

N° de lot de la trousse d'Illumina : _____ Opérateur : _____



Formulaire de suivi de laboratoire TruSightMC Oncology Comprehensive (EU)

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT

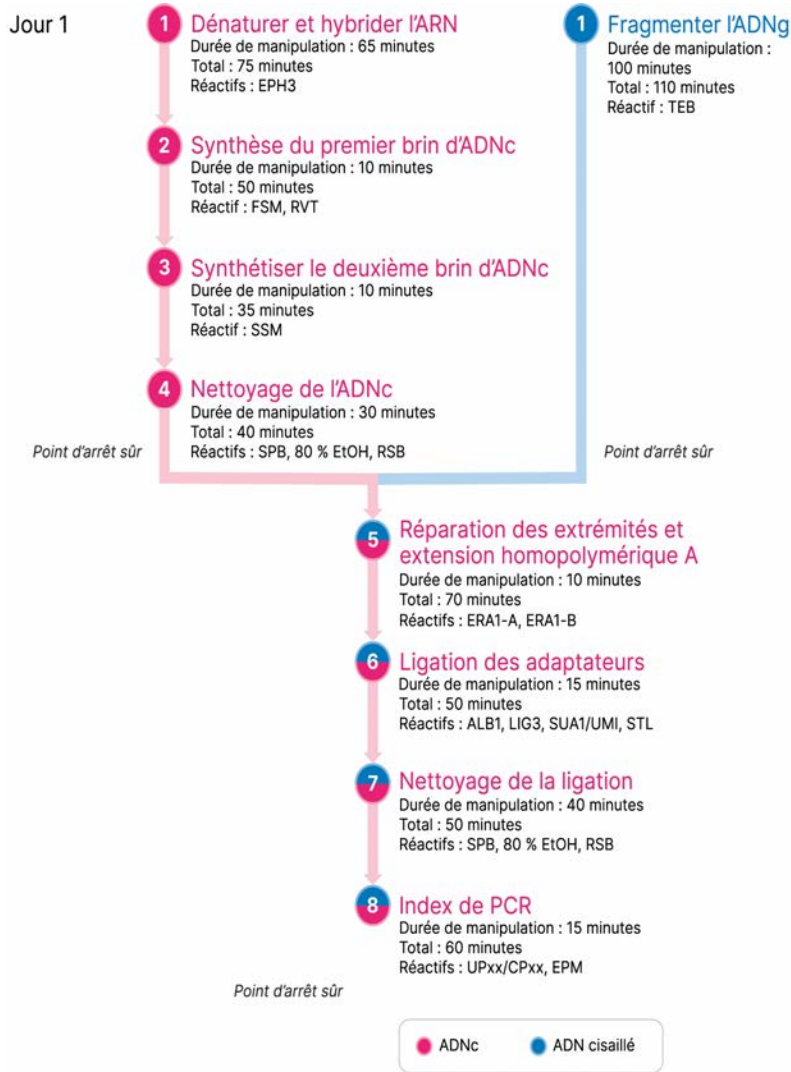
Mode d'emploi

La **Figure 1** et la **Figure 2** présentent un aperçu du flux de travail TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive).

Avant de lancer le protocole, consultez la section Avertissements et précautions de la *notice d'accompagnement de TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (document n° 200007789).

Flux de travail de préparation de bibliothèques

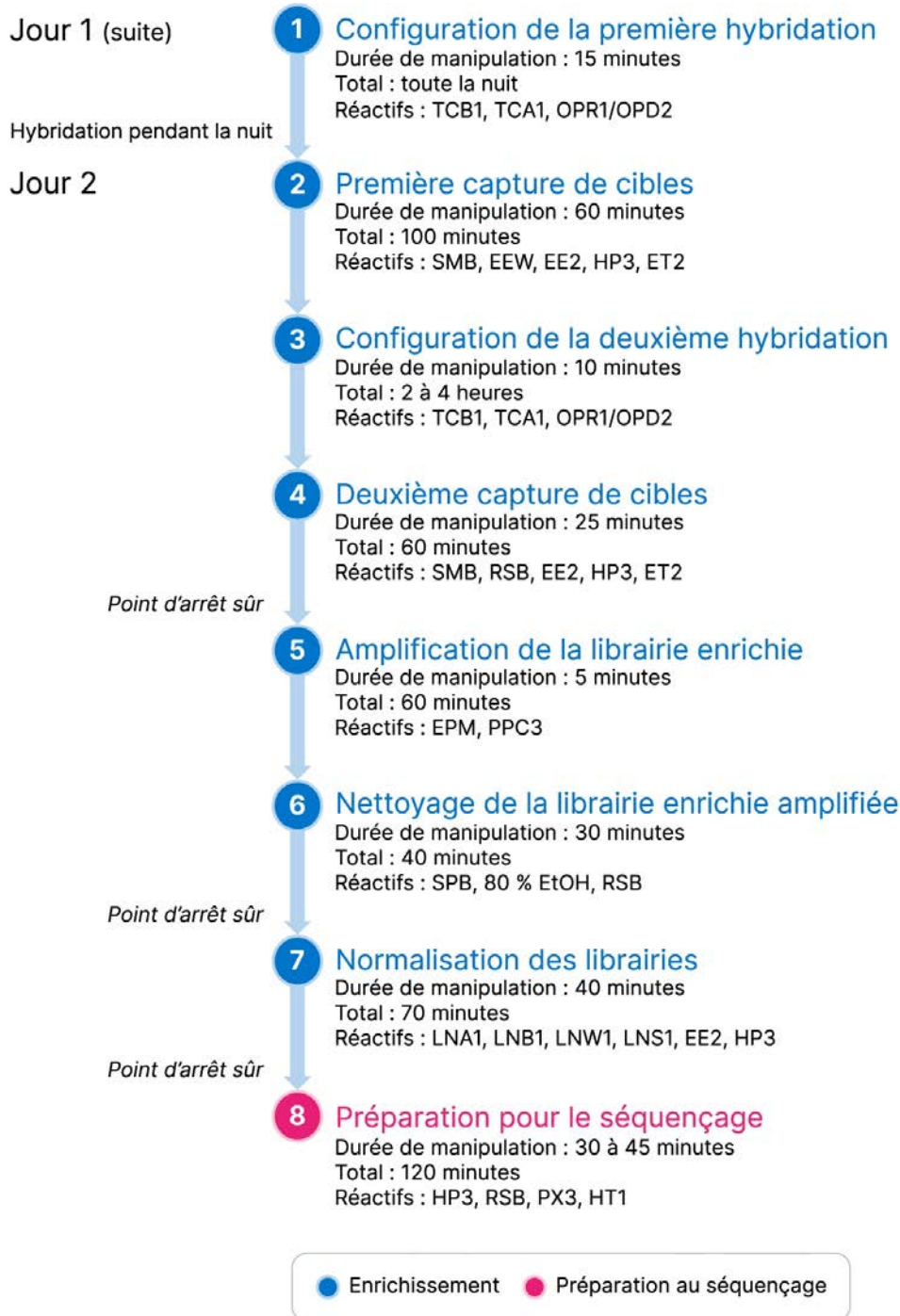
Figure 1 Flux de travail TSO Comprehensive (partie 1)



* Les durées de manipulation et totales sont une estimation.

Flux de travail d'enrichissement

Figure 2 Flux de travail TSO Comprehensive (partie 2)



Programmer les thermocycleurs

- 1 Avant de commencer le test, enregistrez les programmes suivants sur les thermocycleurs de pré- et postamplification.

Tableau 1 Programmes de pré-amplification des thermocycleurs

Étape procédurale	Nom du programme	Température du couvercle	Volume de réaction	Paramètres de thermocycleur
Dénaturer et fixer l'ARN par anelage	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C pendant 5 minutes • 4 °C pendant 1 minute • Maintenir à 4 °C
Synthèse du premier brin d'ADNc	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25 °C pendant 10 minutes • 42 °C pendant 15 minutes • 70 °C pendant 15 minutes • 4 °C pendant 1 minute • Maintenir à 4 °C
Synthèse du deuxième brin d'ADNc	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16 °C pendant 25 minutes • 4 °C pendant 1 minute • Maintenir à 4 °C

Si la température du couvercle pour le programme 2ndSS ne peut pas être réglée sur 30 °C, désactivez l'option de couvercle préchauffé.

Tableau 2 Programmes de postamplification des thermocycleurs

Étape procédurale	Nom du programme	Température du couvercle	Volume de réaction	Paramètres de thermocycleur
Index de PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C pendant 30 secondes • 15 cycles de : <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C pendant 10 secondes • 60 °C pendant 30 secondes • 72 °C pendant 30 secondes • 72 °C pendant 5 minutes • Maintenir à 10 °C
Effectuer la première hybridation	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C pendant 10 minutes • 85 °C pendant 2 minutes et 30 secondes • 75 °C pendant 2 minutes et 30 secondes • 65 °C pendant 2 minutes et 30 secondes • Maintenir à 57 °C entre 8 et 24 heures
Effectuer la deuxième hybridation	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C pendant 10 minutes • 85 °C pendant 2 minutes et 30 secondes • 75 °C pendant 2 minutes et 30 secondes • 65 °C pendant 2 minutes et 30 secondes • Maintenir à 57 °C entre 1,5 et 4 heures

Étape procédurale	Nom du programme	Température du couvercle	Volume de réaction	Paramètres de thermocycleur
Amplification de la librairie enrichie	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C pendant 30 secondes • 18 cycles de : <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C pendant 10 secondes • 60 °C pendant 30 secondes • 72 °C pendant 30 secondes • 72 °C pendant 5 minutes • Maintenir à 10 °C

Saisie des renseignements sur l'analyse

Local Run Manager de l'instrument NextSeq 550Dx est le logiciel utilisé pour configurer une analyse TSO Comprehensive. Pour de plus amples renseignements, consultez le *guide du flux de travail du module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200008661)*.

Saisissez les renseignements relatifs à l'analyse et à la configuration de l'échantillon directement dans le module d'analyse TruSight Oncology Comprehensive.

Définition des paramètres de l'analyse

- 1 Connectez-vous au Local Run Manager sur l'instrument ou depuis un ordinateur en réseau.
- 2 Sélectionnez **Create Run** (Créer l'analyse), puis sélectionnez **TSO Comp (EU)**.
- 3 Saisissez un nom d'analyse qui identifie l'analyse, du séquençage à l'analyse, avec les critères suivants.
 - ▶ 1 à 40 caractères.
 - ▶ Uniquement des caractères alphanumériques, des traits de soulignement ou des tirets.
 - ▶ Les traits de soulignement et les tirets doivent être précédés et suivis d'un caractère alphanumérique.
 - ▶ Unique pour toutes les analyses de l'instrument.
- 4 **[Facultatif]** Saisissez une description de l'analyse pour faciliter son identification à l'aide des critères suivants.
 - ▶ 1 à 150 caractères.
 - ▶ Uniquement des caractères alphanumériques ou des espaces.
 - ▶ Les espaces doivent être précédées et suivies d'un caractère alphanumérique.

Sélection des échantillons à analyser

Précisez les échantillons à analyser en utilisant l'une des options suivantes :

- ▶ **Saisie manuelle des échantillons** : utiliser le tableau vide à l'écran Create Run (Créer l'analyse).
- ▶ **Importer des échantillons** : naviguez vers un fichier dont les valeurs sont séparées par des virgules (*.csv) externe. Il est possible de télécharger un modèle sur l'écran Create Run (Créer l'analyse).



