

Formularz badania laboratoryjnego TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) Lab Tracking Form

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO
WYŁĄCZNIE NA EKSPORT

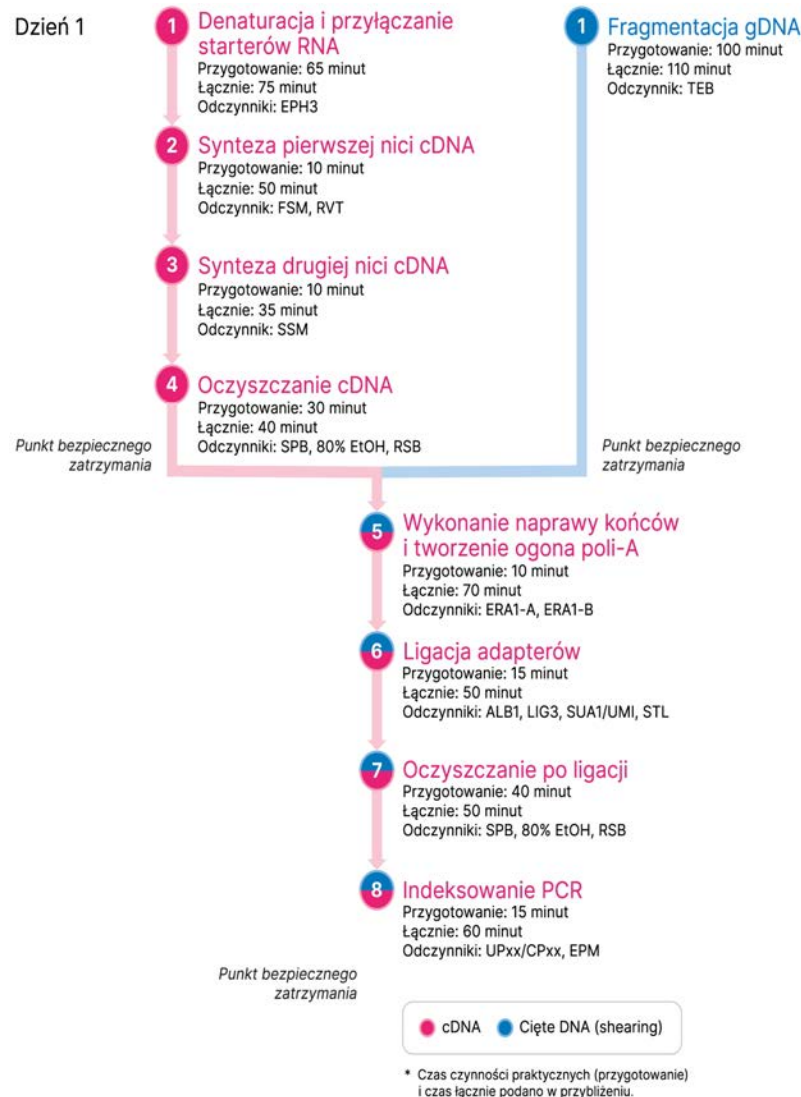
Instrukcja użytkowania

Przegląd procedury testu TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) przedstawiają [Rysunek 1](#) i [Rysunek 2](#).

Przed rozpoczęciem protokołu należy zapoznać się z ostrzeżeniami i środkami ostrożności zawartymi w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU))* (nr dokumentu: 200007789).

Procedura przygotowania biblioteki

Rysunek 1 Procedura testu TSO Comprehensive (część 1)



Procedura wzbogacania

Rysunek 2 Procedura testu TSO Comprehensive (część 2)



Programowanie termocyklerów

- 1 Przed rozpoczęciem testu należy zapisać następujące programy w termocyklerach używanych na etapie przed amplifikacją i po amplifikacji.

