

Formular de urmărire în laborator pentru TruSight™ Oncology Comprehensive (UE)

A SE UTILIZA LA DIAGNOSTICAREA IN VITRO
EXCLUSIV PENTRU EXPORT

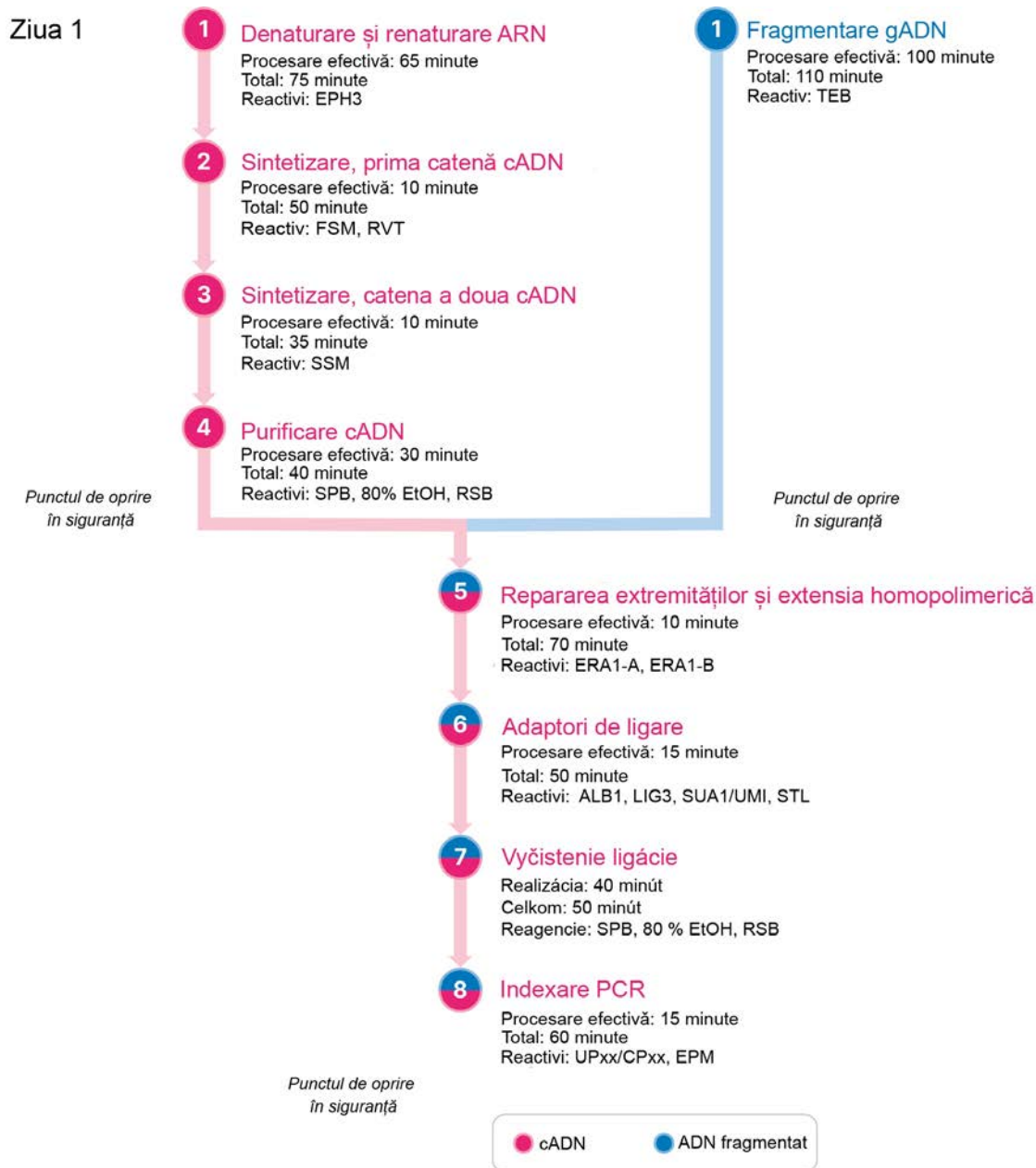
Instrucțiuni de utilizare

Figura 1 și Figura 2 sunt o prezentare generală a fluxului de lucru TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive).

Înainte de a inițializa protocolul, consultați avertismentele și precauțiile din prospectul *TruSight Oncology Comprehensive (UE)* (nr. document 200007789).

Flux de lucru pentru pregătirea bibliotecii

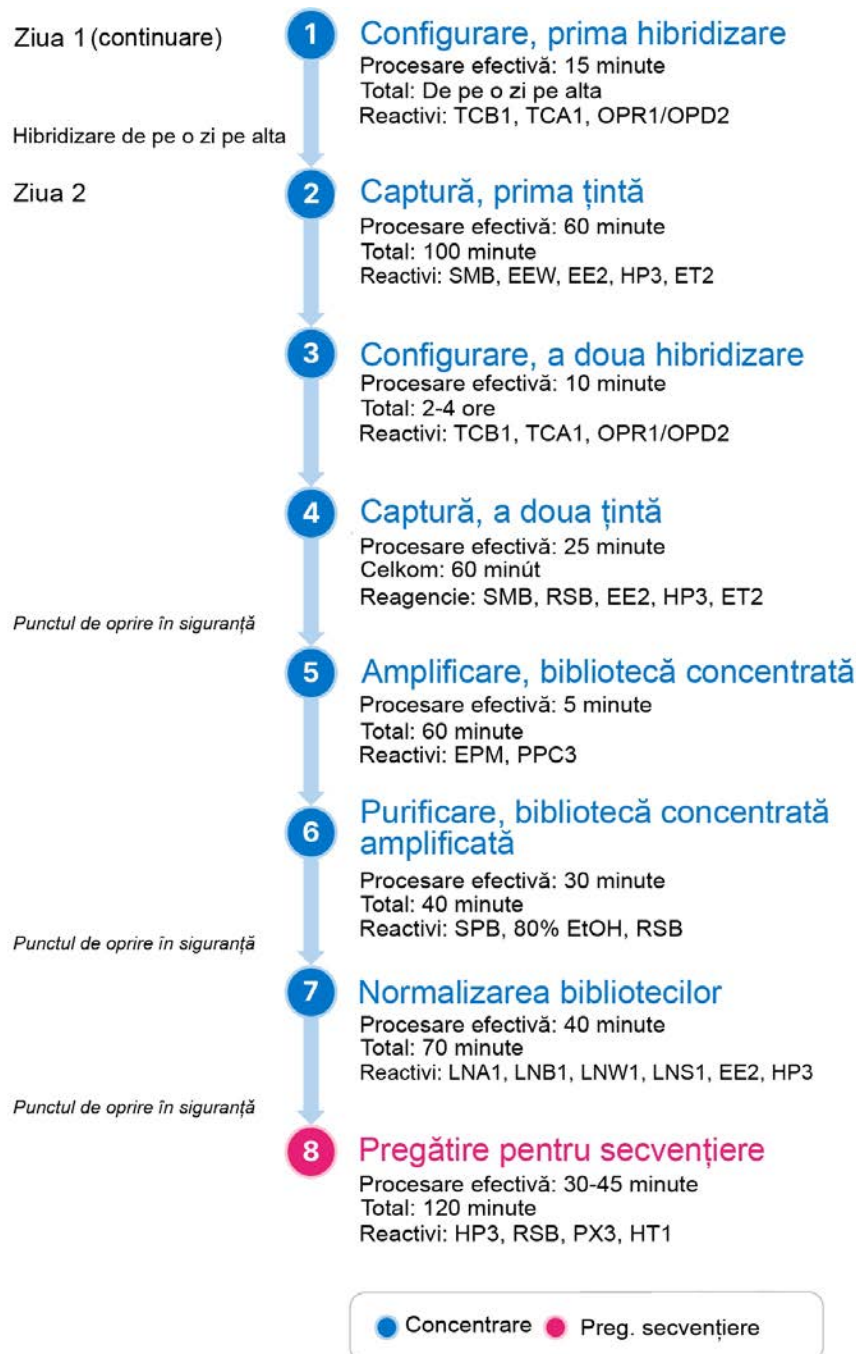
Figura 1 Flux de lucru TSO Comprehensive (Partea 1)



* Timpii de procesare efectivă și total sunt aproximativi.

Flux de lucru pentru concentrare

Figura 2 Flux de lucru TSO Comprehensive (Partea 2)



Programarea cicloarelor termice

- 1 Înainte de a inițializa analiza, salvați programele de mai jos, de preamplificare și postamplificare, pentru cicloare termice.

Tabel 1 Programe de preamplificare pentru ciclul termic

Pas din procedură	Denumire program	Temperatura capacului	Volum de reacție	Parametrii ciclului termic
Denaturare și renaturare ARN	LQ-RNA	100°C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65°C, 5 minute • 4°C, 1 minut • 4°C, menținere
Sintetizare, prima catenă cADN	1stSS	100°C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25°C, 10 minute • 42°C, 15 minute • 70°C, 15 minute • 4°C, 1 minut • 4°C, menținere
Sintetizare, catena a doua cADN	2ndSS	30°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16°C, 25 minute • 4°C, 1 minut • 4°C, menținere

Dacă nu se poate seta temperatura capacului pentru sintetizare, catena a doua, la 30°C, dezactivați opțiunea de preîncălzire a capacului.

Tabel 2 Programe de postamplificare pentru ciclul termic

Pas din procedură	Denumire program	Temperatura capacului	Volum de reacție	Parametrii ciclului termic
Indexare PCR	I-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C, 30 de secunde • 15 cicluri la: <ul style="list-style-type: none"> • 98°C, 10 secunde • 60°C, 30 de secunde • 72°C, 30 de secunde • 72°C, 5 minute • 10°C, menținere
Efectuare, prima hibridizare	HYB1	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C, 10 minute • 85°C, 2 minute 30 de secunde • 75°C, 2 minute 30 de secunde • 65°C, 2 minute 30 de secunde • 57°C, menținere, 8-24 ore
Efectuare, a doua hibridizare	HYB2	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C, 10 minute • 85°C, 2 minute 30 de secunde • 75°C, 2 minute 30 de secunde • 65°C, 2 minute 30 de secunde • 57°C, menținere, 1,5-4 ore
Amplificare, bibliotecă concentrată	EL-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C, 30 s • 18 cicluri la: <ul style="list-style-type: none"> • 98°C, 10 s • 60°C, 30 s • 72°C, 30 s • 72°C, 5 min • 10°C, menținere

Introducerea informațiilor despre rulare

Local Run Manager pentru instrumentul NextSeq 550Dx este software-ul utilizat pentru configurarea ciclurilor TSO Comprehensive. Pentru informații suplimentare, consultați *Ghidul fluxului de lucru pentru Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE)* (nr. document 200008661).

Introduceți informațiile de configurare pentru ciclu și specimen în modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive.