ATTENTION

Les inadéquations entre les échantillons et les primers d'index entraînent un rapport de résultats incorrect en raison de la perte de l'identification positive de l'échantillon. Saisissez les identifiants des échantillons et attribuez les index dans le Local Run Manager avant de commencer la préparation de la librairie. Enregistrez les identifiants des échantillons, les index et l'orientation des puits de la plaque pour vous y référer pendant la préparation de la librairie.



ATTENTION

Pour éviter de perdre des données, assurez-vous que la KB n'est pas en cours d'installation avant d'enregistrer une analyse.

Saisie manuelle des échantillons

- 1 Saisissez un identifiant d'échantillon unique dans le champ Sample ID (Identifiant d'échantillon) avec les critères suivants. **Il faut d'abord ajouter tous les échantillons de contrôle.** Consultez la section *Échantillons de contrôle à la page 7* pour de plus amples renseignements.
 - ▶ 1 à 25 caractères.
 - ▶ Uniquement des caractères alphanumériques, des traits de soulignement ou des tirets.
 - ▶ Les traits de soulignement et les tirets doivent être précédés et suivis d'un caractère alphanumérique.
- 2 **[Facultatif]** Saisissez la description de l'échantillon dans le champ Sample Description (Description de l'échantillon) avec les critères suivants.
 - ▶ 1 à 50 caractères.
 - ▶ Uniquement des caractères alphanumériques, des tirets, des traits de soulignement ou des espaces.
 - ▶ Les espaces, les traits de soulignement et les tirets doivent être précédés et suivis d'un caractère alphanumérique.
- 3 Sélectionnez un index pour la librairie d'ADN ou la librairie d'ARN préparée à partir de l'échantillon. Assurez-vous que les échantillons d'ARN et d'ADN figurent dans des colonnes distinctes. Le champ DNA i7+i5 Sequence (Séquence ADN i7+i5) se renseigne automatiquement après avoir sélectionné un ID d'index d'ADN. Le champ RNA i7+i5 Sequence (Séquence ARN i7+i5) se renseigne automatiquement après la sélection d'un ID d'index ARN. Outre le résumé présenté ici, reportez-vous à la *notice d'accompagnement de TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200007789)* pour la sélection d'ID d'index.
 - ▶ Pour une librairie d'échantillons d'ADN, sélectionnez un ID d'index unique (index UPxx ou CPxx) dans la liste déroulante DNA Index ID (ID d'index d'ADN).
 - ▶ Pour une librairie d'échantillons d'ARN, sélectionnez un ID d'index unique (UPxx uniquement) dans la liste déroulante RNA index ID (ID d'index ARN).
 - ▶ S'il y a trois librairies au total dans l'analyse, suivez les directives de sélection d'index se trouvant dans la *notice d'accompagnement de TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200007789)*.
- 4 Utilisez le champ Tumor Type (Type de tumeur) pour attribuer un type de tumeur à chaque échantillon, en sélectionnant le type de tumeur le plus spécifique disponible. Consultez la section *Sélectionnez un type de tumeur à la page 7*.
- 5 Utilisez le champ Tumor Type (Type de tumeur) pour affecter l'un des types de contrôle suivants à chaque contrôle. Consultez la section *Échantillons de contrôle à la page 7*.
 - Contrôle externe d'ADN
 - Contrôle externe d'ARN
 - Contrôle sans modèle d'ADN
 - Contrôle sans modèle d'ARN

Si vous utilisez le contrôle d'ADN préfixe de consommable, le type de contrôle sera le contrôle externe d'ADN. Si vous utilisez le contrôle d'ARN préfixe de consommable, le type de contrôle sera le contrôle externe d'ARN.
- 6 Attribuez le sexe.
- 7 **[Facultatif]** Sélectionnez **Export to CSV** (Exporter au format CSV) pour exporter les renseignements de l'échantillon vers un fichier externe.
- 8 Sur l'écran Create Run (Créer l'analyse), révisez les renseignements. Des renseignements erronés peuvent nuire aux résultats.
- 9 Sélectionnez **Save Run** (Enregistrer l'analyse).

Importation des échantillons

- 1 Sélectionnez **Import CSV** (Importer CSV) et accédez à l'emplacement du fichier de renseignements sur les échantillons. Il est possible d'importer deux types de fichiers.

- Sélectionnez **Download CSV** (Télécharger CSV) sur l'écran Create Run (Créer l'analyse) afin de télécharger un nouveau modèle de renseignements sur les échantillons. Le fichier CSV contient les en-têtes de colonne et le format requis pour l'importation. Saisissez les renseignements des échantillons de l'analyse dans chaque colonne. Dans la colonne Tumor Type (Type de tumeur), saisissez le terme de type de tumeur ou le code associé (consultez [Téléchargement des types de tumeurs à la page 1](#)). Le champ Tumor Type (Type de tumeur) est également utilisé pour désigner les échantillons comme contrôles (consultez [Échantillons de contrôle à la page 7](#)).
 - Utilisez un fichier de renseignements sur les échantillons qui a été exporté du module d'analyse TSO Comprehensive à l'aide de la fonction Export to CSV (Exporter au format CSV).
- 2 Sur l'écran Create Run (Créer l'analyse), révisez les renseignements importés.
Des renseignements erronés peuvent nuire aux résultats.
- 3 **[Facultatif]** Sélectionnez **Export to CSV** (Exporter au format CSV) pour exporter les renseignements de l'échantillon vers un fichier externe.
- 4 Sélectionnez **Save Run** (Enregistrer l'analyse).

Échantillons de contrôle

TSO Comprehensive requiert l'utilisation du contrôle de panel. La désignation d'un échantillon comme contrôle règle automatiquement le sexe de l'échantillon sur Inconnu. Pour désigner un échantillon comme contrôle, sélectionnez l'un des quatre types de contrôle dans le champ Tumor Type (Type de tumeur) : Contrôle externe d'ADN (contrôle positif d'ADN), Contrôle sans modèle d'ADN, Contrôle externe d'ARN (contrôle positif d'ARN) ou Contrôle sans modèle d'ARN. Consultez la section [Sélectionnez un type de tumeur à la page 7](#) pour obtenir de plus amples renseignements sur l'établissement des types de tumeurs pour tous les types d'échantillons lors de la configuration de l'analyse.

Un seul de chaque type de contrôle peut être spécifié dans une analyse. Seule une librairie d'ADN peut être spécifiée pour un contrôle externe d'ADN ou un contrôle sans modèle d'ADN. Seule une librairie d'ARN peut être spécifiée pour un contrôle externe d'ARN ou un contrôle sans modèle d'ARN. Les bibliothèques désignées comme des contrôles sans modèle d'ADN ou d'ARN ne sont pas comptabilisées dans le nombre maximal de bibliothèques d'une analyse.

Sélectionnez un type de tumeur

Un type de tumeur doit être spécifié pour chaque échantillon. À l'exception des types de contrôle, les types de tumeurs disponibles sont dérivés de la base de connaissances (KB) installée et pourraient changer avec les versions mises à jour de la KB.

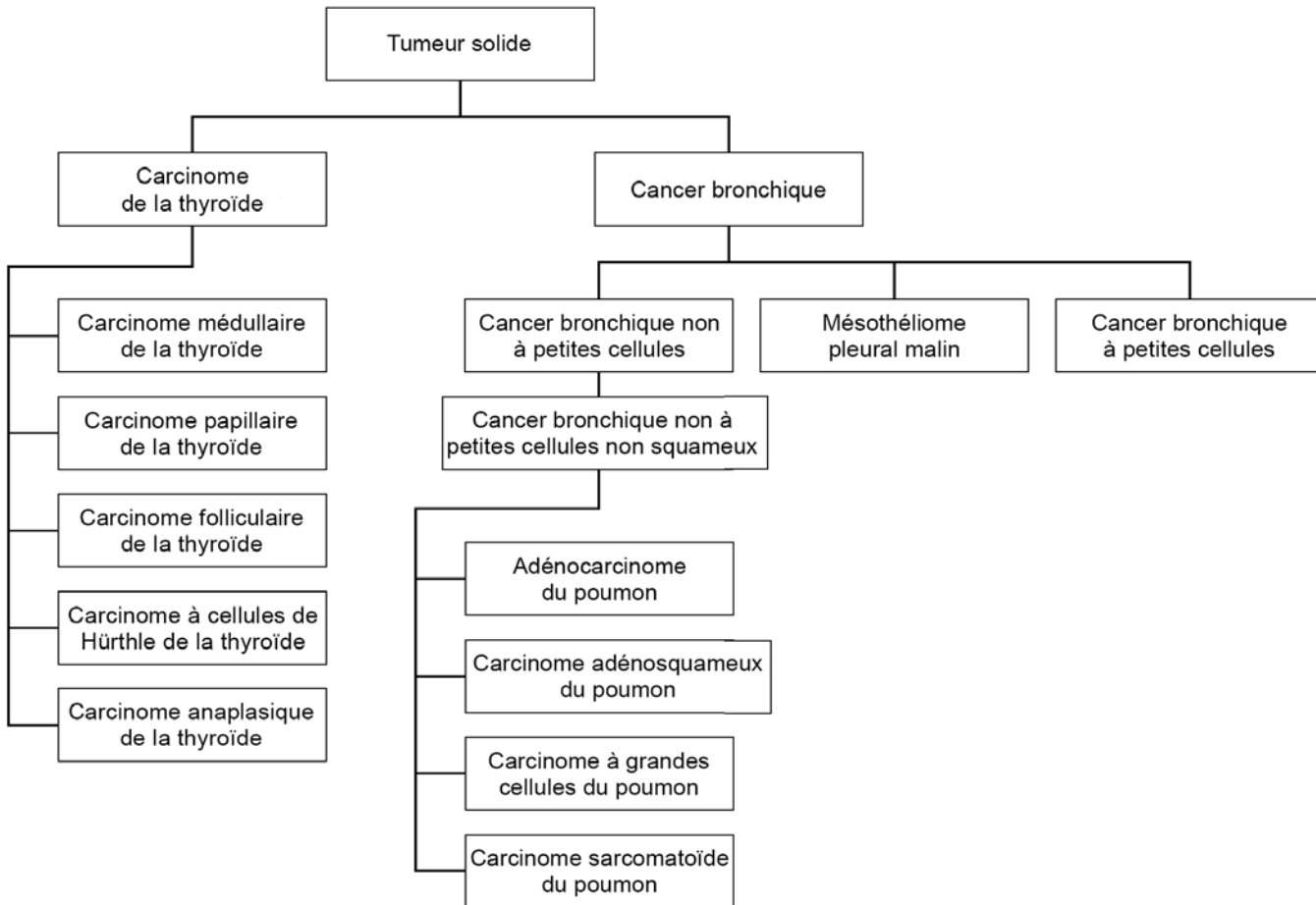


ATTENTION

Une sélection incorrecte du type de tumeur peut entraîner des résultats incorrects. Résolvez tous les avertissements qui apparaissent lors de la spécification des types de tumeurs pour éviter l'échec de l'analyse.