Tabela 1 Programy termocyklera przed amplifikacją

Etap procedury	Nazwa programu	Temperatura pokrywy	Objętość reakcji	Parametry termocyklera
Denaturacja RNA i przyłączanie starterów	LQ-RNA	100°C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65°C przez 5 minut • 4°C przez 1 minutę • Pozostawić w temperaturze 4°C
Synteza pierwszej nici cDNA	1stSS	100°C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25°C przez 10 minut • 42°C przez 15 minut • 70°C przez 15 minut • 4°C przez 1 minutę • Pozostawić w temperaturze 4°C
Synteza drugiej nici cDNA	2ndSS	30°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16°C przez 25 minut • 4°C przez 1 minutę • Pozostawić w temperaturze 4°C

Jeśli temperatura pokrywy dla programu 2ndSS nie może zostać ustawiona na 30°C, należy wyłączyć opcję podgrzewania pokrywy.

Tabela 2 Programy termocyklera po amplifikacji

Etap procedury	Nazwa programu	Temperatura pokrywy	Objętość reakcji	Parametry termocyklera
Indeksowanie PCR	I-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C przez 30 sekund • 15 cykli po: <ul style="list-style-type: none"> • 98°C przez 10 sekund • 60°C przez 30 sekund • 72°C przez 30 sekund • 72°C przez 5 minut • Pozostawić w temperaturze 10°C
Wykonanie pierwszej hybrydyzacji	HYB1	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C przez 10 minut • 85°C przez 2 min 30 sekund • 75°C przez 2 min 30 sekund • 65°C przez 2 min 30 sekund • Pozostawić w temperaturze 57°C przez 8 do 24 godzin
Wykonanie drugiej hybrydyzacji	HYB2	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C przez 10 minut • 85°C przez 2 min 30 sekund • 75°C przez 2 min 30 sekund • 65°C przez 2 min 30 sekund • Pozostawić w temperaturze 57°C przez 1,5 do 4 godzin
Amplifikacja biblioteki wzbogaconej	EL-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C przez 30 s • 18 cykli po: <ul style="list-style-type: none"> • 98°C przez 10 s • 60°C przez 30 s • 72°C przez 30 s • 72°C przez 5 min • Pozostawić w temperaturze 10°C

Wprowadzanie informacji o przebiegu

Do skonfigurowania przebiegu testu TSO Comprehensive służy oprogramowanie Lokalny menedżer przebiegu aparatu NextSeq 550Dx. Więcej informacji zawiera *Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu analitycznego Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (nr dok. 200008661)*. Informacje o konfiguracji przebiegu i próbki należy wprowadzić bezpośrednio do modułu analitycznego TruSight Oncology Comprehensive.

Ustawianie parametrów przebiegu

- 1 Zalogować się do Lokalnego menedżera przebiegu na instrumencie lub z komputera podłączonego do sieci.
- 2 Wybrać **Create Run** (Utwórz przebieg), a następnie wybrać **TSO Comp (EU)**.
- 3 Wprowadzić nazwę przebiegu, która identyfikuje przebieg od sekwencjonowania po analizę, kierując się poniższymi kryteriami.
 - ▶ 1–40 znaków.
 - ▶ Tylko znaki alfanumeryczne, znaki podkreślenia lub łączniki.
 - ▶ Przed znakiem podkreślenia lub łącznikiem oraz po nich musi występować znak alfanumeryczny.
 - ▶ Unikalna dla wszystkich przebiegów w instrumencie.
- 4 **[Opcjonalnie]** Wprowadzić opis przebiegu, aby ułatwić jego identyfikację, spełniając następujące kryteria.
 - ▶ 1–150 znaków.
 - ▶ Tylko znaki alfanumeryczne i spacje.
 - ▶ Przed spacją i po niej musi występować znak alfanumeryczny.

Określanie próbek do przebiegu

Określić próbki do uwzględnienia w przebiegu za pomocą jednej z poniższych opcji.

- ▶ **Enter samples manually** (Ręczne wprowadzanie próbek) – należy użyć pustej tabeli na ekranie Create Run (Tworzenie przebiegu).
- ▶ **Import samples** (Importowanie próbek) – należy przejść do pliku zewnętrznego w formacie wartości rozdzielonych przecinkami (*.csv). Szablon jest dostępny do pobrania na ekranie Create Run (Tworzenie przebiegu).



