare il magnete.

Procedura

Legame

- 1 Rimuovere la piastra ELU2 PCR dal ciclatore termico.
- 2 Centrifugare la piastra ELU2 PCR a 280 × g per un minuto.
- 3 Miscelare tramite vortex l'SPB per un minuto per risospendere le microsfele.
- 4 Aggiungere immediatamente 110 µl di SPB a ciascun pozzetto della libreria della piastra BIND2 MIDI.
- 5 Trasferire 50 µl di ciascuna libreria dalla piastra ELU2 PCR al pozzetto corrispondente della piastra BIND2 MIDI.
- 6 Eliminare la piastra ELU2 PCR vuota.
- 7 Applicare il sigillo adesivo alla piastra BIND2 MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 8 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 9 Incubare a temperatura ambiente per cinque minuti.

- 10 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per cinque minuti.
- 11 Usare una pipetta P200 impostata su 200 µl per rimuovere e scartare **tutto** il surnatante da ogni pozzetto della libreria senza alterare il pellet di microsferi.

Lavaggio

- 1 Lavare le microsferi come descritto di seguito.
 - a Tenere sul supporto magnetico e aggiungere a ciascun pozzetto 200 µl di EtOH all'80% preparato al momento.
 - b Attendere 30 secondi.
 - c Rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto di campioni senza alterare il pellet di microsferi.
- 2 Lavare le microsferi una **seconda** volta.
- 3 Rimuovere l'EtOH residuo da ogni pozzetto. Utilizzare una pipetta P20 con punte fini.
- 4 Eliminare l'EtOH all'80% non utilizzato.

Eluizione

- 1 Rimuovere la piastra BIND2 MIDI dal supporto magnetico.
- 2 Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
- 3 Aggiungere 32 µl di RSB a ciascun pozzetto della libreria.
- 4 Applicare il sigillo adesivo alla piastra BIND2 MIDI. Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 5 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 6 Incubare a temperatura ambiente per due minuti.
- 7 Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
- 8 Apporre un'etichetta "PL" (Librerie purificate) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
- 9 Trasferire 30 µl di ogni eluato dalla piastra BIND2 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra PL PCR.
- 10 Eliminare la piastra BIND2 MIDI vuota.
- 11 Applicare il sigillo adesivo alla piastra PL PCR.
- 12 Riportare l'SPB nel luogo deputato alla conservazione.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se è necessario fermarsi, centrifugare la piastra PL PCR a 280 × g per un minuto e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni. Riportare l'RSB nel luogo deputato alla conservazione.

Data e ora di arresto _____

Preparazione delle fasi del protocollo

- 1 Rimuovere la provetta di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 22 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
LNA1	Da -25 °C a -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie
EE2	Da -25 °C a -15 °C	Scongela a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie

Tabella 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
LNB1	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Normalizzazione delle librerie
HP3	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie Preparazione per il sequenziamento
LNW1	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie
LNS1	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie

- 2 Se si prosegue lo stesso giorno con la fase *Preparazione per il sequenziamento a pagina 30*, seguire le istruzioni di scongelamento nella sezione Preparazione delle fasi del protocollo.

Normalizzazione delle librerie

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Preparare i seguenti reagenti:
- ▶ LNB1: assicurarsi che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
 - ▶ LNA1: miscelare tramite vortex.
 - ▶ EE2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ HP3: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
 - ▶ LNW1: miscelare tramite vortex. Mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
 - ▶ LNS1: miscelare tramite vortex. Mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
- 2 Miscelare tramite vortex l'LNB1 per un minuto per risospendere le microsfere. Invertire la provetta dell'LNB1 per assicurarsi che tutte le microsfere siano risospese.
- 3 Utilizzando una pipetta P1000 impostata su 800 µl, pipettare l'LNB1 su e giù 10 volte per garantire la risospensione.
- 4 Preparare al momento una miscela master di LNA1+LNB1 e inserirla immediatamente in una provetta conica.



ATTENZIONE

Risospendere completamente il pellet di microsfere LNB1 sul fondo della provetta per evitare una densità dei cluster non coerente.