Configurarea parametrilor ciclului

- 1 Autentificați-vă în Local Run Manager pe instrument de la un computer din rețea.
- 2 Selectați **Create Run** (creare ciclu), și apoi selectați **TSO Comp (EU)**.
- 3 Introduceți o denumire de ciclu cu care să identificați ciclul de la secvențiere până la analiză respectând următoarele criterii:
 - ▶ 1-40 caractere.
 - ▶ Folosiți caractere alfanumerice, caractere de subliniere sau liniuțe.
 - ▶ Caracterele de subliniere și cratimele trebuie să fie precedate și urmate de un caracter alfanumeric.
 - ▶ Denumire unică, nerepetată pentru niciun alt ciclu de pe instrument.
- 4 **[Opțional]** Introduceți o descriere a ciclului care să ajute la identificarea acestuia.
 - ▶ 1-150 caractere.
 - ▶ Exclusiv caractere alfanumerice sau spații.
 - ▶ Spațiile trebuie să fie precedate și urmate de un caracter alfanumeric.

Specificarea probelor pentru rulare

Specificați probele pentru ciclu folosind una dintre opțiunile și indicațiile care urmează.

- ▶ **Enter samples manually** (Introducere manuală a probelor) – folosiți tabelul necompletat din ecranul Create Run (Creare rulare).
- ▶ **Import samples** (Importare probe) – navigați la un fișier extern într-un format de valori separate prin virgulă (*.csv). În ecranul Create Run (Creare rulare) este disponibil pentru descărcare un șablon.



ATENȚIE

Neconcordanțele între probe și primerii de indexare pot duce la raportarea incorectă a rezultatelor din cauza absenței identificării specimenelor pozitive. Introduceți ID probe și atribuiți indecși în Local Run Manager înainte de a începe pregătirea bibliotecii. Înregistrați ID probe, indecșii și orientarea godeurilor de pe placă pentru referințe în timpul pregătirii bibliotecii.



ATENȚIE

Pentru a evita pierderile de date, asigurați-vă că nu este în derulare instalarea KB înainte de a salva un ciclu.

Introducerea manuală a probelor

- 1 Introduceți în câmpul Sample ID (ID specimen) un ID de specimen respectând următoarele criterii. **Adăugarea la început a specimenelor de control.** Consultați *Specimene de control la pagina 6*, pentru informații suplimentare.
 - ▶ 1-25 caractere.
 - ▶ Folosiți caractere alfanumerice, caractere de subliniere sau liniuțe.
 - ▶ Caracterele de subliniere și cratimele trebuie să fie precedate și urmate de un caracter alfanumeric.
- 2 **[Opțional]** Introduceți o descriere a probei în câmpul Sample Description (Descriere specimen).
 - ▶ 1-50 caractere.
 - ▶ Folosiți caractere alfanumerice, cratime, caractere de subliniere sau spații.
 - ▶ Spațiile, caracterele de subliniere și cratimele trebuie să fie precedate și urmate de un caracter alfanumeric.

- 3 **Selectați un index pentru biblioteca ADN și/sau ARN pregătită din specimen.**
Asigurați-vă că speciimenele de ARN și ADN sunt în coloane separate.
Câmpul DNA i7+i5 Sequence (secvență ADN i7+i5) este populat automat după selectarea unui ID de index ADN.
Câmpul RNA i7+i5 Sequence (secvență ARN i7+i5) este populat automat după selectarea unui ID de index ARN.
Pe lângă prezentul rezumat, pentru selecția ID-urilor pentru indecși, consultați și *prospectul TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200007789)*.
 - ▶ Pentru o bibliotecă de speciimene ADN, selectați un ID de index unic (indecși UPxx sau CPxx) din lista verticală DNA Index ID (ID de indecși ADN).
 - ▶ Pentru o bibliotecă de speciimene ARN, selectați un ID de index unic (doar indecși UPxx) din lista verticală RNA Index ID (ID de indecși ARN).
 - ▶ Dacă ciclul include trei biblioteci în total, urmați ghidul de selecție a indecșilor din *prospectul TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200007789)*.
- 4 **Alocați un tip de tumoare pentru fiecare specimen, din câmpul Tumor Type (tip de tumoare), selectând cel mai specific tip de tumoare disponibil. Consultați [Selectarea unui tip de tumoare la pagina 7](#).**
- 5 **Alocați unul din următoarele tipuri de control pentru fiecare control, din câmpul Tumor Type (tip de tumoare). Consultați [Specimene de control la pagina 6](#).**
 - Control extern ADN
 - Control extern ARN
 - Control ADN fără șablon
 - Control ARN fără șablon

Dacă utilizați controlul Consumable Prefix DNA, tipul de control este control extern ADN. Dacă utilizați controlul Consumable prefix RNA, tipul de control este control extern ARN.
- 6 **Alocați sexul.**
- 7 **[Opțional] Selectați **Export to CSV** (export în format CSV) pentru a exporta informații despre probe într-un fișier extern.**
- 8 **Consultați informațiile pe ecranul Create Run (creare ciclu).**
Informațiile incorecte pot afecta rezultatele.
- 9 **Selectați **Save Run** (Salvare ciclu).**

Importarea probelor

- 1 **Selectați **Import CSV** (import în format CSV) și navigați la locația fișierului cu informații despre probe. Există două tipuri de fișiere pe care le puteți importa.**
 - Selectați **Download CSV** (descărcare CSV) pe ecranul Create Run (creare ciclu) pentru descărcarea unui nou șablon de informații despre probe. Fișierul CSV include antetele de coloană necesare și formatul pentru import. Introduceți informații despre probe în fiecare coloană pentru probele din rulare. Introduceți, pentru fiecare coloană cu tipuri de tumori, tipul de tumoare sau codul conex. Câmpul Tumor Type (tip de tumoare) este utilizat și pentru desemnarea de probe ca controale (consultați [Specimene de control la pagina 6](#)).
 - Folosiți un fișier cu informații despre speciimene care a fost exportat din modulul de analiză TSO Comprehensive cu funcția Export to CSV (export în format CSV).
- 2 **Consultați informațiile importate pe ecranul Create Run (creare ciclu).**
Informațiile incorecte pot afecta rezultatele.
- 3 **[Opțional] Selectați **Export to CSV** (export în format CSV) pentru a exporta informații despre probe într-un fișier extern.**
- 4 **Selectați **Save Run** (Salvare ciclu).**

Specimene de control

TSO Comprehensive impune utilizarea controalelor Panel Control. Desemnarea unui specimen ca specimen de control setează automat Sex (sex) pentru specimen ca Unknown (necunoscut). Pentru desemnarea unui specimen ca specimen de control, selectați unul din cele patru tipuri de controale din câmpul Tumor Type (tip de tumoare):

Control ADN extern (control ADN pozitiv), control ADN fără șablon, control ARN extern (control ARN pozitiv) sau control ARN fără șablon. Consultați [Selectarea unui tip de tumoare la pagina 7](#), pentru informații suplimentare despre configurarea tipurilor de tumori pentru toate tipurile de probe în cadrul configurării ciclului.

Pentru un ciclu poate fi specificat un singur tip de control. Doar o bibliotecă ADN poate fi specificată ca control extern ADN sau control ADN fără șablon. Doar o bibliotecă ARN poate fi specificată ca control extern ARN sau control ARN fără șablon. Bibliotecile desemnate ca controale ADN sau ARN fără șablon nu sunt incluse în numărul maxim de biblioteci dintr-un ciclu.

Selectarea unui tip de tumoare

Este obligatorie selectarea unui tip de tumoare pentru fiecare specimen. Cu excepția tipurilor de control, tipurile de tumori disponibile sunt derivate din Knowledge Base (KB) (fond de cunoștințe) instalat și se pot modifica în funcție de actualizările versiunilor KB.

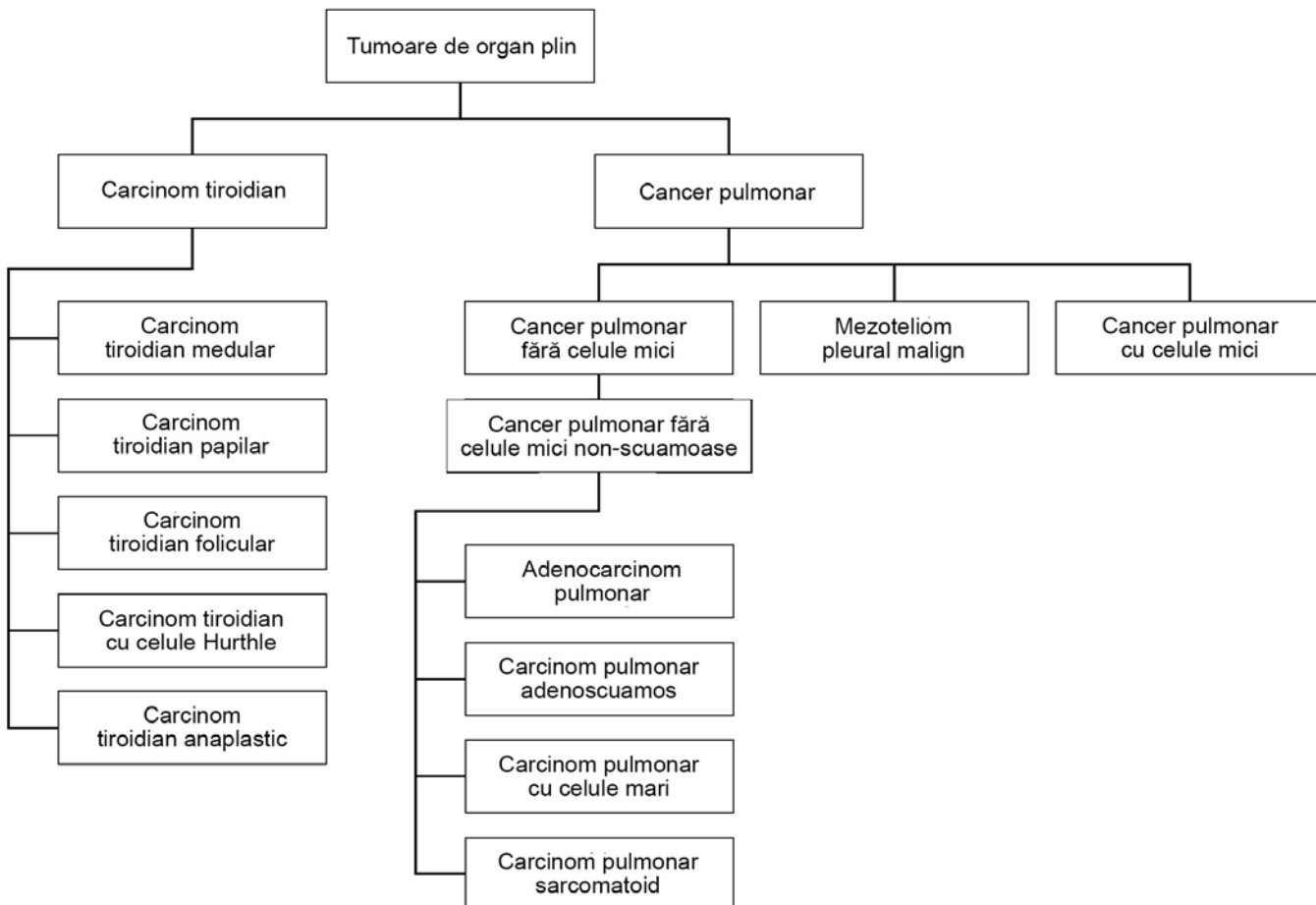


ATENȚIE

Selectarea incorectă a tipului de tumoare poate duce la rezultate incorecte. Soluționați toate avertismentele apărute la specificarea tipurilor de tumori pentru a evita eșecul analizei.