PRZESTROGA

Niezgodności między próbkami i starterami do indeksowania powodują zgłaszanie nieprawidłowych wyników z powodu utraty identyfikacji próbki dodatkowo. Przed rozpoczęciem przygotowywania biblioteki należy wprowadzić identyfikatory próbek i przypisać indeksy w Lokalnym menedżerze przebiegu. W trakcie przygotowywania biblioteki zanotować identyfikatory próbek, startery indeksujące i orientację dołków na płytce dla odniesienia.



PRZESTROGA

Aby uniknąć utraty danych, przed zapisaniem przebiegu należy upewnić się, że nie trwa instalacja KB.

Ręczne wprowadzanie próbek

- 1 Wprowadzić niepowtarzalną nazwę próbki w polu Sample ID (Identyfikator próbki), spełniając następujące kryteria. **Najpierw należy dodać wszystkie próbki kontrolne.** Więcej informacji zawiera sekcja *Próbki kontrolne na stronie 7*.
 - ▶ 1–25 znaków.
 - ▶ Tylko znaki alfanumeryczne, znaki podkreślenia lub łączniki.
 - ▶ Przed znakiem podkreślenia lub łącznikiem oraz po nich musi występować znak alfanumeryczny.
- 2 **[Opcjonalnie]** Wprowadzić opis próbki w polu Sample Description (Opis próbki), spełniając poniższe kryteria.
 - ▶ 1–50 znaków.
 - ▶ Tylko znaki alfanumeryczne, łączniki, znaki podkreślenia lub spacje.

- ▶ Przed spacją, znakiem podkreślenia lub łącznikiem oraz po nich musi występować znak alfanumeryczny.
- 3 Wybrać indeks dla biblioteki DNA i/lub biblioteki RNA przygotowanej z próbek.
Upewnić się, że próbki RNA i DNA znajdują się w osobnych kolumnach.
Pole DNA i7+i5 Sequence (Sekwencjonowanie DNA i7+i5) podstawia się automatycznie po wybraniu identyfikatora indeksu DNA. Pole RNA i7+i5 Sequence (Sekwencjonowanie RNA i7+i5) podstawia się automatycznie po wybraniu identyfikatora indeksu RNA.
W uzupełnieniu zamieszczonego tutaj podsumowania informacje na temat wyboru identyfikatora indeksu można znaleźć w dokumencie TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (*Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU)*) (nr dokumentu: 200007789).
 - ▶ W przypadku biblioteki próbek DNA z listy rozwijanej DNA Index ID (Identyfikator indeksu DNA) wybrać unikalny identyfikator indeksu (indeksy UPxx lub CPxx).
 - ▶ W przypadku biblioteki próbek RNA z listy rozwijanej RNA index ID (Identyfikator indeksu RNA) wybrać unikalny identyfikator indeksu (tylko indeksy UPxx).
 - ▶ Jeśli w przebiegu są łącznie trzy biblioteki, należy postępować zgodnie z wytycznymi dotyczącymi wyboru indeksu w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania oznaczenia TruSight Oncology Comprehensive (EU))* (nr dokumentu 200007789).
- 4 Użyć pola Tumor Type (Typ nowotworu), aby przypisać typ nowotworu dla każdej próbki, wybierając najbardziej specyficzny z dostępnych typów nowotworów. Patrz *Wybór typu nowotworu na stronie 7*.
- 5 Użyć pola Tumor Type (Typ nowotworu), aby przypisać jeden z poniższych typów kontroli dla każdej kontroli. Patrz *Próbki kontrolne na stronie 7*.
 - Zewnętrzna kontrola DNA
 - Zewnętrzna kontrola RNA
 - Kontrola DNA bez wzorca
 - Kontrola RNA bez wzorca
 Jeśli używana jest kontrola Consumable Prefix DNA Control (Kontrola DNA z prefiksem materiału eksploatacyjnego), wówczas typem kontroli jest DNA External Control (Zewnętrzna kontrola DNA). Jeśli używana jest kontrola Consumable Prefix RNA Control (Kontrola RNA z prefiksem materiału eksploatacyjnego), wówczas typem kontroli jest RNA External Control (Zewnętrzna kontrola RNA).
- 6 Przypisać płęć.
- 7 [Opcjonalnie] Wybrać opcję **Export to CSV** (Eksportuj do CSV), aby wyeksportować informacje o próbce do pliku zewnętrznego.
- 8 Sprawdzić informacje na ekranie Create Run (Utwórz przebieg).
Nieprawidłowe informacje mogą wpłynąć na wyniki.
- 9 Wybrać opcję **Save Run** (Zapisz przebieg).