Les termes de type de tumeur font partie d'une ontologie de maladie hiérarchique dans la KB, qui est construite comme un ensemble de relations parent-enfant. Par exemple, le terme cancer bronchique non à petites cellules découle du cancer du poumon puisque le cancer bronchique non à petites cellules est un type de cancer du poumon. La [Figure 3](#) illustre un sous-ensemble d'un exemple d'ontologie de maladie, montrant une tumeur solide comme terme racine, et les termes associés au cancer du poumon et au cancer de la thyroïde (les autres types de tumeurs ne sont pas représentés). Un terme qui est relié par des relations parent-enfant à des termes de niveau inférieur est appelé un ancêtre. Les termes de niveau inférieur connectés sont les descendants du terme ancêtre. Par exemple, le cancer du poumon est l'ancêtre de l'adénocarcinome du poumon et du cancer du poumon à petites cellules, et le carcinome médullaire de la thyroïde est le descendant du carcinome de la thyroïde et de la tumeur solide.

Figure 3 Sous-ensemble d'un exemple d'ontologie de maladie



Le type de tumeur sélectionné pour un échantillon de patient a une incidence sur :

- ▶ Les utilisations prévues du diagnostic d'accompagnement qui sont évaluées pour l'échantillon. Seuls les échantillons de patients dont le type de tumeur est une correspondance exacte ou un descendant du type de tumeur pour une utilisation prévue pour un diagnostic d'accompagnement seront évalués pour cette demande.
- ▶ Les variants de profilage de tumeur sont inclus dans le rapport TSO Comprehensive.

Les instructions suivantes décrivent le processus de sélection d'un type de tumeur via l'écran Create Run (Créer l'analyse). Le type de tumeur peut également être défini en important un fichier CSV contenant un type de tumeur (consultez [Importation des échantillons à la page 6](#)).

- 1 Affichez les types de tumeurs disponibles en double-cliquant dans la cellule Tumor Type (Type de tumeur) de la ligne correspondant à l'échantillon. Les types de tumeurs disponibles sont affichés dans une liste hiérarchique organisée par ordre alphabétique.
Le champ Tumor Type (Type de tumeur) est également utilisé pour désigner un type de contrôle pour les échantillons de contrôle (consultez la section [Échantillons de contrôle à la page 7](#)).
- 2 Localisez et sélectionnez le type de tumeur souhaité en interagissant avec la liste ou en utilisant la barre de recherche en haut de la fenêtre Tumor Type (Type de tumeur).

Préparation pour les étapes du protocole

- 1 Décontaminez minutieusement les espaces de travail avec un nettoyant inhibiteur de RNase/DNase.

**ATTENTION**

Toutes les procédures du flux de travail nécessitent un environnement exempt de RNase/DNase.

- 2 Configurez les programmes de pré-amplification des thermocycleurs. Consultez la section *Programmer les thermocycleurs à la page 4*.
- 3 Suivez les instructions du fabricant pour configurer le sonicateur à ultrasons.
- 4 Si vous traitez uniquement des échantillons d'ADN, passez directement à la section *Fragment d'ADNg à la page 13*.
- 5 Retirez les contrôles d'ARN de leur lieu de stockage.
- 6 Retirez les tubes de réactif de la boîte et suivez les instructions de décongélation.

Tableau 3 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (réf. 20031127)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
EPH3	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Dénaturer et fixer l'ARN par anelage
FSM	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Synthèse du premier brin d'ADNc
RVT	De -25 à -15 °C	Conserver sur de la glace.	Synthèse du premier brin d'ADNc
SSM	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Synthèse du deuxième brin d'ADNc

Tableau 4 TruSight Oncology Comp Library Prep (réfrigéré) (réf. 20031119)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
SPB (étiquette vert clair)	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Nettoyage de l'ADNc
RSB	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Nettoyage de l'ADNc

Dénaturer et fixer l'ARN par anelage

Préparation

- 1 Préparez les réactifs suivants.
 - ▶ EPH3 : réservez.
 - ▶ FSM : agitez pour mélanger. Centrifugez brièvement, puis pipettez pour mélanger. Vérifiez la présence de précipités. En cas de présence de précipités, pipettez pour mélanger jusqu'à ce qu'ils se dissolvent.
 - ▶ RVT : centrifugez brièvement, puis pipettez pour mélanger. Conservez sur de la glace.

REMARQUE Le RVT est une solution visqueuse. Veillez toujours à pipetter lentement pour éviter de créer des bulles.

- 2 Dans un tube microcentrifuge, combinez les volumes suivants pour préparer le mélange maître FSM+RVT.

Tableau 5 Mélange maître FSM+RVT

Composant du mélange maître	3 échantillons d'ARN (µl)	8 échantillons d'ARN (µl)	16 échantillons d'ARN (µl)	24 échantillons d'ARN (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

Ce tableau comprend les excédents de volume. Reportez-vous à la section Manipulation des réactifs de la *notice d'accompagnement TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200007789)* pour les calculs.

- 3 Pipettez pour mélanger dix fois.
- 4 Mettez le mélange maître FSM+RVT sur de la glace jusqu'à l'étape *Synthèse du premier brin d'ADNc à la page 10*.

Procédure

- 1 Décongelez les échantillons d'ARN et les contrôles d'ARN sur de la glace.
Traitez les contrôles d'ARN comme les échantillons pour le restant du protocole.
Reportez-vous à la *notice d'accompagnement de TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (document n° 200007789) pour quantifier les échantillons.
- 2 Pipettez chaque échantillon d'ARN 10 fois pour mélanger.
- 3 Utilisez de l'eau sans RNase/DNase pour préparer 40 ng de chaque échantillon d'ARN dans un volume final de 8,5 µl (4,7 ng/µl).
Pour les contrôles d'ARN, utilisez la concentration indiquée sur l'étiquette du tube.
- 4 Étiquetez une nouvelle plaque MIDI à 96 puits CF (cDNA Fragments, fragments d'ADNc).
- 5 Ajoutez 8,5 µl de chaque échantillon d'ARN à un puits unique de la plaque CF PCR.
- 6 Assurez-vous que la disposition des plaques d'échantillon et les index pour chaque échantillon correspondent à l'analyse planifiée dans Local Run Manager lors de la configuration de l'analyse.
- 7 Agitez l'EPH3 pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 8 Ajoutez 8,5 µl d'EPH3 à chaque puits d'échantillon.
- 9 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque CF PCR.



ATTENTION

Assurez-vous de sceller complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.

- 10 Agitez à 1 200 tr/min pendant 1 minute.
- 11 Centrifugez à 280 x g durant une minute.
- 12 Placez sur le thermocycleur et exécutez le programme LQ-RNA.
Consultez la section *Programmer les thermocycleurs à la page 4*.
- 13 Lorsque les échantillons atteignent 4 °C, maintenez cette température pendant une minute, puis passez à l'étape suivante.

Synthèse du premier brin d'ADNc

Procédure

Date et heure de début _____

- 1 Retirez la plaque CF PCR du thermocycleur.
- 2 Pipettez 5 fois pour mélanger le mélange maître FSM+RVT.
- 3 Ajoutez 8 µl de mélange maître FSM+RVT dans chaque puits d'échantillon.
- 4 Pipettez pour mélanger 5 fois.
- 5 Jetez le mélange maître FSM+RVT restant.
- 6 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque CF PCR.
Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.
- 7 Agitez à 1 200 tr/min pendant 1 minute.
- 8 Centrifugez à 280 x g durant une minute.
- 9 Placez sur un thermocycleur et exécutez le programme 1stSS.
Consultez la section *Programmer les thermocycleurs à la page 4*.
- 10 Lorsque les échantillons atteignent 4 °C, passez immédiatement à l'étape suivante.
Les échantillons de premier brin peuvent être maintenus à 4 °C jusqu'à 5 minutes.

Synthèse du deuxième brin d'ADNc

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préparez le réactif suivant.

- ▶ SSM : retournez 10 fois pour mélanger. Centrifugez brièvement.

Procédure

- 1 Retirez la plaque CF PCR du thermocycleur.
- 2 Ajoutez 25 µl de SSM à chaque puits d'échantillon.
- 3 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque CF PCR.
Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.
- 4 Agitez à 1 200 tr/min pendant 1 minute.
- 5 Centrifugez à 280 x g durant une minute.
- 6 Placez sur un thermocycleur et exécutez le programme 2ndSS.
Consultez la section *Programmer les thermocycleurs à la page 4*.
- 7 Lorsque les échantillons atteignent 4 °C, maintenez cette température pendant une minute, puis passez à l'étape suivante.

Nettoyage de l'ADNc

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préparez les réactifs suivants.
 - ▶ SPB : assurez-vous que les billes sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes.
 - ▶ RSB : réservez pour l'utilisation dans la procédure.
- 2 Préparez une nouvelle solution d'alcool éthylique à 80 % dans un tube conique de 15 ou 50 ml.

Réactif	3 échantillons	8 échantillons	16 échantillons	24 échantillons
Alcool à l'éthanol à 100 %, pur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Eau sans DNase ni RNase	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Agitez la nouvelle solution d'éthanol à 80 % pour mélanger.
- 4 Étiquetez une nouvelle plaque MIDI à 96 puits BIND1 (liaison d'ADNc).
- 5 Couvrez et mettez de côté.
- 6 Disposez l'aimant.

Procédure

Liaison

- 1 Retirez la plaque CF PCR du thermocycleur.
- 2 Agitez le SPB pendant une minute pour remettre les billes en suspension.
- 3 Ajoutez immédiatement 90 µl de SBP à chaque puits d'échantillon de la plaque BIND1 MIDI.
Si vous utilisez une cuve pour distribuer le SPB, incluez un facteur d'excédent de 1,05 lorsque vous aliquotez suffisamment de matériel par échantillon. Jetez le matériel restant une fois que le SPB a été ajouté dans chacun des puits d'échantillon.
- 4 Transférez le volume total (environ 50 µl) de chaque échantillon de la plaque CF PCR aux puits correspondants de la plaque BIND1 MIDI.
- 5 Jetez la plaque CF PCR vide.
- 6 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque BIND1 MIDI.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 7 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 8 Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
- 9 Placez la plaque BIND1 MIDI sur le support magnétique pendant 5 minutes.

- 10 Utilisez une pipette P200 réglée sur 200 µl pour retirer et jeter le surnageant de chaque puits d'échantillon sans déranger le culot de bille.

Lavage

- 1 Lavez les billes comme suit.
 - a Conservez sur le support magnétique et ajoutez 200 µl de nouvelle solution à l'éthanol à 80 % à chaque puits.
 - b Attendez 30 secondes.
 - c Retirez le surnageant de chaque puits et jetez-le.
- 2 Lavez les billes une **deuxième** fois.
- 3 Éliminez les résidus d'éthanol de chaque puits. Utilisez une pipette p20 avec des pointes fines.
- 4 Jetez l'alcool éthylique à 80 % inutilisé.

Élution

- 1 Retirez la plaque BIND1 MIDI du support magnétique.
- 2 Retournez ou agitez le RSB pour mélanger.
- 3 Ajoutez 22 µl de RSB à chaque puits d'échantillon.
- 4 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque BIND1 MIDI. Scellez complètement les bords et les puits.
- 5 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 6 Incubez à température ambiante pendant 2 minutes.
- 7 Placez sur un support magnétique pendant 2 minutes.
- 8 Étiquetez une nouvelle plaque MIDI à 96 puits PCF (Purified cDNA Fragments, fragments d'ADNc purifiés). Si vous arrêtez au **POINT D'ARRÊT SÛR** à la page 12, utilisez une plaque PCR.
- 9 Transférez 20 µl d'éluat de chaque puits d'échantillon de la plaque BIND1 MIDI aux puits correspondants de la plaque PCF.
- 10 Jetez la plaque BIND1 MIDI vide.
- 11 Ajoutez 30 µl de RSB à chaque puits d'échantillon de la plaque PCF.
- 12 Pipettez pour mélanger 10 fois.
- 13 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque PCF et conservez sur de la glace.
- 14 Entreposez de nouveau l'EPH3, le FSM, le RVT et le SSM.
- 15 Si vous traitez des échantillons dérivés uniquement d'ARN (ADNc) et que vous continuez au-delà du point d'arrêt sûr, passez à la section **Réparation des extrémités et extension homopolymérique A** à la page 15.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, centrifugez la plaque PCF PCR à 280 x g pendant une minute, puis conservez-la entre -25 et -15 °C jusqu'à 7 jours.