Termenii care definesc tipurile de tumori compun ontologia ierarhică a bolilor în KB, concepută ca set de relații părinte-copil. De exemplu, termenul „cancer pulmonar fără celule mici” este, ierarhic, copilul termenului „cancer pulmonar”, deoarece cancerul pulmonar fără celule mici este un tip de cancer pulmonar. [Figura 3](#) prezintă un subset al unui exemplu de ontologie a bolilor, indicând tumoarea de organ plin ca termen de bază, însoțită de termenii asociați cancerului pulmonar și tiroidian (nu sunt prezentate alte tipuri de tumori). Un termen conectat printr-o relație părinte-copil cu termeni de nivel mai jos este denumit precursor. Termenii de nivel mai jos conectați sunt considerați descendenți ai precursorului. De exemplu, cancerul pulmonar este considerat precursor al cancerului pulmonar și pulmonar cu celule mici, iar carcinomul medular tiroidian este considerat descendent atât al carcinomului tiroidian, cât și al tumorii de organ plin.

Figura 3 Subset al unui exemplu de ontologie a bolilor



Tipul de tumoare selectat pentru un specimen de la pacient afectează:

- ▶ Ce utilizări preconizate pentru diagnostic corelat sunt evaluate pentru specimen. Doar probele de la pacienți cu un tip de tumoare care reprezintă o potrivire exactă sau este descendent al tipului de tumoare pentru utilizarea preconizată a unui diagnostic corelat vor fi evaluate pentru respectiva ipoteză.
- ▶ Ce variante de analiză a profilului sunt incluse în raportul TSO Comprehensive.

Instrucțiunile de mai jos descriu procesul de selectare a unui tip de tumoare din ecranul Create Run (creare ciclu). Tipul de tumoare poate fi, de asemenea, setat prin importul unui fișier CSV care conține un tip de tumoare (consultați [Importarea probelor la pagina 6](#)).

- 1 Afișați tipurile de tumori disponibile cu dublu clic pe celula Tumor Type (tip de tumoare) din rândul aferent specimenului. Tipurile de tumori sunt afișate sub formă de listă ierarhică organizată alfabetic. Câmpul Tumor Type (tip de tumoare) este utilizat și pentru desemnarea tipului de control pentru probele de control (consultați [Specimene de control la pagina 6](#)).
- 2 Identificați și selectați tipul de tumoare dorit interacționând cu lista sau cu ajutorul barei de căutare din susul ferestrei Tumor Type (tip de tumoare).

Pregătire pentru pașii protocolului

- 1 Decontaminați temeinic zonele de lucru cu soluție de curățare inhibitoare de ARNază/ADNază.



ATENȚIE

Toate procedurile din fluxul de lucru necesită mediu fără ARNază/ADNază.

- 2 Setează programele de preamplificare pentru ciclul termic. Consultați *Programarea cicloarelor termice la pagina 4.*
- 3 Urmăți instrucțiunile producătorului pentru configurarea băii cu ultrasunete.
- 4 Dacă procesați doar specimene ADN, treceți direct la pasul *Fragmentare gADN la pagina 13.*
- 5 Scoateți controale ADN din depozit.
- 6 Scoateți tuburile de reactivi din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabel 3 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (PN 20031127)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
EPH3	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Denaturare și renaturare ARN
FSM	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Sintetizare, prima catenă cADN
RVT	între -25°C și -15°C	Păstrați la gheață.	Sintetizare, prima catenă cADN
SSM	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Sintetizare, catena a doua cADN

Tabel 4 TruSight Oncology Comp Library Prep (refrigerați) (PN 20031119)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
SPB (etichetă verde deschis)	între 2°C și 8°C	Aduceți la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.	Purificare cADN
RSB	între 2°C și 8°C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Purificare cADN

Denaturare și renaturare ARN

Pregătirea

- 1 Pregătiți următorii reactivi.
 - ▶ EPH3 – lăsați deoparte.
 - ▶ FSM – mixați în agitator vortex. Centrifugați scurt amestecul și apoi mixați-l prin pipetare. Verificați dacă prezintă precipitare. Dacă prezintă precipitare, mixați prin pipetare până la dizolvarea precipitatului.
 - ▶ RVT – Centrifugați scurt amestecul și apoi mixați-l prin pipetare. Păstrați la gheață.

NOTĂ RVT este o soluție vâscoasă. Pipetați întotdeauna lent pentru a evita formarea de bule.

- 2 Pentru prepararea amestecului principal FSM+RVT combinați, într-un tub de centrifugă, următoarele volume.

Tabel 5 Amestec principal FSM+RVT

Componente, amestec principal	3 specimene ARN (μl)	8 specimene ARN (μl)	16 specimene ARN (μl)	24 specimene ARN (μl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

Tabelul include și volumele excedentare. Pentru calcule, consultați secțiunea Manipularea reactivilor din *prospectul TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200007789)*.

- 3 Mixați pipetând de zece ori.
- 4 Lăsați amestecul principal FSM+RVT la gheață până la efectuarea pasului *Sintetizare, prima catenă cADN la pagina 10.*

Procedură

- 1 Decongeleți speci­me­nele și con­tro­a­lele ARN la gheață.
Proce­sați con­tro­a­lele ARN ca speci­me­ne pe dura­ta res­tu­lui pro­to­co­lu­lui.
Pentru cuan­ti­fi­ca­rea speci­me­nelor, con­sul­tați *prospec­tu­l TruSight Oncology Com­pre­hen­sive (UE) (nr. docu­ment 200007789)*.
- 2 Mixați fie­care speci­men de ARN prin pipetare de 10 ori.
- 3 Preparați un volu­m final de speci­men din 40 ng de ARN pentru un volu­m final de 8,5 µl (4,7 ng/µl) cu apă fără DNază/RNază.
Pentru con­tro­a­lele ARN, uti­li­zați con­cen­tra­ția speci­fi­ca­ă pe eticheta tu­bu­lui.
- 4 Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri CF (legare cADN)
- 5 Adăugați 8,5 µl din fie­care speci­men ARN într-un godeu separat al plăcii CF PCR.
- 6 Asigurați-vă că con­fi­gu­ra­ția plăcii și indecșii pentru fie­care speci­men corespund ciclului planificat la con­fi­gu­rare în Local Run Manager.
- 7 Mixați EPH3 în agita­tor vortex și apoi cen­tri­fu­gați scurt.
- 8 Adăugați câte 8,5 µl EPH3 în fie­care godeu pentru speci­me­ne.
- 9 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CF PCR.



ATENȚIE

Asigurați-vă că ați sigilat complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.

- 10 Agitați 1 minut la 1200 rpm.
- 11 Cen­tri­fu­gați 1 minut la 280 × g.
- 12 Introduceți în ciclul termic și rulați programul LQ-RNA.
Con­sul­tați *Programarea cicloarelor termice la pagina 4*.
- 13 Când speci­me­nele ajung la 4°C, mențineți un minut și treceți imediat la pasul următor.

Sintetizare, prima catenă cADN

Procedură

Data și ora inițializării _____

- 1 Scoateți placa CF PCR din ciclul termic.
- 2 Mixați prin pipetare de 5 ori amestecul principal FSM+RVT.
- 3 Adăugați câte 8 µl de amestec principal FSM+ RVT în fie­care godeu pentru speci­me­ne.
- 4 Mixați prin pipetare de 5 ori.
- 5 Eliminați restul de amestec principal FSM+ RVT.
- 6 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CF PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
- 7 Agitați 1 minut la 1200 rpm.
- 8 Cen­tri­fu­gați 1 minut la 280 × g.
- 9 Introduceți în ciclul termic și rulați programul 1stSS.
Con­sul­tați *Programarea cicloarelor termice la pagina 4*.
- 10 Când speci­me­nele ajung la 4°C treceți imediat la pasul următor.
Speci­me­nele pentru prima catenă pot fi păstrate 5 minute la 4°C.

Sintetizare, catena a doua cADN

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Pregătiți următorul reactiv.

- ▶ SSM – mixați prin răsturnare de 10 ori. Centrifugați scurt.

Procedură

- 1 Scoateți placa CF PCR din ciclul termic.
- 2 Adăugați câte 25 µl SSM în fiecare godeu pentru specimene.
- 3 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CF PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
- 4 Agitați 1 minut la 1200 rpm.
- 5 Centrifugați 1 minut la 280 × g.
- 6 Introduceți în ciclul termic și rulați programul 2ndSS.
Consultați [Programarea cicloanelor termice la pagina 4](#).
- 7 Când speci­menele ajung la 4°C, mențineți un minut și treceți imediat la pasul următor.

Purificare cADN

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Pregătiți următorii reactivi.
 - ▶ SPB - aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.
 - ▶ RSB - lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
- 2 Preparați EtOH 80% proaspăt într-o eprubetă conică de 15 ml sau 50 ml.

Reactiv	3 specimene	8 specimene	16 specimene	24 specimene
Alcool etilic 100%, pur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Apă fără DNază/RNază	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Mixați EtOH proaspăt preparat în agitator vortex.
- 4 Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri BIND1 *legare cADN).
- 5 Acoperiți și lăsați deoparte.
- 6 Pregătiți magnetul.

Procedură

Legare

- 1 Scoateți placa CF PCR din ciclul termic.
- 2 Mixați SPB 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele.
- 3 Adăugați imediat câte 90 µl de SPB în fiecare godeu de specimene al plăcii BIND1 MIDI.
Dacă distribuiți SPB cu canal, includeți un factor de excedent de 1,05 la alicotarea de material suficient pentru specimen. Eliminați orice resturi de materiale după ce ați adăugat SPB în fiecare godeu.
- 4 Transferați întregul volum (50 µl) din fiecare specimen din placa CF PCR în godeul corespunzător al plăcii BIND1 MIDI.
- 5 Eliminați placa CF PCR goală.
- 6 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BIND1 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 7 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 8 Incubați 5 minute la temperatura ambiantă.
- 9 Plasați placa BIND1 MIDI 5 minute pe un suport magnetic.
- 10 Cu o pipetă P200 configurată la 200 µl scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.