Importowanie próbek

- 1 Wybrać opcję **Import CSV** (Importuj CSV) i przejść do lokalizacji pliku z informacjami o próbce. Można zaimportować dwa rodzaje plików.
 - Wybrać **Download CSV** (Pobierz CSV) na ekranie Create Run (Utwórz przebieg), aby pobrać nowy szablon informacji o próbce. Plik CSV zawiera wymagane nagłówki kolumn i format do importu. Dla próbek w przebiegu w każdej kolumnie wprowadzić informacje o próbce. W przypadku kolumny Tumor Type (Typ nowotworu) należy wpisać termin określający typ nowotworu lub powiązany z nim kod (patrz *Pobieranie typów nowotworów na stronie 1*). Pole Tumor Type (Typ nowotworu) jest również wykorzystywane do oznaczania próbek jako kontrole (patrz *Próbki kontrolne na stronie 7*).
 - Użyć pliku z informacjami o próbce, który został wyeksportowany z modułu analizy TSO Comprehensive przy użyciu funkcji Export to CSV (Eksportuj do CSV).
- 2 Na ekranie Create Run (Utwórz przebieg) należy sprawdzić zaimportowane informacje.
Nieprawidłowe informacje mogą wpłynąć na wyniki.
- 3 [Opcjonalnie] Wybrać opcję **Export to CSV** (Eksportuj do CSV), aby wyeksportować informacje o próbce do pliku zewnętrznego.

- 4 Wybrać opcję **Save Run** (Zapisz przebieg).

Próbki kontrolne

Test TSO Comprehensive wymaga zastosowania Kontroli panelu. Oznaczenie próbki jako kontroli automatycznie ustawia parametr Sex (Płeć) próbki jako Unknown (Nieznana). Aby oznaczyć próbkę jako kontrolę, należy wybrać jeden z czterech typów kontroli w polu Tumor Type (Typ nowotworu): DNA External Control (Zewnętrzna próbka kontrolna DNA) (dodatnia kontrola DNA), DNA No-Template Control (Próbka kontrolna DNA bez wzorca), RNA External Control (Zewnętrzna próbka kontrolna RNA) (dodatnia kontrola RNA) lub RNA No-Template Control (Próbka kontrolna RNA bez wzorca). Więcej informacji na temat konfiguracji typów nowotworów dla wszystkich typów próbek podczas konfiguracji przebiegu znajduje się w części *Wybór typu nowotworu na stronie 7*.

W ramach przebiegu można określić tylko jeden z każdego typu kontroli. Tylko biblioteka DNA może zostać wskazana jako zewnętrzna próbka kontrolna DNA lub próbka kontrolna DNA bez wzorca. Tylko biblioteka RNA może zostać wskazana jako zewnętrzna próbka kontrolna RNA lub próbka kontrolna RNA bez wzorca. Biblioteki oznaczone jako kontrole DNA lub RNA bez wzorca nie są zliczane względem maksymalnej liczby bibliotek w przebiegu.

Wybór typu nowotworu

Typ nowotworu musi być określony dla każdej próbki. Z wyjątkiem typów kontroli, dostępne typy nowotworów pochodzą z zainstalowanej biblioteki Knowledge Base (KB) i mogą ulec zmianie wraz z jej zaktualizowanymi wersjami.