Tabella 24 Miscela master LNA1+LNB1

Componente miscela master	3 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
LNA1	229 µl	610 µl	1.219 µl	1.829 µl	3.658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, vedere la sezione Manipolazione dei reagenti contenuta nell'*Insero della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documento n. 200007789).

- 5 Miscelare tramite vortex la miscela master LNA1+LNB1. Mettere da parte per la fase *Legame*.
- 6 Preparare al momento la miscela di eluizione EE2+HP3 in una provetta da microcentrifuga.

Tabella 25 Miscela di eluizione EE2+HP3 per la normalizzazione delle librerie

Componente della miscela di eluizione	3 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1.824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, vedere la sezione Manipolazione dei reagenti contenuta nell'*Insero della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documento n. 200007789).

- 7 Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione preparata al momento, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte per la fase *Eluizione*.
- 8 Se la piastra PL PCR è stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, centrifugare a 280 × g per un minuto, quindi pipettare per miscelare.
- 9 Apporre un'etichetta "BBN" (Normalizzazione basata su microsfere) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
- 10 Preparare il magnete.

Procedura

Legame

- 1 Miscelare tramite vortex la miscela master LNA1+LNB1.
- 2 Aggiungere immediatamente 45 µl di miscela master LNA1+LNB1 a ciascun pozzetto della libreria sulla piastra BBN MIDI.
- 3 Eliminare la miscela master LNA1+LNB1 rimanente.
- 4 Aggiungere 20 µl di ciascuna libreria dalla piastra PL PCR al pozzetto corrispondente della piastra BBN MIDI.
- 5 Applicare il sigillo adesivo alla piastra BBN MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 6 Agitare a 1800 giri/min per 30 minuti.
- 7 Applicare il sigillo adesivo alla piastra PL PCR e riportarla nel luogo deputato alla conservazione.
- 8 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per due minuti.
- 9 Tenere su un supporto magnetico e usare una pipetta P200 per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto senza alterare il pellet di microsfere.

Lavaggio

- 1 Lavare le microsfere come descritto di seguito.
 - a Rimuovere la piastra BBN MIDI dal supporto magnetico.
 - b Aggiungere 45 µl di LNW1 a ciascun pozzetto della libreria.
 - c Applicare il sigillo adesivo alla piastra BBN MIDI.
 - d Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
 - e Agitare a 1.800 giri/min per cinque minuti.
 - f Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
 - g Rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto senza alterare il pellet di microsfere.
- 2 Lavare le microsfere una **seconda** volta.
- 3 Rimuovere il surnatante residuo da ogni pozzetto.
Utilizzare una pipetta P20 con punte fini.

Eluizione

- 1 Rimuovere la piastra BBN MIDI dal supporto magnetico.
- 2 Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2+HP3 preparata al momento, quindi centrifugare brevemente.
- 3 Aggiungere 32 µl di soluzione EE2+HP3 a ciascun pozzetto della libreria della piastra BBN MIDI.
- 4 Eliminare la miscela di eluizione rimanente.
- 5 Applicare il sigillo adesivo alla piastra BBN MIDI.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 6 Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
- 7 Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
- 8 Apporre un'etichetta "NL" (Librerie normalizzate) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
- 9 Trasferire con attenzione 30 µl di eluato da ciascun pozzetto della libreria della piastra BBN MIDI al pozzetto corrispondente della piastra NL PCR.

**ATTENZIONE**

Se le microsfere vengono aspirate nelle punte, erogarle nuovamente sulla piastra posta sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi chiaro (circa due minuti), prima di passare alla fase successiva della procedura.

- 10 Eliminare la piastra BBN MIDI vuota.
- 11 Miscelare l'LNS1 tramite vortex.
- 12 Aggiungere 30 µl di LNS1 a ciascun pozzetto della libreria nella nuova piastra NL PCR.
- 13 Pipettare 5 volte per mescolare.
- 14 Applicare il sigillo adesivo alla piastra NL PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 15 Riporre LNB1, LNA1, EE2, LNW1 e LNS1 nel luogo deputato alla conservazione.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se è necessario fermarsi, centrifugare la piastra NL PCR a 280 × g per un minuto e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

Data e ora di arresto _____

Preparazione delle fasi del protocollo

Avviare la preparazione dei materiali di consumo per il sequenziamento del kit di reagenti NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 cycles) (cod. art. 20028871) almeno un'ora prima dell'uso.