Spălare

- 1 Spălați bilele după cum urmează.
 - a Mențineți pe suportul magnetic și adăugați 200 μ l de EtOH 80% proaspăt preparat în fiecare godeu.
 - b Așteptați 30 de secunde.
 - c Scoateți și eliminați supernatantul din fiecare godeu.
- 2 Spălați bilele a **două** oară.
- 3 Eliminați EtOH rezidual din fiecare godeu.
Utilizați o pipetă P20 cu vârful fine.
- 4 Eliminați EtOH 80% neutilizat.

Eluare

- 1 Luați placa BIND1 MIDI de pe suportul magnetic.
- 2 Mixați RSB prin răsturnare sau în agitator vortex.
- 3 Adăugați câte 22 μ l RSB în fiecare godeu pentru specimene.
- 4 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BIND1 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 5 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 6 Incubați 2 minute la temperatura ambiantă.
- 7 Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
- 8 Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri PCF (fragmente cADN purificate).
Dacă vă opriți la **PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ** la pagina 12, utilizați o placă PCR.
- 9 Transferați 20 μ l de eluat din fiecare godeu de specimene al plăcii BIND1 MIDI în godeurile corespondente ale plăcii PCF.
- 10 Eliminați placa BIND1 MIDI goală.
- 11 Adăugați câte 30 μ l de RSB în fiecare godeu de specimene al plăcii PCF.
- 12 Mixați prin pipetare de 10 ori.
- 13 Sigilați placa PCF cu folie autoadezivă și lăsați-o la gheață.
- 14 Redepozitați EPH3, FSM, RVT și SSM.
- 15 Dacă procesați specimene derivate din doar din ARN (cADN) și nu vă opriți la punctul de oprire în siguranță, treceți la **Repararea extremităților și extensia homopolimerică** la pagina 15.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, centrifugați placa PCF PCR 1 minut la 280 \times g și depozitați-o la temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 7 zile.

Data și ora opririi _____

Pregătire pentru pașii protocolului

- 1 Scoateți controalele ADN din depozit.
- 2 Scoateți tubul de reactiv din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabel 6 TruSight Oncology Comp Library Prep (refrigerați) (PN 20031119)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
TEB	între 2°C și 8°C	Decongețați la temperatura ambiantă.	Fragmentare gADN

Fragmentare gADN

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Pentru cuantificarea speciemenelor, urmați recomandările din *prospectul TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200007789)*.
- 2 Pregătiți următorul reactiv.
 - ▶ TEB – Mixați prin răsturnare sau în agitator vortex.

Procedură

Pregătiți placa

- 1 **Selectați una din următoarele trei opțiuni pregătire a plăcii.**
 - ▶ **Opțiunea 1:** Procesați speciemenele gADN simultan cu specimene cADN în placa PCF MIDI.
 - a Etichetați placa PCF MIDI cu LP (pregătirea bibliotecii).
 - b Puneți placa la gheață și lăsați-o la gheață pentru utilizarea în pasul *Transferul ADN fragmentat la pagina 14*.
 - ▶ **Opțiunea 2:** Procesați speciemenele gADN simultan cu specimene cADN, cu placa PCF PCR congelată.
 - a Decongețați placa PCF PCR la temperatura ambiantă.
 - b Centrifugați 1 minut la 280 × g.
 - c Mixați prin pipetare de 10 ori.
 - d Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri cu LP (pregătirea bibliotecii).
 - e Transferați integral 50 μl din fiecare specimen din placa PCF PCR în godeul corespunzător al plăcii LP MIDI.
 - f Eliminați placa PCF PCR.
 - g Sigilați cu folia autoadezivă și lăsați la gheață până la utilizarea în pasul *Transferul ADN fragmentat la pagina 14*.
 - ▶ **Opțiunea 3:** Procesați doar specimene de gADN.
 - a Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri cu LP (pregătirea bibliotecii).
 - b Dacă vă opriți la *PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ la pagina 14*, utilizați o placă PCR.
 - c Acoperiți și lăsați-o deoparte pentru utilizarea în pasul *Transferul ADN fragmentat la pagina 14*.

Diluarea gADN

- 1 Decongețați speciemenele de gADN și controalele la temperatura ambiantă.
Procesați controalele ADN ca specimene pe durata restului protocolului.
- 2 Mixați fiecare specimen de gADN prin pipetare de 10 ori.
- 3 Centrifugați scurt tubul pentru colectarea picăturilor fine.
- 4 Mixați TEB prin răsturnare sau în agitator vortex.
- 5 Preparați 40 ng din fiecare specimen gADN într-un volum final de 52 μl (0,77 ng/μl) cu TEB.
Analiza necesită o concentrație minimă de extracție corespunzătoare de 3,33 ng/μl pentru a permite cel puțin 40 μl TEB din volumul de 52 μl. Pentru controalele ADN, utilizați concentrația specificată pe eticheta tubului. Pentru a împiedica pierderile de specimene, nu pipetați mai puțin de 2 μl de specimen în această diluție.

Fragmentare

- 1 Adăugați 52 μl din fiecare specimen gADN într-un godeu separat al tubului pentru baie cu ultrasunete.
- 2 Înregistrați orientarea benzii.
- 3 Fragmentați gADN în baie cu ultrasunete.

Transferul ADN fragmentat

- 1 Asigurați-vă că configurația plăcii și indecșii pentru fiecare specimen corespund ciclului planificat la configurare în Local Run Manager.
- 2 Urmați instrucțiunile producătorului băii cu ultrasunete pentru recuperarea specimenului.
La unele băi cu ultrasunete e posibil să fie necesară centrifugarea pentru consolidarea specimenului în tub.
- 3 Pentru fiecare specimen de gADN fragmentat, efectuați câte 3 transferuri a câte 16,7 µl cu o pipetă p20 cu vârfuri fine într-un godeu gol al plăcii LP MIDI.
- 4 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP MIDI.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, aplicați folie de sigilare autoadezivă pe placa LP PCR și centrifugați-o 1 minut la 280 × g. Depozitați la temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 7 zile.

Data și ora opririi _____

Pregătire pentru pașii protocolului

- 1 Pregătiți o frapieră.
- 2 Scoateți tubul de reactiv din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabel 7 Cutie TruSight Oncology Comp Library Prep (congealați) (PN 20031118)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
ERA1-A	între -25°C și -15°C	Păstrați la gheață.	Repararea extremităților și extensia homopolimerică
ERA1-B	între -25°C și -15°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Repararea extremităților și extensia homopolimerică
ALB1	între -25°C și -15°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Adaptori de ligare
LIG3	între -25°C și -15°C	Păstrați la gheață.	Adaptori de ligare
SUA1 (capac albastru)	între -25°C și -15°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Adaptori de ligare
UMI (capac alb)	între -25°C și -15°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Adaptori de ligare
STL	între -25°C și -15°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Adaptori de ligare
EPM	între -25°C și -15°C	Păstrați la gheață.	Indexare PCR

Tabel 8 Cutie TruSight Oncology Comp Library Prep (refrigerati) (PN 20031119)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
SPB (etichetă verde deschis)	între 2°C și 8°C	Aduceți la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.	Ligare purificare
RSB	între 2°C și 8°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Ligare purificare

Tabel 9 Cutie TruSight Oncology Comp UP Index Primers (PN 20031120)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
UPxx	între -25°C și -15°C	Decongealați tuburile cu primer de indexare corespunzătoare la temperatura ambiantă.	Indexare PCR

Tabel 10 Cutie TruSight Oncology Comp CP Index Primers (PN 20031126)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
CPxx	între -25°C și -15°C	Decongețați tuburile cu primer de indexare corespunzătoare la temperatura ambiantă.	Indexare PCR

Repararea extremităților și extensia homopolimerică

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Preîncălziți 2 incubatoare de microspecimene cu un bloc termic MIDI la, după cum urmează.
 - ▶ Preîncălziți un incubator de microspecimene la 30°C.
 - ▶ Preîncălziți un incubator de microspecimene la 72°C.
- 2 Pregătiți următorii reactivi.
 - ▶ ERA1-A – Centrifugați scurt amestecul și apoi mixați-l prin pipetare. Păstrați la gheață.
 - ▶ ERA1-B – Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt. Verificați dacă prezintă precipitare. Dacă există precipitare, încălziți tubul la 37°C și apoi mixați prin pipetare până la dizolvarea precipitatului.
- 3 Preparați amestec principal ERA1 într-un tub de microcentrifugare.

Tabel 11 Amestec principal ERA1

Componente, amestec principal	3 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

Tabelul include și volumele excedentare. Pentru calcule, consultați secțiunea Manipularea reactivilor din *prospectul TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200007789)*.

- 4 Mixați prin pipetare lentă de 10 ori, centrifugați scurt și apoi păstrați amestecul principal ERA1 la gheață.
- 5 Selectați opțiunea adecvată de pregătire a plăcii din cele două disponibile.
 - ▶ **Opțiunea 1:** Dacă speciemenle se află pe o placă MIDI.
 - a Reetichetați placa MIDI cu LP2 (pregătire bibliotecă 2).
Dacă unele speciemenle sunt în plăci MIDI separate, mutați toate speciemenle în godeuri separate ale aceleiași plăci MIDI, conform configurației plăcii.
 - ▶ **Opțiunea 2:** Dacă placa este congelată.
 - a Decongețați placa PCF PCR sau placa LP PCR la temperatura ambiantă.
 - b Centrifugați placa 1 minut la 280 × g.
 - c Mixați prin pipetare de 10 ori.
 - d Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri cu LP2 (pregătire bibliotecă 2).
 - e Transferați întreaga cantitate de 50 µl din fiecare speciemen din placa PCF PCR sau placa LP PCR în godeul corespunzător al plăcii LP2 MIDI.
 - f Eliminați plăcile PCF PCR sau LP PCR.

Procedură

- 1 Adăugați câte 10 µl de amestec principal ERA1 în fiecare godeu al plăcii LP2 MIDI.
- 2 Eliminați restul de amestec principal ERA1.
- 3 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
- 4 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 5 Incubați 30 de minute în incubator de microspecimene preîncălzit, la 30°C.

- 6 Transferați imediat într-un alt incubator de microspecimene preîncălzit și incubați 20 de minute la 72°C.
- 7 Dați placa LP2 MIDI la gheață 5 minute.

Adaptori de ligare

Prin acest proces se efectuează ligarea adaptorilor la extremitățile fragmentelor de cADN și/sau gADN.

Testul TSO Comprehensive include adaptori pentru SUA1 și UMI.

- ▶ Utilizați adaptorii SUA1 cu specimene ARN.
- ▶ Utilizați adaptorii UMI cu specimene ADN.

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Pregătiți următorii reactivi.
 - ▶ ALB1 – Mixați în agitator vortex minimum 10 secunde și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ LIG3 – Centrifugați scurt amestecul și apoi mixați-l prin pipetare. Păstrați la gheață.
 - ▶ SUA1 – Mixați în agitator vortex minimum 10 secunde și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ UMI – Mixați în agitator vortex minimum 10 secunde și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ STL – lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.