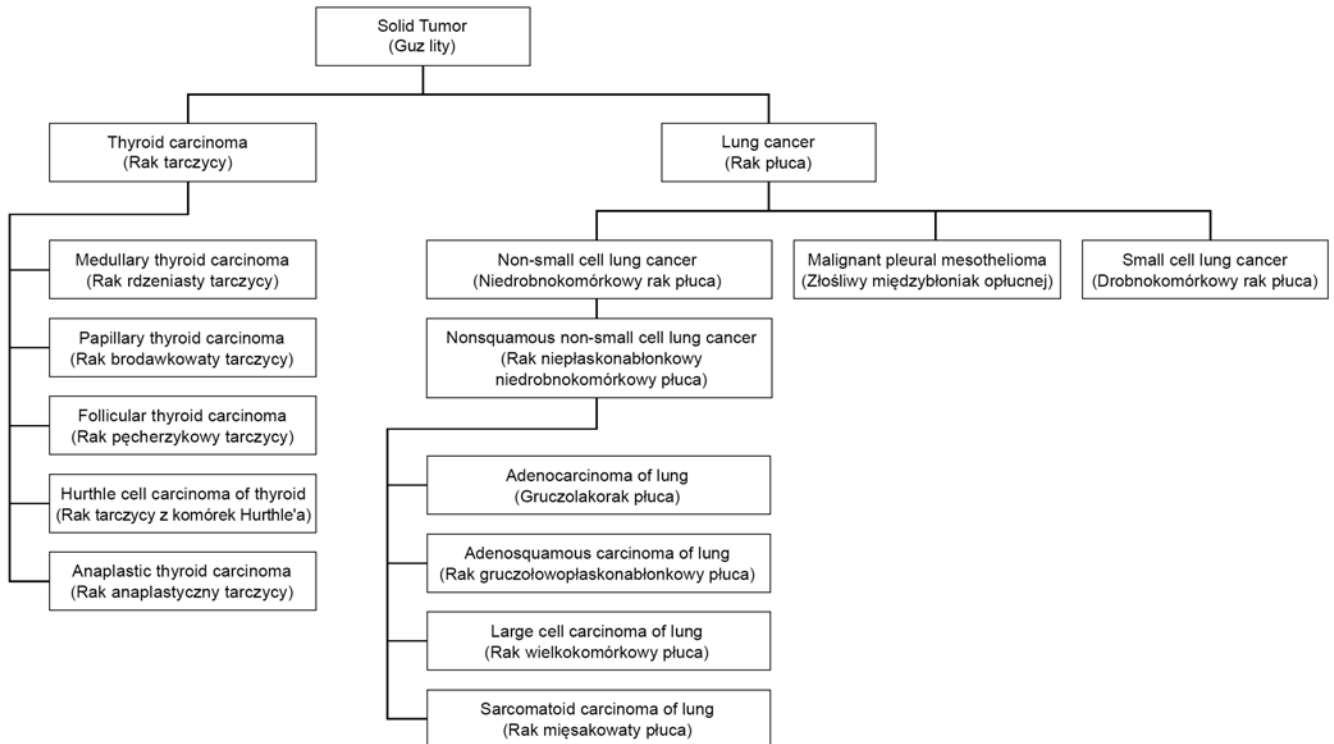
PRZESTROGA

Niewłaściwy wybór typu nowotworu może spowodować uzyskanie nieprawidłowych wyników. Aby uniknąć niepowodzenia analizy, należy rozwiązać wszelkie problemy wskazane przez ostrzeżenia, które pojawiają się podczas określania typów nowotworu.

Terminy dotyczące typu nowotworu są częścią hierarchicznej ontologii chorób w bibliotece KB, która jest skonstruowana jako zbiór relacji nadrzędnych i podrzędnych. Na przykład termin niedrobnokomórkowy rak płuca jest podrzędny w stosunku do raka płuca, ponieważ niedrobnokomórkowy rak płuca jest typem raka płuca.