Date et heure de fin _____

Préparation pour les étapes du protocole

- 1 Retirez les contrôles d'ADN de leur lieu de stockage.
- 2 Retirez le tube de réactif de la boîte et suivez les instructions de décongélation.

Tableau 6 TruSight Oncology Comp Library Prep (réfrigéré) (réf. 20031119)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
TEB	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Fragment d'ADNg

Fragment d'ADNg

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Assurez-vous de suivre les recommandations de la *notice d'accompagnement de TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200007789)* pour quantifier les échantillons.
- 2 Préparez le réactif suivant.
 - ▶ **TEB** : retournez ou agitez pour mélanger.

Procédure

Préparation de la plaque des réactifs

- 1 **Sélectionnez l'une des trois options suivantes pour préparer la plaque.**
 - ▶ **Option n° 1** : traiter les échantillons d'ADNg et d'ADNc simultanément dans la plaque PCF MIDI.
 - a Étiquetez la plaque PCF MIDI avec la mention LP (Library Preparation, préparation de librairie).
 - b Placez sur de la glace et réservez pour une utilisation selon la section *Transfert d'ADN fragmenté à la page 14*.
 - ▶ **Option n° 2** : traiter les échantillons d'ADNg et d'ADNc simultanément dans la plaque PCF PCR congelée.
 - a Décongelez la plaque PCF PCR à température ambiante.
 - b Centrifugez à 280 x g durant une minute.
 - c Pipettez pour mélanger 10 fois.
 - d Étiquetez une nouvelle plaque MIDI à 96 puits avec la mention LP (Library Preparation, préparation de librairie).
 - e Transférez la totalité des 50 µl de chaque échantillon de la plaque PCF PCR aux puits correspondants de la plaque LP MIDI.
 - f Jetez la plaque PCF PCR.
 - g Appliquez le scellé adhésif de plaque et placez sur de la glace jusqu'à la section *Transfert d'ADN fragmenté à la page 14*.
 - ▶ **Option n° 3** : traiter uniquement les échantillons d'ADNg.
 - a Étiquetez une nouvelle plaque MIDI à 96 puits avec la mention LP (Library Preparation, préparation de librairie).
 - b Si vous arrêtez au *POINT D'ARRÊT SÛR à la page 14*, utilisez une plaque PCR.
 - c Couvrez et réservez pour une utilisation selon la section *Transfert d'ADN fragmenté à la page 14*.

Dilution de l'ADNg

- 1 Décongelez les échantillons d'ADNg et les contrôles ADN jusqu'à ce qu'ils soient à température ambiante. Traitez les contrôles ADN comme des échantillons pour le restant du protocole.
- 2 Pipettez chaque échantillon d'ADNg 10 fois pour mélanger.
- 3 Passez brièvement le tube à la centrifugeuse pour recueillir les gouttelettes.
- 4 Retournez ou agitez le TEB pour mélanger.
- 5 Utilisez le TEB pour préparer 40 ng de chaque échantillon d'ADNg dans un volume final de 52 µl (0,77 ng/µl). Le test nécessite une concentration d'extraction minimale de 3,33 ng/µl pour obtenir au moins 40 µl de TEB pour un volume de 52 µl. Pour les contrôles d'ADN, utilisez la concentration indiquée sur l'étiquette du tube. Pour éviter la perte d'échantillon, ne pas pipetter moins de 2 µl d'échantillon dans cette dilution.

Fragment

- 1 Ajoutez 52 µl de chaque échantillon d'ADNg dans un puits séparé du tube du sonicateur à ultrasons.

- 2 Enregistrez l'orientation de la barrette.
- 3 Fragmentez l'ADNg en fragments avec un sonicateur à ultrasons.

Transfert d'ADN fragmenté

- 1 Assurez-vous que la disposition des plaques d'échantillon et les index pour chaque échantillon correspondent à l'analyse planifiée dans Local Run Manager lors de la configuration de l'analyse.
- 2 Suivez les instructions du fabricant du sonicateur à ultrasons pour récupérer l'échantillon.
Pour certains types de tubes de sonicateur à ultrasons, la centrifugation peut être nécessaire pour consolider l'échantillon dans le tube.
- 3 Pour chaque échantillon d'ADNg fragmenté, utilisez une pipette p20 avec des pointes fines pour effectuer trois transferts de 16,7 µl dans un puits vide de la plaque LP MIDI.
- 4 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque LP MIDI.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, appliquez le scellé adhésif à la plaque LP PCR et centrifugez à 280 × g pendant une minute. Entreposez entre -25 et -15 °C jusqu'à 7 jours.

Date et heure de fin _____

Préparation pour les étapes du protocole

- 1 Préparez un seau de glace.
- 2 Retirez le tube de réactif de la boîte et suivez les instructions de décongélation.

Tableau 7 Boîte TruSight Oncology Comp Library Prep (congelé) (réf. 20031118)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
ERA1-A	De -25 à -15 °C	Conserver sur de la glace.	Réparation des extrémités et extension homopolymérique A
ERA1-B	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Réparation des extrémités et extension homopolymérique A
ALB1	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Ligation des adaptateurs
LIG3	De -25 à -15 °C	Conserver sur de la glace.	Ligation des adaptateurs
SUA1 (bouchon bleu)	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Ligation des adaptateurs
UMI (bouchon blanc)	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Ligation des adaptateurs
STL	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Ligation des adaptateurs
EPM	De -25 à -15 °C	Conserver sur de la glace.	Index de PCR

Tableau 8 Boîte TruSight Oncology Comp Library Prep (réfrigéré) (réf. 20031119)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
SPB (étiquette vert clair)	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Nettoyage de la ligation
RSB	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Nettoyage de la ligation

Tableau 9 Boîte TruSight Oncology Comp UP Index Primers (réf. 20031120)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
UPxx	De -25 à -15 °C	Décongeler les tubes de primers d'index appropriés à température ambiante.	Index de PCR

Tableau 10 Boîte TruSight Oncology Comp CP Index Primers (réf. 20031126)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
CPxx	De -25 à -15 °C	Décongeler les tubes de primers d'index appropriés à température ambiante.	Index de PCR

Réparation des extrémités et extension homopolymérique A

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préchauffez deux incubateurs de microéchantillons avec des inserts de bloc chauffant MIDI comme suit.
 - ▶ Préchauffez un incubateur de microéchantillons à 30 °C.
 - ▶ Préchauffer un incubateur de microéchantillons à 72 °C.
- 2 Préparez les réactifs suivants.
 - ▶ ERA1-A : centrifugez brièvement, puis pipettez pour mélanger. Conservez sur de la glace.
 - ▶ ERA1-B : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement. Vérifiez la présence de précipités. En cas de présence de précipités, chauffez le tube à 37 °C, puis pipettez pour mélanger jusqu'à ce qu'ils se dissolvent.
- 3 Préparez le mélange maître ERA1 dans un tube microcentrifuge.

Tableau 11 Mélange maître ERA1

Composant du mélange maître	3 librairies	8 librairies	16 librairies	24 librairies	48 librairies
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

Ce tableau comprend les excédents de volume. Reportez-vous à la section Manipulation des réactifs de la *notice d'accompagnement TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (document n° 200007789) pour les calculs.

- 4 Pipettez lentement 10 fois pour mélanger, centrifugez brièvement, puis placez le mélange maître ERA1 sur de la glace.
- 5 Sélectionnez, parmi les deux options suivantes, la plus adéquate pour préparer la plaque.
 - ▶ **Option n° 1** : si les échantillons sont dans une plaque MIDI.
 - a Réétiquetez la plaque MIDI avec la mention LP2 (Library Preparation 2, préparation de librairie 2). Si certains échantillons se trouvent dans des plaques MIDI distinctes, déplacez tous les échantillons dans des puits séparés de la même plaque MIDI conformément à la disposition de la plaque.
 - ▶ **Option n° 2** : si la plaque est congelée.
 - a Décongelez la plaque PCF PCR ou LP PCR à température ambiante.
 - b Centrifugez la plaque à 280 x g durant une minute.
 - c Pipettez pour mélanger 10 fois.
 - d Étiquetez une nouvelle plaque MIDI à 96 puits avec la mention LP2 (Library Preparation 2, préparation de librairie 2).
 - e Transférez la totalité des 50 µl de chaque échantillon de la plaque PCF PCR ou de la plaque LP PCR aux puits correspondants de la plaque LP2 MIDI.
 - f Jetez la plaque PCF PCR ou LP PCR.

Procédure

- 1 Ajoutez 10 µl de mélange maître ERA1 à chaque puits d'échantillon dans la plaque LP2 MIDI.
- 2 Jetez le mélange maître ERA1 restant.
- 3 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque LP2 MIDI.

Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.

- 4 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 5 Incubez dans l'incubateur de microéchantillons préchauffé à 30 °C pendant 30 minutes.
- 6 Transférez immédiatement dans un deuxième incubateur de microéchantillons préchauffé, et incubez à 72 °C pendant 20 minutes.
- 7 Placez la plaque LP2 MIDI sur de la glace pendant 5 minutes.

Ligation des adaptateurs

Ce processus lie des adaptateurs aux extrémités des fragments d'ADNc et/ou d'ADNg.

Le test TSO Comprehensive inclut des adaptateurs SUA1 et UMI.

- ▶ Utilisez les adaptateurs SUA1 avec les échantillons d'ARN.
- ▶ Utilisez les adaptateurs UMI avec les échantillons d'ADN.

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préparez les réactifs suivants.
 - ▶ ALB1 : agitez pour mélanger pendant 10 secondes, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ LIG3 : centrifugez brièvement, puis pipettez pour mélanger. Conservez sur de la glace.
 - ▶ SUA1 : agitez pour mélanger pendant 10 secondes, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ UMI : agitez pour mélanger pendant 10 secondes, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ STL : réservez pour l'utilisation dans la procédure.

Procédure

- 1 Retirez la plaque LP2 MIDI de la glace.
- 2 Ajoutez 60 µl d'ALB1 à chaque puits d'échantillon de la plaque LP2 MIDI, en veillant à pipetter lentement.
- 3 Ajoutez 5 µl de LIG3 à chaque puits d'échantillon.
- 4 Ajoutez les adaptateurs.

Ne combinez **pas** différents types d'adaptateurs.

 - **Puits d'échantillons d'ARN** : 10 µl de SUA1 (bouchon bleu) à chaque échantillon dérivé d'ARN.
 - **Puits d'échantillons d'ADN** : 10 µl d'UMI (bouchon blanc) à chaque échantillon dérivé d'ADN.
- 5 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque LP2 MIDI.