Procedură

- 1 Scoateți placa LP2 MIDI de la gheață.
- 2 Adăugați câte 60 μl de ALB1 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii LP2 MIDI, pipetând lent.
- 3 Adăugați câte 5 μl LIG3 în fiecare godeu pentru specimene.
- 4 Adăugați adaptorii.
 - Nu** combinați tipuri de adaptori diferite.
 - **Godeuri de specimene ARN** – 10 μl SUA1 (capac albastru) la fiecare specimen derivat din ARN.
 - **Godeuri de specimene ADN** – 10 μl UMI (capac alb) la fiecare specimen derivat din ADN.
- 5 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP2 MIDI. Sigilați complet marginile și godeurile.
- 6 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 7 Incubați 30 de minute la temperatura ambiantă.
- 8 Mixați STL în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 9 Adăugați câte 5 μl de STL în fiecare godeu de specimene al plăcii LP2 MIDI.
- 10 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP2 MIDI. Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
- 11 Agitați 2 minute la 1800 rpm.

Ligare purificare

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Pregătiți următorii reactivi.
 - ▶ SPB – aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.
 - ▶ RSB – lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
- 2 Preparați EtOH 80% proaspăt într-o eprubetă conică de 15 ml sau 50 ml.

Reactiv	3 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
Alcool etilic 100%, pur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Apă fără DNază/RNază	500 μl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Mixați EtOH proaspăt preparat în agitator vortex.
- 4 Pregătiți magnetul.

Procedură

Legare

- 1 Mixați SPB 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele.
- 2 Adăugați imediat câte 112 µl de SPB în fiecare godeu de specimene al plăcii LP2 MIDI.
Dacă distribuiți SPB cu canal, includeți un factor de excedent de 1,05 la alicotarea de material suficient pentru specimen. Eliminați orice resturi de materiale după ce ați adăugat SPB în fiecare godeu.
- 3 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 4 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 5 Incubați 5 minute la temperatura ambiantă.
- 6 Plasați placa LP2 MIDI 10 minute pe un suport magnetic.
- 7 Cu o pipetă P20 configurată la 200 µl scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.

Spălare

- 1 Spălați bilele după cum urmează.
 - a Mențineți pe suportul magnetic și adăugați 200 µl de EtOH 80% proaspăt preparat în fiecare godeu de specimene.
 - b Așteptați 30 de secunde.
 - c Scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare godeu, fără a perturba peleta cu bile.
- 2 Spălați bilele a **două** oară.
- 3 Eliminați EtOH rezidual din fiecare godeu.
Utilizați o pipetă P20 cu vârfuri fine.
- 4 Eliminați EtOH 80% neutilizat.

Eluare

- 1 Luați placa LP2 MIDI de pe suportul magnetic.
- 2 Mixați RSB prin răsturnare sau în agitator vortex.
- 3 Adăugați câte 27,5 µl RSB în fiecare godeu pentru specimene.
- 4 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 5 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 6 Incubați 2 minute la temperatura ambiantă.
- 7 Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
- 8 Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri cu LS (pregătirea bibliotecii).
- 9 Transferați câte 25 µl de eluat din placa LP2 MIDI în godeul corespunzător al plăcii LS PCR.
- 10 Eliminați placa LP2 MIDI goală.
- 11 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LS PCR.

Indexare PCR

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Pregătiți următorii reactivi.
 - ▶ EPM – Păstrați la gheață.

- ▶ UPxx – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt. UPxx este primerul de indexare selectat pe ecranul Create Run (creare ciclu) al software-ului Local Run Manager la configurarea ciclului.
- ▶ CPxx – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt. CPxx este primerul de indexare selectat pe ecranul Create Run (creare ciclu) al software-ului Local Run Manager la configurarea ciclului.
- 2 Asigurați-vă că indecșii pentru fiecare specimen corespund ciclului planificat la configurare în Local Run Manager. Respectați instrucțiunile privind selectarea indecșilor din *prospectul TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200007789)*.

**ATENȚIE**

Nepotriririle între probe și primerii de indexare pot duce la raportarea incorectă a rezultatelor din cauza absenței identificării probelor pozitive.

Procedură

- 1 Adăugați 5 μl de primer de indexare adecvat (UPxx sau CPxx) în godeul corespunzător din placa LS PCR, conform indecșilor selectați de pe ecranul Create Run (creare ciclu) din Local Run Manager la configurarea ciclului.

**ATENȚIE**

Manipulați și deschideți câte un singur tub de primer de indexare o dată. Închideți fiecare tub de index cu capacul imediat după utilizare. Nu combinați primerii de indexare între ei.

- 2 Mixați EPM în agitator vortex 5 secunde și apoi centrifugați scurt.
- 3 Adăugați câte 20 μl EPM în fiecare godeu pentru specimene.
- 4 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LS PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
- 5 Agitați 1 minut la 1200 rpm.
- 6 Redepozitați reactivii de preamplificare.

**ATENȚIE**

Efectuați toți pașii ulteriori în zona de postamplificare pentru a preveni contaminarea prin transfer a produsului amplificării.

- 7 Centrifugați placa LS PCR 1 minut la 280 × g.
- 8 Introduceți-o în ciclul termic de postamplificare preprogramat și rulați programul I-PCR.
Consultați *Programarea cicloarelor termice la pagina 4*.

NOTĂ Dacă continuați cu *Configurare, prima hibridizare la pagina 19*, urmați instrucțiunile de decongelare din Pregătirea pașilor protocolului.

- 9 După finalizarea programului I-PCR, centrifugați placa LS PCR 1 minut la 280 × g.
- 10 Reetichetați-o ca ALS (Amplified Library Samples/specimene de bibliotecă amplificate).

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, depozitați placa ALS PCR la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 30 zile.

Data și ora opririi _____

Pregătire pentru pașii protocolului

- 1 Asigurați-vă că ați setat programele ciclului termic. Consultați *Programarea cicloarelor termice la pagina 4*.
- 2 Scoateți tubul de reactiv din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabel 12 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (refrigerare) (PN 20031123)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
TCB1	între 2°C și 8°C	Decongețați la temperatura ambiantă.	Configurare, prima hibridizare

Tabel 13 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (congelare) (PN 20031121)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
TCA1	între -25°C și -15°C	Decongețați la temperatura ambiantă.	Configurare, prima hibridizare

Tabel 14 Cutie TruSight Oncology Comp Content Set (PN 20031122)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
OPR1 (capac roșu)	între -25°C și -15°C	Decongețați la temperatura ambiantă.	Configurare, prima hibridizare
OPD2 (capac alb)	între -25°C și -15°C	Decongețați la temperatura ambiantă.	Configurare, prima hibridizare

Configurare, prima hibridizare

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Pregătiți următorii reactivi.
 - ▶ TCB1 – încălziți tubul 5 minute la 37°C. Mixați în agitator vortex 10 secunde și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ TCA1 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ OPR1 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ OPD2 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 2 Dacă placa ALS PCR a fost depozitată, decongețați-o la temperatura ambiantă și centrifugați-o 1 minut la 280 × g. Apoi, mixați prin pipetare.
- 3 Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri HYB1 (hibridizare 1)

Procedură

- 1 Transferați câte 20 μl din biblioteca cDNA și/sau gDNA din placa ALS PCR în godeul corespondent al plăcii HYB1 PCR.
- 2 Sigilați placa ALS PCR cu folie autoadezivă și lăsați-o deoparte.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 3 Verificați dacă TCB1 prezintă precipitare. Dacă prezintă precipitare, reîncălziți tubul și agitați-l în agitator vortex până la dizolvarea cristalelor.
- 4 Adăugați câte 15 μl de TCB1 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii HYB1 PCR.
- 5 Adăugați câte 10 μl de TCA1 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii HYB1 PCR.
- 6 Adăugați sondele.
Nu combinați tipuri de sonde diferite.
 - ▶ Godeuri de bibliotecă ARN – 5 μl OPR1 în fiecare bibliotecă derivată din ARN.
 - ▶ Godeuri de bibliotecă ADN – 5 μl OPD2 în fiecare bibliotecă derivată din ARN.
- 7 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa HYB1 PCR.



ATENȚIE

Asigurați-vă că ați sigilat complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.

- 8 Agitați 2 minute la 1200 rpm.
- 9 Introduceți în ciclul termic și rulați programul HYB1.
Consultați [Programarea cicloarelor termice la pagina 4](#).
- 10 Hibridizați între minimum 8 ore și maximum 24 ore la 57°C.
- 11 Redepozitați reactivii de hibridizare.
- 12 Depozitați placa ALS PCR la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 30 zile.

Pregătire pentru pașii protocolului

- 1 La începutul zilei 2, scoateți tubul de reactiv din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabel 15 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (refrigerare) (PN 20031123)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
SMB (etichetă albastru închis)	între 2°C și 8°C	Aduceți la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.	Captură, prima țintă Captură, a doua țintă
ET2	între 2°C și 8°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Captură, prima țintă Captură, a doua țintă
HP3	între 2°C și 8°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Captură, prima țintă Captură, a doua țintă Normalizarea bibliotecilor
TCB1	între 2°C și 8°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Configurare, a doua hibridizare
RSB	între 2°C și 8°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Captură, a doua țintă Purificare, bibliotecă concentrată

Tabel 16 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (congelare) (PN 20031121)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
EE2	între -25°C și -15°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Captură, prima țintă Captură, a doua țintă Normalizarea bibliotecilor
EEW	între -25°C și -15°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Captură, prima țintă
TCA1	între -25°C și -15°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Configurare, a doua hibridizare

Tabel 17 Cutie TruSight Oncology Comp Content Set (PN 20031122)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
OPR1 (capac roșu)	între -25°C și -15°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Configurare, a doua hibridizare
OPD2 (capac alb)	între -25°C și -15°C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Configurare, a doua hibridizare

Captură, prima țintă

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Preîncălziți un incubator de microspecimene cu un bloc termic MIDI la 57°C.
- 2 Pregătiți următorii reactivi.
- ▶ EEW – mixați 1 minut în agitator vortex.
 - ▶ EE2 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ HP3 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ SMB – aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.
 - ▶ Utilizați **SMB**, nu SPB, pentru această procedură.
 - ▶ ET2 – lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
- 3 Preparați amestec de eluare EE2+HP3 într-un tub de microcentrifugare.

Tabel 18 Amestec de eluare EE2+HP3 pentru captare, prima țintă

Componente, amestec de eluare	3 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Tabelul include și volumele excedentare. Pentru calcule, consultați secțiunea Manipularea reactivilor din *prospectul TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200007789)*.

- 4 Mixați amestecul de eluare EE2+HP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt. Lăsați deoparte pentru pasul *Eluare*.
- 5 Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri CAP1 (captare 1).
- 6 Pregătiți magnetul.