Rysunek 3 przedstawia podzbiór przykładowej ontologii choroby, ukazując guz lity jako termin źródłowy oraz terminy powiązane z rakiem płuca i rakiem tarczycy (inne typy nowotworów nie są pokazane). Termin, który jest połączony przez relacje nadrzędności i podrzędności z terminami niższego poziomu, nazywany jest „przodkiem”. Powiązane terminy niższego poziomu nazywane są „potomkami” terminu „przodka”. Na przykład rak płuca jest „przodkiem” gruczolakoraka płuca i drobnokomórkowego raka płuca, a rak rdzeniasty tarczycy jest „potomkiem” zarówno raka tarczycy, jak i guza litego.

Rysunek 3 Podzbiór przykładowej ontologii choroby



Typ nowotworu wybrany dla próbki pacjenta wpływa na:

- ▶ To, które przewidziane zastosowania diagnostyki towarzyszącej będą oceniane w przypadku próbki. W przypadku tego zgłoszenia ocenione zostaną wyłącznie próbki pacjenta z typem nowotworu, który dokładnie odpowiada typowi nowotworu według przewidzianego zastosowania diagnostyki towarzyszącej lub wywodzi się z tego typu nowotworu.
- ▶ To, które warianty profilowania nowotworu zostaną zawarte w raporcie TSO Comprehensive.

Poniższe instrukcje opisują proces wyboru typu nowotworu na ekranie Create Run (Tworzenie przebiegu). Typ nowotworu można również ustawić, importując plik CSV zawierający typ nowotworu (patrz część *Importowanie próbek na stronie 6*).

- 1 Dostępne typy nowotworów można wyświetlić, dwukrotnie klikając komórkę Tumor Type (Typ nowotworu) w wierszu próbki. Dostępne typy nowotworów są wyświetlane na hierarchicznej liście w porządku alfabetycznym. Pole Tumor Type (Typ nowotworu) jest również wykorzystywane do wyznaczania typu kontroli dla próbek kontrolnych (patrz część *Próbki kontrolne na stronie 7*).
- 2 Odszukać i wybrać żądany typ nowotworu, korzystając z listy lub używając paska wyszukiwania u góry okna Tumor Type (Typ nowotworu).

Przygotowanie do etapów protokołu

- 1 Dokładnie odkazić obszary robocze środkiem czyszczącym hamującym działanie RNazy/DNazy.



PRZESTROGA

We wszystkich procedurach w przebiegu pracy wymagane jest środowisko wolne od RNazy/DNazy.

- 2 Skonfigurować programy termocyklera poprzedzające amplifikację. Patrz *Programowanie termocyklarów na stronie 4*.
- 3 Aby skonfigurować ultrasonikator, należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta.

- 4 W przypadku przetwarzania tylko próbek DNA przejść od razu do punktu *Fragmentacja gDNA na stronie 13*.
- 5 Wyjąć kontrole RNA z przechowywania.
- 6 Wyjąć próbki z odczynnikami z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 3 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (nr kat. 20031127)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
EPH3	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Denaturacja RNA i przyłączanie starterów
FSM	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Synteza pierwszej nici cDNA
RVT	Od -25°C do -15°C	Umieścić na lodzie.	Synteza pierwszej nici cDNA
SSM	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Synteza drugiej nici cDNA

Tabela 4 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (nr kat. 20031119)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
SPB (jasnozielona etykieta)	Od 2°C do 8°C	Doprowadzać do temperatury pokojowej w ciągu 30 minut.	Oczyszczanie cDNA
RSB	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Oczyszczanie cDNA

Denaturacja RNA i przyłączanie starterów

Przygotowanie

- 1 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ▶ EPH3 – odstawić.
 - ▶ FSM – wymieszać mieszadłem wirowym. Krótco wirować, a następnie pipetować w celu wymieszania. Sprawdzić pod kątem obecności osadów. Jeśli występują, pipetować do momentu ich rozpuszczenia.
 - ▶ RVT – krótco wirować, a następnie pipetować w celu wymieszania. Umieścić na lodzie.