Scellez complètement les bords et les puits.
- 6 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 7 Incubez à température ambiante pendant 30 minutes.
- 8 Agitez le STL pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 9 Ajoutez 5 µl de STL à chaque puits d'échantillon de la plaque LP2 MIDI.
- 10 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque LP2 MIDI.

Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.
- 11 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.

Nettoyage de la ligation

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préparez les réactifs suivants.
 - ▶ SPB : assurez-vous que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes.
 - ▶ RSB : réservez pour l'utilisation dans la procédure.
- 2 Préparez une nouvelle solution d'alcool éthylique à 80 % dans un tube conique de 15 ou 50 ml.

Réactif	3 librairies	8 librairies	16 librairies	24 librairies	48 librairies
Alcool à l'éthanol à 100 %, pur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Eau sans DNase ni RNase	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Agitez la nouvelle solution d'éthanol à 80 % pour mélanger.
- 4 Disposez l'aimant.

Procédure

Liaison

- 1 Agitez le SPB pendant une minute pour remettre les billes en suspension.
- 2 Ajoutez immédiatement 112 µl de SBP à chaque puits d'échantillon de la plaque LP2 MIDI.
Si vous utilisez une cuve pour distribuer le SPB, incluez un facteur d'excédent de 1,05 lorsque vous aliquotez suffisamment de matériel par échantillon. Jetez le matériel restant une fois que le SPB a été ajouté dans chacun des puits d'échantillon.
- 3 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque LP2 MIDI.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 4 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 5 Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
- 6 Placez la plaque LP2 MIDI sur le support magnétique pendant 10 minutes.
- 7 Utilisez une pipette p200 réglée sur 200 µl pour retirer et jeter le surnageant de chaque puits d'échantillon sans déranger le culot de bille.

Lavage

- 1 Lavez les billes comme suit.
 - a Conservez sur le support magnétique et ajoutez 200 µl de nouvelle solution à l'éthanol à 80 % à chaque puits d'échantillon.
 - b Attendez 30 secondes.
 - c Retirez et jetez le surnageant de chaque puits sans déranger le culot de billes.
- 2 Lavez les billes une **deuxième** fois.
- 3 Éliminez les résidus d'éthanol de chaque puits.
Utilisez une pipette p20 avec des pointes fines.
- 4 Jetez l'alcool éthylique à 80 % inutilisé.

Élution

- 1 Retirez la plaque LP2 MIDI du support magnétique.
- 2 Retournez ou agitez le RSB pour mélanger.
- 3 Ajoutez 27,5 µl de RSB à chaque puits d'échantillon.
- 4 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque LP2 MIDI.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 5 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 6 Incubez à température ambiante pendant 2 minutes.
- 7 Placez sur un support magnétique pendant 2 minutes.
- 8 Étiquetez une nouvelle plaque PCR à 96 puits avec la mention LS (Library Samples, échantillons de librairies).
- 9 Transférez 25 µl de chaque éluat de la plaque LP2 MIDI aux puits correspondants de la plaque LS PCR.
- 10 Jetez la plaque LP2 MIDI vide.
- 11 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque LS PCR.

Index de PCR

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préparez les réactifs suivants.
 - ▶ EPM : conservez sur de la glace.
 - ▶ UPxx : agitez pour mélanger et centrifugez brièvement. UPxx est le primer d'index sélectionné sur l'écran Create Run (Créer l'analyse) lors de la configuration de l'analyse dans le logiciel Local Run Manager.
 - ▶ CPxx : agitez pour mélanger et centrifugez brièvement. CPxx est le primer d'index sélectionné sur l'écran Create Run (Créer l'analyse) lors de la configuration de l'analyse dans le logiciel Local Run Manager.
- 2 Assurez-vous que les index pour chaque échantillon correspondent à l'analyse planifiée dans Local Run Manager lors de la configuration de l'analyse. Assurez-vous de suivre les instructions relatives à la sélection d'index de la *notice d'accompagnement de TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200007789)*.



ATTENTION

Les inadéquations entre les échantillons et les primers d'indexage entraînent un rapport de résultats incorrect en raison de la perte de l'identification positive de l'échantillon.

Procédure

- 1 Ajoutez 5 µl du primer d'index adapté (UPxx ou CPxx) au puits d'échantillon correspondant de la plaque LS PCR, conformément aux index sélectionnés sur l'écran Create Run (Créer l'analyse) dans le logiciel Local Run Manager lors de la configuration de l'analyse.



ATTENTION

Manipulez et ouvrez un seul tube de primer d'index à la fois. Rebouchez chaque tube d'index immédiatement après utilisation. Ne combinez pas les primers d'index.

- 2 Agitez l'EPM pendant 5 secondes, puis centrifugez brièvement.
- 3 Ajoutez 20 µl d'EPM à chaque puits d'échantillon.
- 4 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque LS PCR.
Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.
- 5 Agitez à 1 200 tr/min pendant 1 minute.
- 6 Entreposez de nouveau les réactifs de pré-amplification.



ATTENTION

Effectuez toutes les étapes suivantes dans une zone de postamplification pour éviter la contamination du produit d'amplification.

- 7 Centrifugez la plaque LS PCR à 280 x g durant une minute.
- 8 Placez sur le thermocycleur de postamplification préprogrammé et lancez le programme I-PCR.
Consultez la section *Programmer les thermocycleurs à la page 4*.

REMARQUE Si vous continuez avec *Configuration de la première hybridation à la page 19*, suivez les instructions de décongélation pour les réactifs de la section Préparation aux étapes du protocole.

- 9 Une fois le programme I-PCR terminé, centrifugez la plaque LS PCR à 280 x g durant une minute.
- 10 Réétiquetez la plaque avec la mention ALS (Amplified Library Samples, échantillons de librairie amplifiés).

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, entreposez la plaque ALS PCR entre -25 et -15 °C jusqu'à 30 jours.

Date et heure de fin _____

Préparation pour les étapes du protocole

- 1 Assurez-vous que les programmes de post-amplification du thermocycleur sont configurés. Consultez la section [Programmer les thermocycleurs à la page 4](#).
- 2 Retirez le tube de réactif de la boîte et suivez les instructions de décongélation.

Tableau 12 Boîte TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigéré) (réf. 20031123)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
TCB1	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Configuration de la première hybridation

Tableau 13 Boîte TruSight Oncology Comp Enrichment (congelé) (n° de réf. 20031121)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
TCA1	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la première hybridation

Tableau 14 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n° de réf. 20031122)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
OPR1 (bouchon rouge)	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la première hybridation
OPD2 (bouchon blanc)	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la première hybridation

Configuration de la première hybridation

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préparez les réactifs suivants.
 - ▶ TCB1 : chauffez le tube à 37 °C pendant 5 minutes. Agitez pour mélanger pendant 10 secondes, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ TCA1 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ OPR1 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ OPD2 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 2 Si la plaque ALS PCR a été conservée, décongelez-la à température ambiante, puis centrifugez-la à 280 × g pendant 1 minute. Pipettez ensuite pour mélanger.
- 3 Étiquetez une nouvelle plaque PCR de 96 puits avec la mention HYB1 (Hybridation 1, hybridation 1).

Procédure

- 1 Transférez 20 µl de chaque librairie ADNc et/ou ADNg de la plaque ALS PCR aux puits correspondants de la plaque HYB1 PCR.
- 2 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque ALS PCR et réservez. Scellez complètement les bords et les puits.
- 3 Vérifiez la présence de précipités dans le TCB1. En cas de présence de précipités, réchauffez le tube et agitez-le jusqu'à la dissolution des cristaux.
- 4 Ajoutez 15 µl de TCB1 à chaque puits de librairie de la plaque HYB1 PCR.
- 5 Ajoutez 10 µl de TCA1 à chaque puits de librairie de la plaque HYB1 PCR.

- 6 Ajoutez des sondes.
Ne combinez **pas** différents types de sondes.
 - ▶ **Puits de bibliothèques d'ARN** : 5 µl d'OPR1 à chaque bibliothèque dérivée de l'ARN.
 - ▶ **Puits de bibliothèques d'ADN** : 5 µl d'OPD2 à chaque bibliothèque dérivée de l'ADN.
- 7 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque HYB1 PCR.



ATTENTION

Assurez-vous de sceller complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.

- 8 Agitez à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
- 9 Placez sur le thermocycleur et exécutez le programme HYB1.
Consultez la section *Programmer les thermocycleurs* à la page 4.
- 10 Hybridez à 57 °C pendant 8 heures minimum, jusqu'à 24 heures maximum.
- 11 Entreposez de nouveau les réactifs d'hybridation.
- 12 Stockez la plaque ALS PCR à une température comprise entre -25 et -15 °C pour une durée maximale de 30 jours.

Préparation pour les étapes du protocole

- 1 Au début du jour 2, retirez le tube de réactif de la boîte et suivez les instructions de décongélation.

Tableau 15 Boîte TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigéré) (réf. 20031123)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
SMB (étiquette bleu foncé)	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Première capture de cibles Deuxième capture de cibles
ET2	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Première capture de cibles Deuxième capture de cibles
HP3	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Première capture de cibles Deuxième capture de cibles Normalisation des bibliothèques
TCB1	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation
RSB	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Deuxième capture de cibles Nettoyage de la bibliothèque enrichie amplifiée

Tableau 16 Boîte TruSight Oncology Comp Enrichment (congelé) (n° de réf. 20031121)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
EE2	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Première capture de cibles Deuxième capture de cibles Normalisation des bibliothèques
EEW	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Première capture de cibles
TCA1	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation

Tableau 17 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n° de réf. 20031122)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
OPR1 (bouchon rouge)	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation
OPD2 (bouchon blanc)	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation

Première capture de cibles

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préchauffez un incubateur de microéchantillons avec un insert de bloc chauffant MIDI à 57 °C.
- 2 Préparez les réactifs suivants.
 - ▶ EWW : agitez pour mélanger pendant 1 minute.
 - ▶ EE2 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ HP3 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ SMB : assurez-vous que les billes sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes.
 - ▶ Veillez à utiliser du **SMB** et non du SPB pour cette procédure.
 - ▶ ET2 : réservez pour l'utilisation dans la procédure.
- 3 Préparez un nouveau mélange d'élution EE2+HP3 dans un tube de microcentrifugeuse.

Tableau 18 Mélange d'élution EE2+HP3 pour la première capture de cibles

Composant du mélange d'élution	3 librairies	8 librairies	16 librairies	24 librairies	48 librairies
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

Ce tableau comprend les excédents de volume. Reportez-vous à la section Manipulation des réactifs de la *notice d'accompagnement TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (document n° 200007789) pour les calculs.

- 4 Agitez le mélange d'élution EE2+HP3 et centrifugez ensuite brièvement. Réservez pour l'étape **Élution**.
- 5 Étiquetez une nouvelle plaque MIDI à 96 puits avec la mention CAP1 (Capture 1).
- 6 Disposez l'aimant.