Procedură

Legare

- 1 Scoateți placa HYB1 PCR din ciclul termic.
- 2 Centrifugați placa HYB1 PCR 1 minut la 280 × g.
- 3 Mixați SMB 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele.
- 4 Adăugați imediat câte 150 μl de SMB în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii CAP1 MIDI.
Dacă distribuiți SMB cu canal, includeți un factor de excedent de 1,15 la alicotarea de material suficient pentru specimen. Eliminați orice resturi de materiale după ce ați adăugat SMB în fiecare godeu.
- 5 Configurați pipeta la 50 μl și transferați întregul volum din fiecare bibliotecă din placa HYB1 PCR în godeul corespondent al plăcii CAP1 MIDI.
- 6 Eliminați placa HYB1 PCR goală.
- 7 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP1 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
- 8 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 9 Incubați 25 de minute în incubator de microspecimene preîncălzit, la 57°C.
- 10 Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
- 11 Mențineți placa CAP1 MIDI pe suportul magnetic și scoateți și eliminați, cu o pipetă P200 configurată la 200 μl tot supernatantul fără a perturba peleta cu bile.



ATENȚIE

Treceți imediat la pasul următor (*Spălare*). Nu lăsați peleta cu bile fără lichid prea mult timp.

Spălare

- 1 Spălați bilele după cum urmează.
 - a Luați placa CAP1 MIDI de pe suportul magnetic.
 - b Adăugați câte 200 μl EEW în fiecare godeu.
 - c Setati volumul pipetei la 150 μl și mixați prin pipetare de cel puțin 10 ori. Asigurați-vă că toate bilele sunt din nou în suspensie.



ATENȚIE

Asigurați-vă că nu există pelete cu bile aspirând atent toată soluția cu bile din godeu în vârful de pipetă. Apoi, căutați peletele pe fundul fiecărui godeu. Pentru a o disloca, orientați vârful de pipetă oblic spre peleta cu bile. Asigurați-vă că peleta cu bile este complet acoperită cu soluție. Soluția ar trebui să aibă culoarea maro închis și consistență omogenă.

- d Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP1 MIDI.
 - e Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
 - f Agitați 4 minute la 1800 rpm.
 - g Incubați 5 minute în incubator de microspecimene, la 57°C.
 - h Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
 - i Lăsați pe suportul magnetic și scoateți și eliminați supernatantul din fiecare godeu fără a disloca peleta cu bile.
- 2 Spălați bilele a **două** oară.

- 3 Spălați bilele a **treia** oară.
- 4 Eliminați supernatantul rezidual din fiecare godeu.
Utilizați o pipetă P20 cu vârfuri fine.

Eluare

- 1 Luați placa CAP1 MIDI de pe suportul magnetic.
- 2 Mixați amestecul de eluare EE2+HP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 3 Adăugați atent câte 17 μ l de amestec de eluare EE2+HP3 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii CAP1 MIDI.
- 4 Eliminați restul de amestec de eluare EE2+HP3.
- 5 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP1 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 6 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 7 Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
- 8 Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri cu ELU1 (eluare 1)
- 9 Mixați ET2 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 10 Adăugați câte 5 μ l de ET2 în fiecare godeu corespondent de bibliotecă al noii plăci ELU1 PCR.
- 11 Transferați atent 15 μ l de eluat din fiecare godeu de bibliotecă al plăcii CAP1 MIDI în godeurile corespondente ale plăcii ELU1 PCR.
- 12 Eliminați placa CAP1 MIDI goală.
- 13 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa ELU1 PCR.
- 14 Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
- 15 Agitați 2 minute la 1200 rpm.
- 16 Redepozitați EEW.

Configurare, a doua hibridizare

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Pregătiți următorii reactivi.
 - ▶ TCB1 – încălziți tubul 5 minute la 37°C. Mixați în agitator vortex 10 secunde și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ TCA1 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ OPR1 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ OPD2 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

Procedură

- 1 Verificați dacă TCB1 prezintă precipitare. Dacă prezintă precipitare, reîncălziți și agitați în agitator vortex până la dizolvarea cristalelor.
- 2 Adăugați câte 15 μ l de TCB1 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii ELU1 PCR.
- 3 Adăugați câte 10 μ l TCA1 în fiecare godeu pentru bibliotecă.
- 4 Adăugați sondele.
Nu combinați tipuri de sonde diferite.
 - ▶ **Godeuri de bibliotecă ARN** – 5 μ l OPR1 în fiecare bibliotecă derivată din ARN.
 - ▶ **Godeuri de bibliotecă ADN** – 5 μ l OPD2 în fiecare bibliotecă derivată din ARN.
- 5 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa ELU1 PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
- 6 Agitați 2 minute la 1200 rpm.
- 7 Introduceți în ciclul termic și rulați programul HYB2.
Consultați *Programarea cicloarelor termice la pagina 4*.
- 8 Hibridizați între minimum 1,5 ore și maximum 4 ore la 57°C.
- 9 Redepozitați TCA1, TCB1, OPR1 și OPD2.

Captură, a doua țintă

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Preîncălziți un incubator de microspecimene cu un bloc termic MIDI la 57°C.
- 2 Pregătiți următorii reactivi.
 - ▶ EE2 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ HP3 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ SMB – aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.
 - ▶ Utilizați **SMB**, nu SPB, pentru această procedură.
 - ▶ RSB – lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
 - ▶ ET2 - lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
- 3 Preparați amestec de eluare EE2+HP3 într-un tub de microcentrifugare.

Tabel 19 Amestec de eluare EE2+HP3 pentru captare, a doua țintă

Componente, amestec de eluare	3 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Tabelul include și volumele excedentare. Pentru calcule, consultați secțiunea Manipularea reactivilor din *prospectul TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200007789)*.

- 4 Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt. Lăsați deoparte pentru pasul *Eluare*.
- 5 Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri CAP2 (captare 2).
- 6 Pregătiți magnetul.

Procedură

Legare

- 1 Scoateți placa ELU1 PCR din ciclul termic.
- 2 Centrifugați placa ELU1 PCR 1 minut la 280 x g.
- 3 Mixați SMB 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele.
- 4 Adăugați imediat câte 150 µl de SMB în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii CAP2 MIDI.
Dacă distribuiți SMB cu canal, includeți un factor de excedent de 1,15 la alicotarea de material suficient pentru specimen. Eliminați orice resturi de materiale după ce ați adăugat SMB în fiecare godeu.
- 5 Configurați pipeta la 50 µl și transferați întregul volum din fiecare bibliotecă din placa ELU1 PCR în godeul corespondent al plăcii CAP2 MIDI.
- 6 Eliminați placa ELU1 PCR goală.
- 7 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
- 8 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 9 Incubați 25 de minute în incubator de microspecimene, la 57°C.

NOTĂ Dacă continuați în aceeași zi cu pasul *Amplificare, bibliotecă concentrată la pagina 25*, urmați instrucțiunile de decongelare a reactivilor din secțiunea Pregătire pentru pașii protocolului.

- 10 Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
- 11 Mențineți placa CAP2 MIDI pe suportul magnetic și scoateți și eliminați, cu o pipetă P200 configurată la 200 µl tot supernatantul din fiecare bibliotecă, fără a perturba peleta cu bile.



ATENȚIE

Treceți imediat la pasul următor (*Spălare*). Nu lăsați peleta cu bile fără lichid prea mult timp.

Spălare

- 1 Luați placa CAP2 MIDI de pe suportul magnetic.
- 2 Mixați RSB prin răsturnare sau în agitator vortex.
- 3 Adăugați câte 200 μ l RSB în fiecare godeu.
- 4 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 5 Agitați 4 minute la 1800 rpm.
- 6 Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
- 7 Mențineți placa CAP2 MIDI pe suportul magnetic și scoateți și eliminați tot supernatantul, fără a perturba peleta cu bile.
- 8 Eliminați supernatantul rezidual din fiecare godeu.
Utilizați o pipetă P20 cu vârful fine.

Eluare

- 1 Luați placa CAP2 MIDI de pe suportul magnetic.
- 2 Mixați amestecul de eluare EE2+HP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 3 Adăugați câte 22 μ l de amestec de eluare EE2+HP3 în fiecare godeu al plăcii CAP2 MIDI.
- 4 Eliminați restul de amestec de eluare EE2+HP3.
- 5 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 6 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 7 Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
- 8 Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri cu ELU2 (eluare 2)
- 9 Mixați ET2 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 10 Adăugați câte 5 μ l de ET2 în fiecare godeu corespondent de bibliotecă al noii plăci ELU2 PCR.
- 11 Transferați atent 20 μ l de eluat din fiecare godeu de bibliotecă al plăcii CAP2 MIDI în godeurile corespondente ale plăcii ELU2 PCR.
- 12 Eliminați placa CAP2 MIDI goală.
- 13 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa ELU2 PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
- 14 Agitați 2 minute la 1200 rpm.
- 15 Redepozitați SMB, EE2, HP3 și ET2.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, centrifugați placa ELU2 PCR 1 minut la 280 \times g și depozitați-o la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 7 zile. Redepozitați RSB.

Data și ora opririi _____

Pregătire pentru pașii protocolului

- 1 Pregătiți o frapieră.
- 2 Scoateți tubul de reactiv din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabel 20 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (congelare) (PN 20031121)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
PPC3	între -25°C și -15°C	Decongețați la temperatura ambiantă.	Amplificare, bibliotecă concentrată
EPM	între -25°C și -15°C	Păstrați la gheață.	Amplificare, bibliotecă concentrată

Tabel 21 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (refrigerare) (PN 20031123)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
SPB (etichetă verde deschis)	între 2°C și 8°C	Aduceți la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.	Amplificare de purificare, bibliotecă concentrată
RSB	între 2°C și 8°C	Decongețați la temperatura ambiantă.	Amplificare de purificare, bibliotecă concentrată Pregătire pentru secvențiere

Amplificare, bibliotecă concentrată

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Dacă placa ELU2 a fost depozitată, decongețați-o la temperatura ambiantă și centrifugați-o 1 minut la 280 x g.

Procedură

- 1 Mixați PPC3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 2 Adăugați câte 5 μl de PPC3 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii ELU2 PCR.
- 3 Mixați EPM în agitator vortex 5 secunde și apoi centrifugați scurt.
- 4 Adăugați câte 20 μl EPM în fiecare godeu pentru bibliotecă.
- 5 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa ELU2 PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
- 6 Agitați 2 minute la 1200 rpm.
- 7 Introduceți în ciclul termic și rulați programul EL-PCR.
Consultați *Programarea cicloarelor termice la pagina 4*.

NOTĂ Dacă continuați în aceeași zi cu pasul *Normalizarea bibliotecilor la pagina 27*, urmați instrucțiunile de decongelare din secțiunea Pregătire pentru pașii protocolului.

- 8 Redepozitați PPC3 și EPM.