UWAGA RVT jest roztworem lepkiem. Zawsze należy pipetować powoli, aby uniknąć tworzenia się pęcherzyków.

- 2 W próbce do mikrowirówki połączyć następujące objętości, aby przygotować mieszaninę wyjściową FSM+RVT.

Tabela 5 Mieszanina wyjściowa FSM+RVT

Składnik mieszaniny wyjściowej	3 próbki RNA (µl)	8 próbek RNA (µl)	16 próbek RNA (µl)	24 próbki RNA (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

W tej tabeli uwzględniono nadwyżkę objętości. Informacje o obliczeniach zawiera część „Postępowanie z odczynnikami” w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (nr dokumentu 200007789)*.

- 3 Pipetować dziesięć razy w celu wymieszania.
- 4 Mieszaninę wyjściową FSM+RVT umieścić na lodzie do czasu rozpoczęcia etapu *Synteza pierwszej nici cDNA na stronie 10*.

Procedura

- 1 Rozmrozić wyekstrahowane próbki RNA i kontrole RNA na lodzie. Przetwarzać kontrole RNA tak jak próbki do końca protokołu. W celu ilościowego oznaczenia próbek należy postępować zgodnie z instrukcjami zawartymi w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (nr dokumentu: 200007789)*.
- 2 Każdą próbkę RNA pipetować 10 razy w celu wymieszania.

- 3 Użyć wody pozbawionej RNazy/DNazy do przygotowania 40 ng każdej próbki RNA w końcowej objętości 8,5 µl (4,7 ng/µl).
W przypadku kontroli RNA należy użyć stężenia podanego na etykiecie próbki.
- 4 Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę PCR jako CF (cDNA Fragments, fragmenty cDNA).
- 5 Dodać 8,5 µl każdej próbki RNA do unikalnego dołka na płytce CF PCR.
- 6 Upewnić się, że układ płytki z próbkami oraz indeksy dla każdej próbki są zgodne z przebiegiem zaplanowanym w Lokalnym menedżerze przebiegu podczas konfiguracji przebiegu.
- 7 Odczynnik EPH3 wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 8 Dodać 8,5 µl odczynnika EPH3 do każdego dołka na próbkę.
- 9 Na płytkę CF PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.

**PRZESTROGA**

Upewnić się, że krawędzie i dołki są całkowicie uszczelnione, aby zapobiec parowaniu.

- 10 Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 1 minutę.
- 11 Wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
- 12 Umieścić w termocyklerze i uruchomić program LQ-RNA.
Patrz *Programowanie termocyklerów na stronie 4*.
- 13 Kiedy próbki osiągną temperaturę 4°C, należy zaczekać jedną minutę, a następnie natychmiast przejść do kolejnego etapu.

Synteza pierwszej nici cDNA

Procedura

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Wyjąć płytkę CF PCR z termocyklera.
- 2 Pipetować mieszaninę wyjściową FSM+RVT 5 razy w celu wymieszania.
- 3 Dodać 8 µl mieszaniny wyjściowej FSM+RVT do każdego dołka na próbkę.
- 4 Pipetować 5 razy w celu wymieszania.
- 5 Wyrzucić pozostałą mieszaninę wyjściową FSM+RVT.
- 6 Na płytkę CF PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnij krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
- 7 Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 1 minutę.
- 8 Wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
- 9 Umieścić w termocyklerze i uruchomić program 1stSS.
Patrz *Programowanie termocyklerów na stronie 4*.
- 10 Kiedy próbki osiągną temperaturę 4°C, należy natychmiast przejść do kolejnego etapu.
Próbki pierwszej nici można umieścić w temperaturze 4°C na maksymalnie 5 minut.