Procédure

Liaison

- 1 Retirez la plaque HYB1 PCR du thermocycleur.
- 2 Centrifugez la plaque HYB1 PCR à 280 x g durant une minute.
- 3 Agitez le SMB pendant une minute pour remettre les billes en suspension.
- 4 Ajoutez immédiatement 150 µl de SMB à chaque puits de librairie de la plaque CAP1 MIDI.
Si vous utilisez une cuve pour distribuer le SMB, incluez un facteur d'excédent de 1,15 lorsque vous aliquotez suffisamment de matériel par échantillon. Jetez le matériel restant une fois que le SMB a été ajouté dans chacun des puits d'échantillon.
- 5 Réglez une pipette sur 50 µl puis transférez le volume total de chaque librairie de la plaque HYB1 PCR aux puits correspondants de la plaque CAP1 MIDI.
- 6 Jetez la plaque HYB1 PCR vide.
- 7 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque CAP1 MIDI
Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.
- 8 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 9 Incubez dans l'incubateur de microéchantillons préchauffé à 57 °C pendant 25 minutes.
- 10 Placez sur un support magnétique pendant 2 minutes.
- 11 Tout en gardant la plaque CAP1 MIDI sur le support magnétique, utilisez une pipette p200 réglée sur 200 µl pour retirer et jeter tout le surnageant sans déranger le culot de billes.

**ATTENTION**

Passez immédiatement à l'étape suivante (**Lavage**). Ne laissez pas le culot de billes sans liquide pendant une période trop longue.

Lavage

- 1 Lavez les billes comme suit.
 - a Retirez la plaque CAP1 MIDI du support magnétique.
 - b Ajoutez 200 µl d'EWV à chaque puits.
 - c Réglez le volume d'une pipette à 150 µl et pipettez pour mélanger au moins 10 fois. Assurez-vous que les billes sont remises en suspension.

**ATTENTION**

Assurez-vous qu'il n'y a aucun culot de billes en aspirant soigneusement la totalité de la solution constituée de billes du puits dans la pointe. Examinez le fond de chaque puits pour vous assurer qu'aucun culot ne s'y trouve. Inclinez la pointe de la pipette vers le culot de bille lors des étapes de lavage pour le déloger. Assurez-vous que le culot de bille est entièrement immergé dans la solution. La solution doit avoir une couleur marron foncé et une consistance homogène.

- d Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque CAP1 MIDI
 - e Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.
 - f Agitez à 1 800 tr/min pendant 4 minutes.
 - g Incubez dans l'incubateur de microéchantillons à 57 °C pendant 5 minutes.
 - h Placez sur un support magnétique pendant 2 minutes.
 - i Conservez sur un support magnétique, puis retirez et jetez le surnageant de chaque puits d'échantillon sans déranger le culot de bille.
- 2 Lavez les billes une **deuxième** fois.
 - 3 Lavez les billes une **troisième** fois.
 - 4 Éliminez les résidus de surnageant de chaque puits.
Utilisez une pipette p20 avec des pointes fines.

Élution

- 1 Retirez la plaque CAP1 MIDI du support magnétique.
- 2 Agitez le nouveau mélange d'élution EE2+HP3 et centrifugez ensuite brièvement.
- 3 Ajoutez soigneusement 17 µl de mélange d'élution EE2+HP3 à chaque puits de librairie de la plaque CAP1 MIDI.
- 4 Jetez le mélange d'élution EE2+HP3 restant.
- 5 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque CAP1 MIDI
Scellez complètement les bords et les puits.
- 6 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 7 Placez sur un support magnétique pendant 2 minutes.
- 8 Étiquetez une nouvelle plaque PCR de 96 puits avec la mention ELU1 (Elution 1, élution 1).
- 9 Agitez l'ET2 pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 10 Ajoutez 5 µl d'ET2 à chaque puits de librairie correspondant de la nouvelle plaque ELU1 PCR.
- 11 Transférez soigneusement 15 µl de chaque éluat de la plaque CAP1 MIDI aux puits correspondants de la plaque ELU1 PCR.
- 12 Jetez la plaque CAP1 MIDI vide.
- 13 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque ELU1 PCR.
- 14 Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.
- 15 Agitez à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.

- 16 Entreposez de nouveau l'EEW.

Configuration de la deuxième hybridation

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préparez les réactifs suivants.
- ▶ TCB1 : chauffez le tube à 37 °C pendant 5 minutes. Agitez pour mélanger pendant 10 secondes, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ TCA1 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ OPR1 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ OPD2 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.

Procédure

- 1 Vérifiez la présence de précipités dans le TCB1. En cas de présence de précipités, réchauffez le tube à nouveau et agitez-le jusqu'à dissolution des cristaux.
- 2 Ajoutez 15 µl de TCB1 à chaque puits de librairie de la plaque ELU1 PCR.
- 3 Ajoutez 10 µl de TCA1 à chaque puits de librairie.
- 4 Ajoutez des sondes.
Ne combinez **pas** différents types de sondes.
- ▶ **Puits de librairies d'ARN** : 5 µl d'OPR1 à chaque librairie dérivée de l'ARN.
 - ▶ **Puits de librairies d'ADN** : 5 µl d'OPD2 à chaque librairie dérivée de l'ADN.
- 5 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque ELU1 PCR.
Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.
- 6 Agitez à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
- 7 Placez sur un thermocycleur et exécutez le programme HYB2.
Consultez la section [Programmer les thermocycleurs à la page 4](#).
- 8 Hybridez à 57 °C pendant 1,5 heure minimum, jusqu'à 4 heures maximum.
- 9 Entreposez de nouveau le TCA1, le TCB1, l'OPR1 et l'OPD2.

Deuxième capture de cibles

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préchauffez un incubateur de microéchantillons avec un insert de bloc chauffant MIDI à 57 °C.
- 2 Préparez les réactifs suivants.
- ▶ EE2 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ HP3 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ SMB : assurez-vous que les billes sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes.
 - ▶ Veillez à utiliser du **SMB** et non du SPB pour cette procédure.
 - ▶ RSB : réservez pour l'utilisation dans la procédure.
 - ▶ ET2 : réservez pour l'utilisation dans la procédure.
- 3 Préparez un nouveau mélange d'éluion EE2+HP3 dans un tube de microcentrifugeuse.

Tableau 19 Mélange d'éluion EE2+HP3 pour les cibles de capture deux

Composant du mélange d'éluion	3 librairies	8 librairies	16 librairies	24 librairies	48 librairies
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

Ce tableau comprend les excédents de volume. Reportez-vous à la section Manipulation des réactifs de la *notice d'accompagnement TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (document n° 200007789) pour les calculs.

- 4 Agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement. Réservez pour l'étape *Élution*.
- 5 Étiquetez une nouvelle plaque MIDI à 96 puits avec la mention CAP2 (Capture 2).
- 6 Disposez l'aimant.

Procédure

Liaison

- 1 Retirez la plaque ELU1 PCR du thermocycleur.
- 2 Centrifugez la plaque ELU1 PCR à 280 x g durant une minute.
- 3 Agitez le SMB pendant une minute pour remettre les billes en suspension.
- 4 Ajoutez immédiatement 150 µl de SBP à chaque puits de librairie de la plaque CAP2 MIDI.
Si vous utilisez une cuve pour distribuer le SMB, incluez un facteur d'excédent de 1,15 lorsque vous aliquotez suffisamment de matériel par échantillon. Jetez le matériel restant une fois que le SMB a été ajouté dans chacun des puits d'échantillon.
- 5 Réglez une pipette sur 50 µl puis transférez le volume total de chaque librairie de la plaque ELU1 PCR aux puits correspondants de la plaque CAP2 MIDI.
- 6 Jetez la plaque ELU1 PCR vide.
- 7 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque CAP2 MIDI.
Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.
- 8 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 9 Incubez dans l'incubateur de microéchantillons à 57 °C pendant 25 minutes.

REMARQUE Si vous continuez avec *Amplification de la librairie enrichie à la page 25*, suivez les instructions relatives aux réactifs de la section Préparation aux étapes du protocole.

- 10 Placez sur un support magnétique pendant 2 minutes.
- 11 Gardez la plaque CAP2 MIDI sur le support magnétique, et utilisez une pipette p200 réglée sur 200 µl pour retirer et jeter tout le surnageant de chaque puits d'échantillon sans déranger le culot de billes.



ATTENTION

Passez immédiatement à l'étape suivante (*Lavage*). Ne laissez pas le culot de billes sans liquide pendant une période trop longue.

Lavage

- 1 Retirez la plaque CAP2 MIDI du support magnétique.
- 2 Retournez ou agitez le RSB pour mélanger.
- 3 Ajoutez 200 µl de RSB à chaque puits.
- 4 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque CAP2 MIDI.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 5 Agitez à 1 800 tr/min pendant 4 minutes.
- 6 Placez sur le support magnétique pendant 2 minutes.
- 7 Gardez la plaque CAP2 MIDI sur le support magnétique, et retirez puis jetez tout le surnageant sans déranger le culot de billes.
- 8 Éliminez les résidus de surnageant de chaque puits.
Utilisez une pipette p20 avec des pointes fines.

Élution

- 1 Retirez la plaque CAP2 MIDI du support magnétique.

- 2 Agitez le nouveau mélange d'éluion EE2+HP3 et centrifugez ensuite brièvement.
- 3 Ajoutez 22 µl de solution EE2+HP3 à chaque puits de librairie de la plaque CAP2 MIDI.
- 4 Jetez le mélange d'éluion EE2+HP3 restant.
- 5 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque CAP2 MIDI.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 6 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 7 Placez sur un support magnétique pendant 2 minutes.
- 8 Étiquetez une nouvelle plaque PCR de 96 puits avec la mention ELU2 (Elution 2, éluion 2).
- 9 Agitez l'ET2 pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 10 Ajoutez 5 µl d'ET2 à chaque puits de librairie correspondant de la nouvelle plaque ELU2 PCR.
- 11 Transférez 20 µl de chaque éluat de la plaque CAP2 MIDI aux puits correspondants de la plaque ELU2 PCR.
- 12 Jetez la plaque CAP2 MIDI vide.
- 13 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque ELU2 PCR.
Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.
- 14 Agitez à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
- 15 Réentreposez le SMB, l'EE2, le HP3 et l'ET2.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, centrifugez la plaque ELU2 PCR à 280 x g pendant une minute, puis conservez-la entre -25 et -15 °C jusqu'à 30 jours. Entreposez de nouveau le RSB.

Date et heure de fin _____

Préparation pour les étapes du protocole

- 1 Préparez un seau de glace.
- 2 Retirez le tube de réactif de la boîte et suivez les instructions de décongélation.

Tableau 20 Boîte TruSight Oncology Comp Enrichment (congelé) (n° de réf. 20031121)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
PPC3	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Amplification de la librairie enrichie
EPM	De -25 à -15 °C	Conserver sur de la glace.	Amplification de la librairie enrichie

Tableau 21 Boîte TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigéré) (réf. 20031123)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
SPB (étiquette vert clair)	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Nettoyage et amplification de la librairie enrichie
RSB	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Nettoyage et amplification de la librairie enrichie Préparation pour le séquençage

Amplification de la librairie enrichie

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Si la plaque ELU2 a été conservée, décongelez-la à température ambiante, puis centrifugez-la à 280 x g pendant 1 minute.

Procédure

- 1 Agitez le PPC3 pour mélanger, puis centrifugez brièvement.

- 2 Ajoutez 5 µl de PPC3 dans chaque puits de librairie de la plaque ELU2 PCR.
- 3 Agitez l'EPM pendant 5 secondes, puis centrifugez brièvement.
- 4 Ajoutez 20 µl d'EPM à chaque puits de librairie.
- 5 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque ELU2 PCR.
Scellez complètement les bords et les puits pour éviter l'évaporation.
- 6 Agitez à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
- 7 Placez sur un thermocycleur et exécutez le programme EL-PCR.
Consultez la section *Programmer les thermocycleurs à la page 4*.

REMARQUE Si vous continuez avec *Normalisation des librairies à la page 28*, suivez les instructions de décongélation de la section Préparation aux étapes du protocole.