Purificare, bibliotecă concentrată amplificată

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Pregătiți următorii reactivi.
 - ▶ SPB – aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.
 - ▶ Utilizați **SPB**, nu SMB, pentru această procedură.
 - ▶ RSB – lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
- 2 Preparați etanol 80% proaspăt într-o eprubetă conică de 15 ml sau 50 ml.

Reactiv	3 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
Alcool etilic 100%, pur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Apă fără DNază/RNază	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Mixați EtOH proaspăt preparat în agitator vortex.
- 4 Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri BIND2 (purificare legare).
- 5 Pregătiți magnetul.

Procedură

Legare

- 1 Scoateți placa ELU2 PCR din ciclorul termic.
- 2 Centrifugați placa ELU2 PCR 1 minut la 280 × g.
- 3 Mixați SPB 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele.
- 4 Adăugați imediat câte 110 µl de SPB în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii BIND2 MIDI.
- 5 Transferați 50 µl din fiecare bibliotecă din placa ELU2 PCR în godeul corespunzător al plăcii BIND2 MIDI.
- 6 Eliminați placa ELU2 PCR goală.
- 7 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BIND2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 8 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 9 Incubați 5 minute la temperatura ambiantă.
- 10 Plasați 5 minute pe un suport magnetic.
- 11 Cu o pipetă P20 configurată la 200 µl scoateți și eliminați **tot** supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.

Spălare

- 1 Spălați bilele după cum urmează.
 - a Mențineți pe suportul magnetic și adăugați 200 µl de EtOH 80% proaspăt preparat în fiecare godeu.
 - b Așteptați 30 de secunde.
 - c Scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.
- 2 Spălați bilele a **doua** oară.
- 3 Eliminați EtOH rezidual din fiecare godeu.
Utilizați o pipetă P20 cu vârful fine.
- 4 Eliminați EtOH 80% neutilizat.

Eluare

- 1 Luați placa BIND2 MIDI de pe suportul magnetic.
- 2 Mixați RSB prin răsturnare sau în agitator vortex.
- 3 Adăugați câte 32 µl RSB în fiecare godeu de bibliotecă.
- 4 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BIND2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 5 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 6 Incubați 2 minute la temperatura ambiantă.
- 7 Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
- 8 Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri cu PL (biblioteci purificate)
- 9 Transferați câte 30 µl de eluat din placa BIND2 MIDI în godeul corespunzător al plăcii PL PCR.
- 10 Eliminați placa BIND2 MIDI goală.
- 11 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa PL PCR.
- 12 Redepozitați SPB.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți centrifugați placa PL PCR 1 minut la 280 × g și depozitați-o la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 30 zile. Redepozitați RSB.

Data și ora opririi _____

Pregătire pentru pașii protocolului

- 1 Scoateți tubul de reactiv din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabel 22 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (congelare) (PN 20031121)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
LNA1	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Normalizarea bibliotecilor
EE2	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Normalizarea bibliotecilor

Tabel 23 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (refrigerare) (PN 20031123)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
LNB1	între 2°C și 8°C	Aduceți la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.	Normalizarea bibliotecilor
HP3	între 2°C și 8°C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Normalizarea bibliotecilor Pregătire pentru secvențiere
LNW1	între 2°C și 8°C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Normalizarea bibliotecilor
LNS1	între 2°C și 8°C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Normalizarea bibliotecilor

- 2 Dacă continuați în aceeași zi cu pasul *Pregătire pentru secvențiere la pagina 30*, urmați instrucțiunile de decongelare din secțiunea Pregătire pentru pașii protocolului.

Normalizarea bibliotecilor**Pregătirea**

Data și ora inițializării _____

- 1 Pregătiți următorii reactivi.
 - ▶ LNB1 – aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.
 - ▶ LNA1 – mixați în agitator vortex.
 - ▶ EE2 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ HP3 – mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - ▶ LNW1 – mixați în agitator vortex. Lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
 - ▶ LNS1 – mixați în agitator vortex. Lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
- 2 Mixați LNB1 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele.
Răsturnați tubul LNB1 pentru a vă asigura că toate bilele sunt resuspendate.
- 3 Cu un set P1000 de 800 μl, pipetați și distribuiți LNB1 repetat de 10 ori pentru a asigura resuspendarea bilelor.
- 4 Preparați imediat amestec principal LNA1+LNB1 proaspăt într-un tub conic.

**ATENȚIE**

Resuspendați complet peleta cu bile LNB1 la fundul tubului pentru a preveni inconsecvența în densitatea clusterelor.

Tabel 24 Amestec principal LNA1+LNB1

Componente, amestec principal	3 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
LNA1	229 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Tabelul include și volumele excedentare. Pentru calcule, consultați secțiunea Manipularea reactivilor din *prospectul TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200007789)*.

- 5 Agitați amestecul principal LNA1+LNB1 în agitator vortex. Lăsați deoparte pentru pasul *Legare*.
- 6 Preparați amestec de eluare EE2+HP3 într-un tub de microcentrifugare.

Tabel 25 Amestec de eluare EE2+HP3 pentru normalizarea bibliotecilor

Componente, amestec de eluare	3 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Tabelul include și volumele excedentare. Pentru calcule, consultați secțiunea Manipularea reactivilor din *prospectul TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200007789)*.

- 7 Agitați amestecul de eluare în agitator vortex și apoi centrifugați scurt. Lăsați deoparte pentru pasul *Eluare*.
- 8 Dacă placa PL PCR a fost depozitată, decongealați-o la temperatura ambiantă și centrifugați-o 1 minut la 280 × g și apoi pipetați pentru mixare.
- 9 Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri BBN (normalizare cu bile).
- 10 Pregătiți magnetul.

Procedură

Legare

- 1 Agitați amestecul principal LNA1+LNB1 în agitator vortex.
- 2 Adăugați imediat câte 45 µl de amestec principal LNA1+LNB1 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii BBN MIDI.
- 3 Eliminați restul de amestec principal LNA1+LNB1.
- 4 Adăugați 20 µl din fiecare bibliotecă din placa PL PCR în godeul corespunzător al plăcii BBN MIDI.
- 5 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BBN MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 6 Agitați 30 de minute la 1800 rpm.
- 7 Sigilați placa PL PCR cu folie autoadezivă și redepozitați-o.
- 8 Plasați placa 2 minute pe un suport magnetic.
- 9 Lăsați pe suportul magnetic și, cu o pipetă P200, scoateți și eliminați supernatantul din fiecare godeu fără a disloca peleta cu bile.

Spălare

- 1 Spălați bilele după cum urmează.
 - a Luați placa BBN MIDI de pe suportul magnetic.
 - b Adăugați câte 45 µl LNW1 în fiecare godeu pentru bibliotecă.
 - c Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BBN MIDI.
 - d Sigilați complet marginile și godeurile.
 - e Agitați 5 minute la 1800 rpm.
 - f Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
 - g Scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare godeu, fără a perturba peleta cu bile.
- 2 Spălați bilele a **două** oară.

- 3 Eliminați supernatantul rezidual din fiecare godeu.
Utilizați o pipetă P20 cu vârful fine.

Eluare

- 1 Luați placa BBN MIDI de pe suportul magnetic.
- 2 Mixați amestecul de eluare EE2+HP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 3 Adăugați câte 32 μ l de EE2+ HP3 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii BBN MIDI.
- 4 Eliminați restul de amestec de eluare.
- 5 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BBN MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 6 Agitați 2 minute la 1800 rpm.
- 7 Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
- 8 Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri cu NL (biblioteci normalizate)
- 9 Transferați atent 30 μ l de eluat din fiecare godeu de bibliotecă al plăcii BBN MIDI în godeurile corespondente ale plăcii NL PCR.



ATENȚIE

Dacă ați aspirat bile în vârful de pipetă, returnați bilele în placa de pe suportul magnetic și așteptați să se limpezească lichidul (cca. 2 minute) înainte de a trece la următorul pas al procedurii.

- 10 Eliminați placa BBN MIDI goală.
- 11 Mixați LNS1 în agitator vortex.
- 12 Adăugați câte 30 μ l de LNS1 în fiecare godeu de bibliotecă al noii plăci NL PCR.
- 13 Mixați prin pipetare de 5 ori.
- 14 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa NL PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 15 Redepozitați LNB1, LNA1, EE2, LNW1 și LNS1.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, centrifugați placa NL PCR 1 minut la 280 \times g și depozitați-o la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 30 zile.

Data și ora opririi _____

Pregătire pentru pașii protocolului

Începeți prepararea consumabilelor de secvențiere din kitul NextSeq 550Dx High Output Reagent v2.5 (300 cicluri) (PN 20028871) cu cel puțin o oră înainte de utilizare.

- 1 Scoateți soluția tampon de diluție pentru bibliotecă (HT1) din congelator (între -25°C și -15°C) decongelați la temperatura ambiantă și păstrați la gheață.
- 2 Urmați instrucțiunile de preparare din Ghidul de referință pentru *instrumentul NextSeq 550Dx* (nr. document 100000009513) pentru restul consumabilelor din kit.
 - ▶ NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicluri)
 - ▶ NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cicluri)
 - ▶ Cartuș Flow Cell cu eficiență ridicată NextSeq 550Dx versiunea 2.5 (300 de cicluri)
- 3 Scoateți tubul de reactiv din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabel 26 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (congelare) (PN 20031121)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
Control intern PhiX (PhiX)	între -25°C și -15°C	Decongelați la temperatura ambiantă. Păstrați la gheață.	Pregătire pentru secvențiere

Tabel 27 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (refrigerare) (PN 20031123)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
HP3	între 2°C și 8°C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Pregătire pentru secvențiere
RSB (etichetă roz)	între 2°C și 8°C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Pregătire pentru secvențiere

Pregătire pentru secvențiere

Pregătirea

Data și ora inițializării _____

- 1 Consultați ghidul pentru număr de biblioteci și selectarea indecșilor din prospectul *TruSight Oncology Comprehensive (UE)* (nr. document 200007789).
- 2 Etichetați un tub de microcentrifugare de cu dHP3 (HP3 diluat).
- 3 Etichetați un tub de microcentrifugare de cu dPhiX (PhiX diluat).
- 4 Preîncălziți un bloc termic la 96°C pentru tuburile de microcentrifugare.
- 5 Pregătiți o frapieră.

Diluarea și denaturarea controlului PhiX

- 1 Mixați HP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 2 Combinați în tubul de microcentrifugare dHP3 următoarele volume:
 - ▶ 10 µl HP3
 - ▶ 190 µl Apă fără-DNază/RNază
- 3 Mixați dHP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 4 Mixați RSB prin răsturnare sau în agitator vortex.
- 5 Mixați Control PhiX în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 6 Combinați în tubul de microcentrifugare dPhiX următoarele volume:
 - ▶ 8 µl RSB
 - ▶ 2 µl PhiX Control
- 7 Adăugați 10 µl dHP3 în tubul dPhiX.
- 8 Eliminați tubul dHP3.
- 9 Mixați dPhiX în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 10 Incubați dPhiX 5 minute la temperatura ambiantă pentru denaturare.
- 11 Mixați HT1 în agitator vortex.
- 12 Adăugați mediat 980 µl HT1 prerăcit la dPhiX.
- 13 Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 14 Puneți dPhiX la gheață până la utilizarea în prepararea celei de-a doua diluții.
Concentrația finală este 20 pM dPhiX.
- 15 Redepozitați PhiX, HP3 și RSB.