- 1 Rimuovere il tampone di diluizione della libreria (HT1) dal luogo in cui è conservato a un temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C, scongelarlo a temperatura ambiente e metterlo in ghiaccio.
- 2 Per gli altri materiali di consumo del kit, seguire le istruzioni di preparazione nella *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 100000009513)*.
 - ▶ NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - ▶ NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
 - ▶ NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
- 3 Rimuovere la provetta di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
Campione di controllo interno PhiX	Da -25 °C a -15 °C	Scongela a temperatura ambiente. Conservare in ghiaccio.	Preparazione per il sequenziamento

Tabella 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
HP3	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Preparazione per il sequenziamento
RSB (etichetta rosa)	Da 2 °C a 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Preparazione per il sequenziamento

Preparazione per il sequenziamento

Preparazione

Data e ora di inizio _____

- 1 Rivedere le linee guida relative al numero di librerie e alla selezione degli indici nell'*Inserto della confezione di TruSight Oncology Comprehensive (EU) (documento n. 200007789)*.
- 2 Apporre un'etichetta "dHP3" (HP3 diluito) a una provetta per microcentrifuga.
- 3 Apporre un'etichetta "dPhiX" (PhiX diluito) a una provetta per microcentrifuga.
- 4 Preriscaldare un blocco termico a 96 °C per provette da microcentrifuga.
- 5 Preparare un contenitore portaghiaccio.

Diluizione e denaturazione del campione di controllo PhiX

- 1 Miscelare l'HP3 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 2 Combinare i volumi seguenti nella provetta per microcentrifuga del dHP3:
 - ▶ 10 µl HP3
 - ▶ 190 µl di acqua priva di DNasi/RNasi
- 3 Miscelare il dHP3 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 4 Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
- 5 Miscelare il campione di controllo PhiX tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 6 Combinare i volumi seguenti nella provetta per microcentrifuga del dPhiX:
 - ▶ 8 µl di RSB
 - ▶ 2 µl di campione di controllo PhiX
- 7 Aggiungere 10 µl di dHP3 alla provetta del dPhiX.
- 8 Eliminare la provetta del dHP3.
- 9 Miscelare il dPhiX tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 10 Incubare il dPhiX a temperatura ambiente per cinque minuti per denaturare.
- 11 Miscelare l'HT1 tramite vortex.
- 12 Aggiungere immediatamente 980 µl di HT1 preraffreddato al dPhiX.
- 13 Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 14 Posizionare il dPhiX su ghiaccio fino all'utilizzo nella preparazione della seconda diluizione.
La concentrazione finale è 20 pM dPhiX.
- 15 Riportare PhiX, HP3 e RSB nel luogo deputato alla conservazione.

Raggruppamento e denaturazione delle librerie

- 1 Se la piastra NL PCR è stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, quindi centrifugare la piastra a 280 × g per un minuto.
- 2 Usando una pipetta multicanale impostata su 30 µl, mescolare delicatamente le librerie nella piastra NL PCR per cinque volte.
Usare punte nuove per ogni libreria.



ATTENZIONE

Per ottenere prestazioni ottimali, assicurarsi di mescolare bene le librerie.

- 3 Per raggruppare, denaturare e diluire le librerie, selezionare una delle seguenti opzioni:
 - ▶ **Opzione n. 1:** sequenziamento di librerie derivate da campioni di RNA e da campioni di DNA simultaneamente. Vedere *Opzione n. 1: librerie di DNA e RNA insieme a pagina 31*.
 - ▶ **Opzione n. 2:** sequenziamento di librerie derivate solo da campioni di DNA. Vedere *Opzione n. 2: librerie di solo DNA a pagina 32*.
 - ▶ **Opzione n. 3:** sequenziamento di librerie derivate solo da campioni di RNA. Vedere *Opzione n. 3: librerie di solo RNA a pagina 33*.