- 8 Entreposez de nouveau le PPC3 et l'EPM.

Nettoyage de la librairie enrichie amplifiée

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préparez les réactifs suivants.
 - ▶ SPB : assurez-vous que les billes sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes.
 - ▶ Veillez à utiliser du **SPB** et non du SMB pour cette procédure.
 - ▶ RSB : réservez pour l'utilisation dans la procédure.
- 2 Préparez une nouvelle solution d'éthanol à 80 % dans un tube conique de 15 ou 50 ml.

Réactif	3 librairies	8 librairies	16 librairies	24 librairies	48 librairies
Alcool à l'éthanol à 100 %, pur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Eau sans DNase ni RNase	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Agitez la nouvelle solution d'éthanol à 80 % pour mélanger.
- 4 Étiquetez une nouvelle plaque MIDI à 96 puits BIND2 (liaison de nettoyage).
- 5 Disposez l'aimant.

Procédure

Liaison

- 1 Retirez la plaque ELU2 PCR du thermocycleur.
- 2 Centrifugez la plaque ELU2 PCR à 280 x g durant une minute.
- 3 Agitez le SPB pendant une minute pour remettre les billes en suspension.
- 4 Ajoutez immédiatement 110 µl de SBP à chaque puits de librairie de la plaque BIND2 MIDI.
- 5 Transférez 50 µl de chaque librairie de la plaque ELU2 PCR aux puits correspondants de la plaque BIND2 MIDI.
- 6 Jetez la plaque ELU2 PCR vide.
- 7 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque BIND2 MIDI.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 8 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 9 Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
- 10 Placez la plaque sur un support magnétique pendant 5 minutes.
- 11 Utilisez une pipette p200 réglée sur 200 µl pour retirer et jeter **tout** le surnageant de chaque puits de librairie sans déranger le culot de bille.

Lavage

- 1 Lavez les billes comme suit.
 - a Conservez sur le support magnétique et ajoutez 200 µl de nouvelle solution à l'éthanol à 80 % à chaque puits.
 - b Attendez 30 secondes.
 - c Retirez et jetez le surnageant de chaque puits d'échantillon sans déranger le culot de billes.
- 2 Lavez les billes une **deuxième** fois.
- 3 Éliminez les résidus d'éthanol de chaque puits.
Utilisez une pipette p20 avec des pointes fines.
- 4 Jetez l'alcool éthylique à 80 % inutilisé.

Élution

- 1 Retirez la plaque BIND2 MIDI du support magnétique.
- 2 Retournez ou agitez pour mélanger le RSB.
- 3 Ajoutez 32 µl de RSB à chaque puits de librairie.
- 4 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque BIND2 MIDI.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 5 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 6 Incubez à température ambiante pendant 2 minutes.
- 7 Placez sur un support magnétique pendant 2 minutes.
- 8 Étiquetez une nouvelle plaque PCR de 96 puits avec la mention PL (Purified Libraries, librairies purifiées).
- 9 Transférez 30 µl de chaque éluat de la plaque BIND2 MIDI aux puits correspondants de la plaque PL PCR.
- 10 Jetez la plaque BIND2 MIDI vide.
- 11 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque PL PCR.
- 12 Entreposez de nouveau le SPB.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, centrifugez la plaque PL PCR à 280 x g pendant une minute, puis conservez-la entre -25 et -15 °C jusqu'à 30 jours. Entreposez de nouveau le RSB.

Date et heure de fin _____

Préparation pour les étapes du protocole

- 1 Retirez le tube de réactif de la boîte et suivez les instructions de décongélation.

Tableau 22 Boîte TruSight Oncology Comp Enrichment (congelé) (n° de réf. 20031121)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
LNA1	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Normalisation des librairies
EE2	De -25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Normalisation des librairies

Tableau 23 Boîte TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigéré) (réf. 20031123)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
LNB1	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Normalisation des librairies
HP3	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Normalisation des librairies Préparation pour le séquençage

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
LNW1	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Normalisation des librairies
LNS1	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Normalisation des librairies

- 2 Si vous poursuivez le même jour avec l'étape *Préparation pour le séquençage à la page 30*, suivez les instructions de décongélation de la section Préparation pour les étapes du protocole.

Normalisation des librairies

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Préparez les réactifs suivants.
 - ▶ LNB1 : assurez-vous que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes.
 - ▶ LNA1 : agitez pour mélanger.
 - ▶ EE2 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ HP3 : agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
 - ▶ LNW1 : agitez pour mélanger. Réservez pour l'utilisation dans la procédure.
 - ▶ LNS1 : agitez pour mélanger. Réservez pour l'utilisation dans la procédure.
- 2 Agitez le LNB1 pendant une minute pour remettre les billes en suspension. Retournez le tube de LNB1 pour vous assurer que toutes les billes soient remises en suspension.
- 3 À l'aide d'une pipette p1000 réglée à 800 µl, pipettez le LNB1 vers le haut et vers le bas dix fois pour assurer la remise en suspension.
- 4 Préparez immédiatement un nouveau mélange maître LNA1+LNB1 dans un tube conique.



ATTENTION

Remettez totalement en suspension les culots de billes du LNB1 au fond du tube pour éviter les inégalités de densité des amplifiats.

Tableau 24 Mélange maître LNA1+LNB1.

Composant du mélange maître	3 librairies	8 librairies	16 librairies	24 librairies	48 librairies
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

Ce tableau comprend les excédents de volume. Reportez-vous à la section Manipulation des réactifs de la *notice d'accompagnement TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (document n° 200007789) pour les calculs.

- 5 Agitez le mélange maître LNA1+LNB1. Réservez pour l'étape de *Liaison*.
- 6 Préparez un nouveau mélange d'éluion EE2+HP3 dans un tube de microcentrifugeuse.

Tableau 25 Mélange d'éluion EE2+HP3 pour normaliser les librairies

Composant du mélange d'éluion	3 librairies	8 librairies	16 librairies	24 librairies	48 librairies
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1 824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Ce tableau comprend les excédents de volume. Reportez-vous à la section Manipulation des réactifs de la *notice d'accompagnement TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (document n° 200007789) pour les calculs.

- 7 Agitez le nouveau mélange d'éluion et centrifugez ensuite brièvement. Réservez pour l'étape *Éluion*.
- 8 Si la plaque PL PCR a été conservée, décongelez-la à température ambiante, puis centrifugez-la à 280 x g pendant 1 minute, puis pipettez pour mélanger.

- 9 Étiquetez une nouvelle plaque MIDI à 96 puits avec la mention BBN (Bead Based Normalization, normalisation basée sur les billes)
- 10 Disposez l'aimant.

Procédure

Liaison

- 1 Agitez le mélange maître LNA1+LNB1.
- 2 Ajoutez immédiatement 45 µl du mélange maître LNA1+LNB1 à chaque puits de librairie de la plaque BBN MIDI.
- 3 Jetez le mélange maître LNA1+LNB1 restant.
- 4 Ajoutez 20 µl de chaque librairie de la plaque PL PCR aux puits correspondants de la plaque BBN MIDI.
- 5 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque BBN MIDI.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 6 Agitez à 1 800 tr/min pendant 30 minutes.
- 7 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque PL PCR et entreposez de nouveau.
- 8 Placez la plaque sur un support magnétique pendant 2 minutes.
- 9 Conservez sur un support magnétique et utilisez une pipette P200 pour retirer et jeter le surnageant de chaque puits d'échantillon sans déranger le culot de bille.

Lavage

- 1 Lavez les billes comme suit.
 - a Retirez la plaque BBN MIDI du support magnétique.
 - b Ajoutez 45 µl de LNW1 à chaque puits de librairie.
 - c Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque BBN MIDI.
 - d Scellez complètement les bords et les puits.
 - e Agitez à 1 800 tr/min pendant 5 minutes.
 - f Placez sur un support magnétique pendant 2 minutes.
 - g Retirez et jetez le surnageant de chaque puits sans déranger le culot de billes.
- 2 Lavez les billes une **deuxième** fois.
- 3 Éliminez les résidus de surnageant de chaque puits.
Utilisez une pipette p20 avec des pointes fines.

Élution

- 1 Retirez la plaque BBN MIDI du support magnétique.
- 2 Agitez le nouveau mélange d'élution EE2+HP3 et centrifugez ensuite brièvement.
- 3 Ajoutez 32 µl de solution EE2+HP3 à chaque puits de librairie de la plaque BBN MIDI.
- 4 Jetez le mélange d'élution restant.
- 5 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque BBN MIDI.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 6 Agitez à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
- 7 Placez sur un support magnétique pendant 2 minutes.
- 8 Étiquetez une nouvelle plaque PCR de 96 puits avec la mention NL (Normalized Libraries, librairies normalisées).
- 9 Transférez soigneusement 30 µl de chaque éluat de la plaque BBN MIDI aux puits correspondants de la plaque NL PCR.



ATTENTION

Si des billes sont aspirées par la pointe de la pipette, reversez les billes dans la plaque sur le support magnétique et attendez que le liquide redevienne clair (environ 2 minutes) avant de passer à l'étape suivante de la procédure.

- 10 Jetez la plaque BBN MIDI vide.
- 11 Agitez le LNS1 pour mélanger.
- 12 Ajoutez 30 µl de LNS1 à chaque puits de librairie de la plaque NL PCR.
- 13 Pipettez pour mélanger 5 fois.
- 14 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque NL PCR.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 15 Réentreposez le LNB1, le LNA1, l'EE2, le LNW1 et le LNS1.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, centrifugez la plaque NL PCR à 280 x g pendant une minute, puis conservez-la entre -25 et -15 °C jusqu'à 30 jours.

Date et heure de fin _____

Préparation pour les étapes du protocole

Commencez la préparation des consommables pour le séquençage du NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (réf. 20028871) au moins une heure avant utilisation.

- 1 Retirez le tampon de dilution de librairie (HT1) de son entreposage de -25 à -15 °C, décongelez à température ambiante, puis placez sur de la glace.
- 2 Suivez les instructions de préparation du *guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)* pour les autres consommables de la trousse.
 - ▶ 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 Retirez le tube de réactif de la boîte et suivez les instructions de décongélation.

Tableau 26 Boîte TruSight Oncology Comp Enrichment (congelé) (n° de réf. 20031121)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
Contrôle interne PhiX (PhiX)	-25 à -15 °C	Décongeler à température ambiante. Conserver sur de la glace.	Préparation pour le séquençage

Tableau 27 Boîte TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigéré) (réf. 20031123)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
HP3	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Préparation pour le séquençage
RSB (étiquette rose)	De 2 à 8 °C	Amener à température ambiante.	Préparation pour le séquençage

Préparation pour le séquençage

Préparation

Date et heure de début _____

- 1 Consultez les directives de la section Nombre de librairies et sélection d'index à la page de la *notice d'accompagnement de TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200007789)*.
- 2 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dHP3 (HP3 dilué).
- 3 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dPhiX (PhiX dilué).
- 4 Préchauffez un bloc chauffant à 96 °C pour les tubes microcentrifuges.
- 5 Préparez un seau de glace.