Grupare și denaturare a bibliotecilor

- 1 Dacă placa NL PCR a fost depozitată, decongelați-o la temperatura ambiantă și centrifugați-o 1 minut la 280 × g.
- 2 Cu o pipetă multicanal setată la 30 µl, mixați atent prin pipetare de 5 ori bibliotecile în placa NL PCR.
Utilizați vârfuri de pipetă noi pentru fiecare bibliotecă.



ATENȚIE

Mixați temeinic bibliotecile pentru performanțe optime.

- 3 Selectați una din opțiunile de mai jos pentru grupare, denaturare și diluare de biblioteci.
 - ▶ **Opțiunea 1:** Secvențiați simultan biblioteci derivate din specimene ARN și ADN. Consultați *Opțiunea 1: Biblioteci ADN și ARN împreună la pagina 31.*

- ▶ **Opțiunea 2:** Secvențiați doar biblioteci derivate din specimene ADN. Consultați *Opțiunea 2: Biblioteci exclusiv ADN la pagina 31.*
- ▶ **Opțiunea 3:** Secvențiați doar biblioteci derivate din specimene ARN. Consultați *Opțiunea 3: Biblioteci exclusiv ARN la pagina 32.*

Opțiunea 1: Biblioteci ADN și ARN împreună

- 1 Etichetați un tub de microcentrifugare cu PRL (biblioteci ARN grupate).
- 2 Etichetați un tub de microcentrifugare cu PDL (biblioteci ADN grupate).
- 3 Transferați câte 10 μl din fiecare bibliotecă ARN (cADN) normalizată din placa NL în tubul PRL.
Nu grupați două biblioteci cu același primer de indexare.
- 4 Transferați câte 10 μl din fiecare bibliotecă ADN normalizată din placa NL în tubul PDL.
Nu grupați două biblioteci cu același primer de indexare.
- 5 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa NL PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 6 Mixați fiecare tub PRL și PDL în agitator vortex.
- 7 Centrifugați scurt tuburile PRL și PDL.
- 8 Incubați tuburile PRL și PDL 2 minute în bloc termic, la 96°C.
- 9 Dați PRL și PDL la gheață 5 minute.
- 10 Mixați tuburile PRL și PDL în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 11 Dați din nou tuburile PRL și PDL la gheață.

Preparați a doua diluție

- 1 Etichetați un tub de microcentrifugare de 1,7 ml cu DIL1 (diluția 1).
- 2 Transferați 20 μl PDL în tubul DIL1 gol.
- 3 Adăugați 5 μl PRL în DIL1.
- 4 Eliminați tuburile PDL și PRL.
- 5 Adăugați 475 μl HT1 prerăcit în tubul DIL1 (diluție 1:20).
- 6 Mixați tubul DIL1 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

Preparare, a doua diluție

- 1 Etichetați un tub de microcentrifugare de 2,0 ml cu DIL2 (diluția 2).
- 2 Transferați 40 μl DIL1 în tubul DIL2 gol.
- 3 Eliminați tubul DIL1.
- 4 Adăugați 1660 μl HT1 prerăcit în tubul DIL2 (diluție 1:850).
- 5 Mixați în agitator vortex 20 pM dPhiX preparat și apoi centrifugați scurt.
- 6 Adăugați 2,5 μl 20 pM dPhiX preparat în tubul DIL2.
- 7 Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 8 Încărcați 1300 μl DIL2 în NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicluri) decongelat.
Pentru mai multe informații, consultați *Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000009513).*
- 9 Eliminați tubul DIL2.
- 10 Centrifugați placa NL PCR 1 minut la 280 × g și depozitați-o la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 30 zile.
- 11 Treceți la secvențiere.
Pentru mai multe informații, consultați *Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000009513).*

Opțiunea 2: Biblioteci exclusiv ADN

- 1 Etichetați un tub de microcentrifugare cu PDL (biblioteci ADN grupate).
- 2 Transferați câte 10 μl din fiecare bibliotecă ADN normalizată din placa NL în tubul PDL.

Nu grupați două biblioteci cu același primer de indexare.

- 3 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa NL PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 4 Mixați tubul PDL în agitator vortex.
- 5 Centrifugați scurt tubul PDL.
- 6 Incubați tubul PDL 2 minute în bloc termic, la 96°C.
- 7 Dați PDL la gheață 5 minute.
- 8 Mixați tubul PDL în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 9 Dați din nou tubul PDL la gheață.

Preparați a doua diluție

- 1 Etichetați un tub de microcentrifugare de 1,7 ml cu DIL1 (diluția 1).
- 2 Transferați 10 µl PDL în tubul DIL1 gol.
- 3 Eliminați tubul PDL.
- 4 Adăugați 190 µl HT1 prerăcit în tubul DIL1 (diluție 1:20).
- 5 Mixați DIL1 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

Preparare, a doua diluție

- 1 Etichetați un tub de microcentrifugare de 2,0 ml cu DIL2 (diluția 2).
- 2 Transferați 40 µl DIL1 în tubul DIL2 gol.
- 3 Eliminați tubul DIL1.
- 4 Adăugați 1660 µl HT1 prerăcit în tubul DIL2 (diluție 1:850).
- 5 Mixați în agitator vortex 20 pM dPhiX preparat și apoi centrifugați scurt.
- 6 Adăugați 2,5 µl 20 pM dPhiX preparat în tubul DIL2.
- 7 Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 8 Încărcați 1300 µl DIL2 în NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicluri) decongelat.
Pentru mai multe informații, consultați *Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000009513)*.
- 9 Eliminați tubul DIL2.
- 10 Centrifugați placa NL PCR 1 minut la 280 × g și depozitați-o la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 30 zile.
- 11 Treceți la secvențiere.
Pentru mai multe informații, consultați *Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000009513)*.

Opțiunea 3: Biblioteci exclusiv ARN

- 1 Etichetați un tub de microcentrifugare cu PRL (biblioteci ARN grupate).
- 2 Transferați câte 10 µl din fiecare bibliotecă ARN (cADN) normalizată din placa NL în tubul PRL.
Nu grupați două biblioteci cu același primer de indexare.
- 3 Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa NL PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile.
- 4 Mixați tubul PRL în agitator vortex.
- 5 Centrifugați scurt tubul PRL.
- 6 Incubați tubul PRL 2 minute în bloc termic, la 96°C.
- 7 Păstrați PRL pe gheață 5 minute.
- 8 Mixați tubul PRL în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 9 Dați din nou tubul PRL la gheață.

Preparați a doua diluție

- 1 Etichetați un tub de microcentrifugare de 1,7 ml cu DIL1 (diluția 1).

- 2 Transferați 10 µl PRL în tubul DIL1 gol.
- 3 Eliminați tubul PRL.
- 4 Adăugați 190 µl HT1 prerăcit în tubul DIL1 (diluție 1:20).
- 5 Mixați DIL1 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

Preparare, a doua diluție

- 1 Etichetați un tub de microcentrifugare de 2,0 ml cu DIL2 (diluția 2).
- 2 Transferați 40 µl DIL1 în tubul DIL2 gol.
- 3 Eliminați tubul DIL1.
- 4 Adăugați 1646 µl HT1 prerăcit în tubul DIL2 (diluție 1:843).
- 5 Mixați în agitator vortex 20 pM dPhiX preparat și apoi centrifugați scurt.
- 6 Adăugați 16,7 µl 20 pM dPhiX preparat în tubul DIL2.
- 7 Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 8 Încărcați 1300 µl DIL2 în NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicluri) decongelat.
Pentru mai multe informații, consultați *Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000009513)*.
- 9 Eliminați tubul DIL2.
- 10 Centrifugați placa NL PCR 1 minut la 280 × g și depozitați-o la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 30 zile.
- 11 Treceți la secvențiere.
Pentru mai multe informații, consultați *Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000009513)*.

Brevete și mărci comerciale

Prezentul document și conținutul său constituie proprietatea Illumina, Inc. și a afiliațiilor săi (Illumina), fiind destinate exclusiv utilizării contractuale de către client, în legătură cu folosirea produsului sau produselor descrise în prezentul document, utilizarea lor în orice alt scop fiind interzisă. Se interzic utilizarea sau distribuirea prezentului document și a conținutului său în orice alt scop, precum și/sau comunicarea, dezvăluirea sau reproducerea acestuia fără acordul prealabil al Illumina. Illumina nu transferă prin prezentul document nicio licență patentată de Illumina, nicio marcă comercială, niciun drept de autor sau alte drepturi civile, precum și niciun alt drept al vreunui terț.

Este obligatorie respectarea cu strictețe și explicită a instrucțiunilor cuprinse în prezentul document de personal calificat și corespunzător instruit, pentru a asigura utilizarea corespunzătoare și în siguranță a produsului(lor) descrise în acesta. Sunt obligatorii citirea integrală și înțelegerea deplină a conținutului prezentului document înainte de utilizarea produsului(lor) respective.

NECITIREA INTEGRALĂ ȘI NEÎNȚELEGEREA DEPLINĂ A TUTUROR INSTRUCȚIUNILOR DIN PREZENTUL DOCUMENT POT DUCE LA DEFECTAREA PRODUSULUI(LOR), VĂTĂMAREA PERSOANELOR, INCLUSIV A UTILIZATORILOR ȘI A ALTORA, DETERIORAREA ALTOR BUNURI, DUCÂND, TOTODATĂ, LA ANULAREA ORICĂREI GARANȚII APLICABILE PRODUSULUI(LOR).

ILLUMINA ÎȘI DECLINĂ RĂSPUNDEREA PENTRU ORICE EVENIMENT REZULTAT DIN UTILIZAREA INADECVATĂ A PRODUSULUI(LOR) DESCRISE ÎN PREZENTUL DOCUMENT (INCLUSIV A PIESELOR ACESTORA SAU A SOFTWARE-ULUI AFERENT).

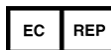
© 2022 Illumina, Inc. Toate drepturile rezervate.

Toate mărcile comerciale sunt proprietatea Illumina, Inc. sau a proprietarilor lor respectivi. Pentru informații specifice privind mărcile comerciale, consultați www.illumina.com/company/legal.html.

Informații de contact



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 S.U.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (în afara Americii de Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Țările de Jos

Etichetarea produsului

Pentru referințe complete la simbolurile care pot apărea pe ambalajele și etichetele produselor, consultați legenda simbolurilor pentru setul dvs. la adresa support.illumina.com.