Opzione n. 1: librerie di DNA e RNA insieme

- 1 Apporre un'etichetta "PRL" (Librerie di RNA raggruppate) a una provetta da microcentrifuga.
- 2 Apporre un'etichetta "PDL" (Librerie di DNA raggruppate) a una provetta da microcentrifuga.
- 3 Trasferire 10 µl di ciascuna libreria di RNA (cDNA) normalizzata dalla piastra NL alla provetta PRL.

Non raggruppare due librerie con lo stesso index primer.

- 4 Trasferire 10 µl di ciascuna libreria di DNA normalizzata dalla piastra NL alla provetta PDL.
Non raggruppare due librerie con lo stesso index primer.
- 5 Applicare il sigillo adesivo alla piastra NL PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 6 Miscelare tramite vortex ogni provetta di PRL e PDL.
- 7 Centrifugare brevemente le provette PRL e PDL.
- 8 Incubare le provette PRL e PDL in un blocco termico a 96 °C per due minuti.
- 9 Posizionare PRL e PDL in ghiaccio per cinque minuti.
- 10 Miscelare tramite vortex le provette PRL e PDL, quindi centrifugare brevemente.
- 11 Riportare le provette PRL e PDL in ghiaccio.

Preparazione della prima diluizione

- 1 Apporre un'etichetta "DIL1" (Diluizione 1) a una provetta per microcentrifuga da 1,7 ml.
- 2 Trasferire 20 µl del PDL nella provetta DIL1 vuota.
- 3 Aggiungere 5 µl di PRL a DIL1.
- 4 Eliminare le provette PDL e PRL.
- 5 Aggiungere 475 µl dell'HT1 preraffreddato alla provetta DIL1 (diluizione 1:20).
- 6 Miscelare tramite vortex la provetta del DIL1, quindi centrifugare brevemente.

Preparazione della seconda diluizione

- 1 Apporre un'etichetta "DIL2" (Diluizione 2) a una provetta per microcentrifuga da 2.0 ml.
- 2 Trasferire 40 µl di DIL1 nella provetta del DIL2 vuota.
- 3 Eliminare la provetta del DIL1.
- 4 Aggiungere 1.660 µl di HT1 preraffreddato alla provetta del DIL2 (diluizione 1:850).
- 5 Miscelare tramite vortex un preparato di dPhiX 20 pM, quindi centrifugare brevemente.
- 6 Aggiungere 2,5 µl di preparato dPhiX 20 pM alla provetta del DIL2.
- 7 Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 8 Caricare 1300 µl di DIL2 nella NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) scongelata
Per maggiori informazioni, vedere la *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 100000009513)*.
- 9 Eliminare la provetta del DIL2.
- 10 Centrifugare la piastra NL PCR a 280 x g per un minuto e conservare a temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.
- 11 Passare al sequenziamento.
Per maggiori informazioni, vedere la *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 100000009513)*.

Opzione n. 2: librerie di solo DNA

- 1 Apporre un'etichetta "PDL" (Librerie di DNA raggruppate) a una provetta da microcentrifuga.
- 2 Trasferire 10 µl di ciascuna libreria di DNA normalizzata dalla piastra NL alla provetta PDL.
Non raggruppare due librerie con lo stesso index primer.
- 3 Applicare il sigillo adesivo alla piastra NL PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 4 Miscelare tramite vortex la provetta del PDL.
- 5 Centrifugare brevemente la provetta del PDL.
- 6 Incubare la provetta del PDL in un blocco termico a 96 °C per due minuti.
- 7 Posizionare la provetta del PDL in ghiaccio per cinque minuti.
- 8 Miscelare la provetta del PDL tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 9 Riportare la provetta del PDL in ghiaccio.

Preparazione della prima diluizione

- 1 Apporre un'etichetta "DIL1" (Diluizione 1) a una provetta per microcentrifuga da 1,7 ml.
- 2 Trasferire 10 µl di PDL nella provetta del DIL1 vuota.
- 3 Eliminare la provetta del PDL.
- 4 Aggiungere 190 µl di HT1 preraffreddato alla provetta del DIL1 (diluizione 1:20).
- 5 Miscelare DIL1 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.