Dilution et dénaturation du contrôle PhiX

- 1 Agitez le tube HP3 pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 2 Combinez les volumes suivants dans un tube de microcentrifugeuse dHP3.
 - ▶ 10 µl HP3
 - ▶ 190 µl d'eau sans DNase ni RNase
- 3 Agitez le tube dHP3 pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 4 Retournez ou agitez le RSB pour mélanger.
- 5 Agitez le contrôle PhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 6 Combinez les volumes suivants dans un tube de microcentrifugeuse dPhiX.
 - ▶ 8 µl de RSB
 - ▶ 2 µl de contrôle PhiX
- 7 Ajoutez 10 µl dHP3 au tube dPhiX.
- 8 Jetez le tube dHP3.
- 9 Agitez le tube dPhiX pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 10 Incubez le dPhiX à température ambiante pendant 5 minutes afin de dénaturer.
- 11 Agitez le HT1 pour mélanger.
- 12 Ajoutez immédiatement 980 µl de HT1 préalablement réfrigérés au dPhiX.
- 13 Agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 14 Placez le dPhiX sur de la glace jusqu'à son utilisation dans la préparation pour la deuxième dilution.
La concentration finale est de 20 pM dPhiX.
- 15 Entreposez à nouveau PhiX, HP3 et RSB.

Regrouper et dénaturer les librairies

- 1 Si la plaque NL PCR a été conservée, décongelez-la à température ambiante, puis centrifugez-la à 280 × g pendant 1 minute.
- 2 Avec une pipette multicanal réglée sur 30 µl, pipetez doucement pour mélanger les librairies dans la plaque NL PCR cinq fois.
Utilisez les embouts neufs pour chaque librairie.



ATTENTION

Veillez à bien mélanger les librairies pour une performance optimale.

- 3 Sélectionnez l'une des options suivantes pour regrouper, dénaturer et diluer les librairies.
 - ▶ **Option n° 1** : séquencer les librairies dérivées d'échantillons d'ARN et d'ADN simultanément. Consultez la section *Option n° 1 : librairies d'ADN et d'ARN ensemble* à la page 31.
 - ▶ **Option n° 2** : séquencer les librairies dérivées d'échantillons d'ADN uniquement. Consultez la section *Option n° 2 : librairies d'ADN uniquement* à la page 32.
 - ▶ **Option n° 3** : séquencer les librairies dérivées d'échantillons d'ARN uniquement. Consultez la section *Option n° 3 : librairies d'ARN uniquement* à la page 33.

Option n° 1 : librairies d'ADN et d'ARN ensemble

- 1 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse avec la mention PRL (Pooled RNA Libraries, librairies regroupées d'ARN).

- 2 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse avec la mention PDL (Pooled DNA Libraries, librairies regroupées d'ADN).
- 3 Transférez 10 µl de chaque librairie d'ARN (ADNc) normalisée de la plaque LN au tube PRL.
Ne regroupez pas deux librairies avec le même primer d'index.
- 4 Transférez 10 µl de chaque librairie d'ADN normalisée de la plaque NL au tube PDL.
Ne regroupez pas deux librairies avec le même primer d'index.
- 5 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque NL PCR.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 6 Agitez chaque tube PRL et PDL pour mélanger.
- 7 Centrifugez brièvement les tubes PRL et PDL.
- 8 Incubez les tubes PRL et PDL sur un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
- 9 Placez le PRL et le PDL sur de la glace pendant 5 minutes.
- 10 Agitez les tubes PRL et PDL pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 11 Remplacez les tubes PRL et PDL sur la glace.

Préparer la première dilution

- 1 Étiquetez un nouveau tube de microcentrifugeuse de 1,7 ml DIL1 (Dilution 1).
- 2 Transférez 20 µl de PDL dans le tube DIL1 vide.
- 3 Ajoutez 5 µl de PRL au DIL1.
- 4 Jetez les tubes de PDL et de PRL.
- 5 Ajoutez 475 µl de HT1 prérefroidi au tube DIL1 (dilution 1:20).
- 6 Agitez le tube DIL1 pour mélanger, puis centrifugez brièvement.

Préparer la deuxième dilution

- 1 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse de 2,0 ml avec la mention DIL2 (Dilution 2).
- 2 Transférez 40 µl de DIL1 dans le tube DIL2 vide.
- 3 Jetez le tube DIL1.
- 4 Ajoutez 1 660 µl de HT1 prérefroidi au tube DIL2 (dilution 1:850).
- 5 Agitez 20 pM de dPhiX pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 6 Ajoutez 2,5 µl de dPhiX préparé 20 pM au tube DIL2.
- 7 Agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 8 Chargez 1 300 µl de DIL2 à la cartouche de réactif NextSeq 550Dx à débit élevé v2 (300 cycles)
Pour obtenir plus de renseignements, consultez le *guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx* (document n° 1000000009513).
- 9 Jetez le tube DIL2.
- 10 Centrifugez la plaque NL PCR à 280 x g pendant une minute, puis conservez-la entre -25 et -15 °C jusqu'à 30 jours.
- 11 Passez au séquençage.
Pour obtenir plus de renseignements, consultez le *guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx* (document n° 1000000009513).

Option n° 2 : librairies d'ADN uniquement

- 1 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse avec la mention PDL (Pooled DNA Libraries, librairies regroupées d'ADN).
- 2 Transférez 10 µl de chaque librairie d'ADN normalisée de la plaque NL au tube PDL.
Ne regroupez pas deux librairies avec le même primer d'index.
- 3 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque NL PCR.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 4 Agitez le tube PDL pour mélanger.
- 5 Centrifugez brièvement le tube PDL.

- 6 Incubez le tube PDL sur un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
- 7 Placez le PDL sur de la glace pendant 5 minutes.
- 8 Agitez le tube PDL pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 9 Remplacez le tube PDL sur la glace.

Préparer la première dilution

- 1 Étiquetez un nouveau tube de microcentrifugeuse de 1,7 ml DIL1 (Dilution 1).
- 2 Transférez 10 µl de PDL dans le tube DIL1 vide.
- 3 Jetez le tube de PDL.
- 4 Ajoutez 190 µl de HT1 prérefroidi au tube DIL1 (dilution 1:20).
- 5 Agitez le tube DIL1 pour mélanger, puis centrifugez brièvement.

Préparer la deuxième dilution

- 1 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse de 2,0 ml avec la mention DIL2 (Dilution 2).
- 2 Transférez 40 µl de DIL1 dans le tube DIL2 vide.
- 3 Jetez le tube DIL1.
- 4 Ajoutez 1 660 µl de HT1 prérefroidi au tube DIL2 (dilution 1:850).
- 5 Agitez 20 pM de dPhiX préparé pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 6 Ajoutez 2,5 µl de dPhiX préparé 20 pM au tube DIL2.
- 7 Agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 8 Chargez 1 300 µl de DIL2 dans la NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 décongelé (300 cycles).
Pour obtenir plus de renseignements, consultez le *guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx* (document n° 100000009513).
- 9 Jetez le tube DIL2.
- 10 Centrifugez la plaque NL PCR à 280 x g pendant une minute, puis conservez-la entre -25 et -15 °C jusqu'à 30 jours.
- 11 Passez au séquençage.
Pour obtenir plus de renseignements, consultez le *guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx* (document n° 100000009513).

Option n° 3 : bibliothèques d'ARN uniquement

- 1 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse avec la mention PRL (Pooled RNA Libraries, bibliothèques regroupées d'ARN).
- 2 Transférez 10 µl de chaque bibliothèque d'ARN (ADNc) normalisée de la plaque LN au tube PRL.
Ne regroupez pas deux bibliothèques avec le même primer d'index.
- 3 Appliquez le scellé adhésif de plaque à la plaque NL PCR.
Scellez complètement les bords et les puits.
- 4 Agitez le tube PRL pour mélanger.
- 5 Centrifugez brièvement le tube PRL.
- 6 Incubez le tube PRL sur un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
- 7 Placez le PRL sur de la glace pendant 5 minutes.
- 8 Agitez le tube de PRL pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 9 Remplacez le tube de PRL sur la glace.

Préparer la première dilution

- 1 Étiquetez un nouveau tube de microcentrifugeuse de 1,7 ml DIL1 (Dilution 1).
- 2 Transférez 10 µl de PRL dans le tube DIL1 vide.
- 3 Jetez le tube de PRL.
- 4 Ajoutez 190 µl de HT1 prérefroidi au tube DIL1 (dilution 1:20).
- 5 Agitez le tube DIL1 pour mélanger, puis centrifugez brièvement.

Préparer la deuxième dilution

- 1 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse de 2,0 ml avec la mention DIL2 (Dilution 2).
- 2 Transférez 40 µl de DIL1 dans le tube DIL2 vide.
- 3 Jetez le tube DIL1.
- 4 Ajoutez 1 646 µl de HT1 prérefroidi au tube DIL2 (dilution 1:843).
- 5 Agitez 20 pM de dPhiX préparé pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 6 Ajoutez 16,7 µl de dPhiX préparé 20 pM au tube DIL2.
- 7 Agitez pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
- 8 Chargez 1 300 µl de DIL2 dans la NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 décongelée (300 cycles).
Pour obtenir plus de renseignements, consultez le *guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx* (document n° 1000000009513).
- 9 Jetez le tube DIL2.
- 10 Centrifugez la plaque NL PCR à 280 × g pendant une minute, puis conservez-la entre -25 et -15 °C jusqu'à 30 jours.
- 11 Passez au séquençage.
Pour obtenir plus de renseignements, consultez le *guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx* (document n° 1000000009513).

Brevets et marques de commerce

Ce document et son contenu sont exclusifs à Illumina, Inc. et à ses sociétés affiliées (« Illumina »); ils sont exclusivement destinés à l'usage contractuel de son client dans le cadre de l'utilisation du ou des produits décrits dans les présentes et ne peuvent servir à aucune autre fin. Ce document et son contenu ne seront utilisés ou distribués à aucune autre fin ni communiqués, divulgués ou reproduits d'aucune façon sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Illumina ne cède aucune licence en vertu de son brevet, de sa marque de commerce, de ses droits d'auteur ou de ses droits traditionnels ni des droits similaires d'un tiers quelconque par ce document.

Les instructions contenues dans ce document doivent être suivies strictement et explicitement par un personnel qualifié et adéquatement formé de façon à assurer l'utilisation correcte et sûre du ou des produits décrits dans les présentes. Le contenu intégral de ce document doit être lu et compris avant l'utilisation de ce ou ces produits.

SI UN UTILISATEUR NE LIT PAS COMPLÈTEMENT ET NE SUIVIT PAS EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LES PRÉSENTES, IL RISQUE DE CAUSER DES DOMMAGES AU(X) PRODUIT(S), DES BLESSURES, NOTAMMENT AUX UTILISATEURS ET À D'AUTRES PERSONNES, AINSI QUE D'AUTRES DOMMAGES MATÉRIELS, ANNULANT AUSSI TOUTE GARANTIE S'APPLIQUANT AU(X) PRODUIT(S).

ILLUMINA DÉCLINE TOUTE RESPONSABILITÉ DÉCOULANT DE L'UTILISATION INAPPROPRIÉE DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LES PRÉSENTES (Y COMPRIS LEURS COMPOSANTES ET LE LOGICIEL).

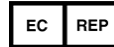
© 2022 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.

Coordonnées



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Californie 92122 États-Unis
+ (1) 800 809 ILMN (4566)
+ (1) 858 202 4566 (en dehors de l'Amérique du Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Pays-Bas

Étiquette du produit

Pour voir la liste complète des symboles qui peuvent figurer sur l'emballage et l'étiquetage du produit, reportez-vous à la légende des symboles de votre trousse sur le site support.illumina.com.