Preparazione della seconda diluizione

- 1 Apporre un'etichetta "DIL2" (Diluizione 2) a una provetta per microcentrifuga da 2.0 ml.
- 2 Trasferire 40 µl di DIL1 nella provetta del DIL2 vuota.
- 3 Eliminare la provetta del DIL1.
- 4 Aggiungere 1.660 µl di HT1 preraffreddato alla provetta del DIL2 (diluizione 1:850).
- 5 Miscelare tramite vortex un preparato dPhiX 20 pM, quindi centrifugare brevemente.
- 6 Aggiungere 2,5 µl di preparato dPhiX 20 pM alla provetta del DIL2.
- 7 Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 8 Caricare 1300 µl di DIL2 nella NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) scongelata.
Per maggiori informazioni, vedere la *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 100000009513)*.
- 9 Eliminare la provetta del DIL2.
- 10 Centrifugare la piastra NL PCR a 280 x g per un minuto, quindi conservarla a temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.
- 11 Passare al sequenziamento.
Per maggiori informazioni, vedere la *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 100000009513)*.

Opzione n. 3: librerie di solo RNA

- 1 Apporre un'etichetta "PRL" (Librerie di RNA raggruppate) a una provetta da microcentrifuga.
- 2 Trasferire 10 µl di ciascuna libreria di RNA (cDNA) normalizzata dalla piastra NL alla provetta PRL.
Non raggruppare due librerie con lo stesso index primer.
- 3 Applicare il sigillo adesivo alla piastra NL PCR.
Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
- 4 Miscelare tramite vortex la provetta del PRL.
- 5 Centrifugare brevemente la provetta del PRL.
- 6 Incubare la provetta del PRL in un blocco termico a 96 °C per due minuti.
- 7 Posizionare la provetta del PRL in ghiaccio per cinque minuti.
- 8 Miscelare la provetta del PRL tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 9 Riportare la provetta del PRL in ghiaccio.

Preparazione della prima diluizione

- 1 Apporre un'etichetta "DIL1" (Diluizione 1) a una provetta per microcentrifuga da 1,7 ml.
- 2 Trasferire 10 µl di PRL nella provetta del DIL1 vuota.
- 3 Eliminare la provetta del PRL.
- 4 Aggiungere 190 µl di HT1 preraffreddato alla provetta del DIL1 (diluizione 1:20).
- 5 Miscelare DIL1 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.

Preparazione della seconda diluizione

- 1 Apporre un'etichetta "DIL2" (Diluizione 2) a una provetta per microcentrifuga da 2.0 ml.
- 2 Trasferire 40 µl di DIL1 nella provetta del DIL2 vuota.
- 3 Eliminare la provetta del DIL1.

- 4 Aggiungere 1646 µl di HT1 preraffreddato alla provetta del DIL2 (diluizione 1:843).
- 5 Miscelare tramite vortex un preparato dPhiX 20 pM, quindi centrifugare brevemente.
- 6 Aggiungere 16,7 µl di preparato dPhiX 20 pM alla provetta del DIL2.
- 7 Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- 8 Caricare 1300 µl di DIL2 nella NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) scongelata.
Per maggiori informazioni, vedere la *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 100000009513)*.
- 9 Eliminare la provetta del DIL2.
- 10 Centrifugare la piastra NL PCR a 280 × g per un minuto e conservare a temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.
- 11 Passare al sequenziamento.
Per maggiori informazioni, vedere la *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 100000009513)*.

Brevetti e marchi di fabbrica

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente ad uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina, per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti, con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti, senza previa approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento, Illumina non trasferisce a terzi alcuna licenza ai sensi dei suoi brevetti, marchi, copyright, o diritti riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti simili di alcun genere.

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE POSSONO CAUSARE DANNI AL/I PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/I PRODOTTO/I.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I QUI DESCRITTI (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSO).

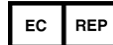
© 2022 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, consultare la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html.

Informazioni di contatto



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Paesi Bassi

Etichettatura del prodotto

Per un riferimento completo dei simboli che si trovano sulla confezione del prodotto e sull'etichettatura, fare riferimento alla legenda dei simboli per il kit in uso alla pagina Web support.illumina.com.