Synteza drugiej nici cDNA

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Przygotować wymieniony poniżej odczynnik.
 - ▶ SSM — odwrócić 10-krotnie w celu zmieszania. Krótko wirować.

Procedura

- 1 Wyjąć płytkę CF PCR z termocyklera.
- 2 Dodać 25 µl SSM do każdego dołka na próbkę.
- 3 Na płytkę CF PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.

Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.

- 4 Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 1 minutę.
- 5 Wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
- 6 Umieścić w termocyklerze i uruchomić program 2ndSS.
Patrz *Programowanie termocyklerów na stronie 4*.
- 7 Kiedy próbki osiągną temperaturę 4°C, należy zaczekać jedną minutę, a następnie natychmiast przejść do kolejnego etapu.

Oczyszczanie cDNA

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ▶ SPB — upewnić się, że kulki znajdują się w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
 - ▶ RSB — odstawić do wykorzystania podczas procedury.
- 2 Przygotować świeży roztwór 80% EtOH w probówce stożkowej 15 ml lub 50 ml.

Odczynnik	3 próbki	8 próbek	16 próbek	24 próbki
100% alkohol etylowy, czysty	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Woda pozbawiona RNazy/DNazy	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Świeży roztwór 80% EtOH wymieszać mieszadłem wirowym.
- 4 Oznakować nową 96-dołkową płytkę MIDI jako BIND1 (wiązanie cDNA).
- 5 Przykryć i odłożyć.
- 6 Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

- 1 Wyjąć płytkę CF PCR z termocyklera.
- 2 Odczynnik SPB mieszać mieszadłem wirowym przez 1 minutę, aby ponownie rozproszyc kulki w zawiesinie.
- 3 Niezwłocznie dodać 90 µl odczynnika SPB do każdego dołka na próbkę na płytce BIND1 MIDI.
W przypadku korzystania z korytka do dozowania odczynnika SPB należy uwzględnić współczynnik nadmiaru wynoszący 1,05, aby podczas rozdzielania na równe porcje mieć wystarczającą ilość materiału na próbkę. Po dodaniu odczynnika SPB do każdego dołka na próbkę wyrzucić jakikolwiek pozostały materiał.
- 4 Przenieść całą objętość (50 µl) każdej próbki z płytki CF PCR do odpowiedniego dołka na płytce BIND1 MIDI.
- 5 Wyrzucić pustą płytkę CF PCR.
- 6 Na płytkę BIND1 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 7 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 8 Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
- 9 Umieścić płytkę BIND1 MIDI na statywie magnetycznym na 5 minut.
- 10 Użyć pipety P200 ustawionej na objętość 200 µl, aby usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka na próbkę bez naruszania osadu kulek.

Płukanie

- 1 Przepłukać kulki zgodnie z poniższym opisem.
 - a Pozostawić na statywie magnetycznym i dodać 200 µl świeżego 80% roztworu EtOH do każdego dołka.
 - b Odczekać 30 sekund.
 - c Z każdego dołka odprowadzić cały nadsącz i wyrzucić go.
- 2 Przepłukać kulki po raz **drugą**.
- 3 Usunąć pozostałość roztworu EtOH z każdego dołka.
Użyć pipety P20 z mikrokońcówkami.
- 4 Wyrzucić niewykorzystany roztwór 80% EtOH.

Elucja

- 1 Zdjąć płytkę BIND1 MIDI ze statywu magnetycznego.
- 2 Wymieszać odczynnik RSB przez odwrócenie go lub użycie mieszadła wirowego.
- 3 Dodać 22 µl odczynnika RSB do każdego dołka na próbkę.
- 4 Na płytkę BIND1 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 5 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 6 Inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
- 7 Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
- 8 Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę MIDI jako PCF (Purified cDNA Fragments, oczyszczone fragmenty cDNA).
Jeśli użytkownik przerywa w **PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ** na stronie 12, należy użyć płytki PCR.
- 9 Przenieść 20 µl eluatu z każdego dołka na próbkę na płytce BIND1 MIDI do odpowiedniego dołka na płytce PCF.
- 10 Wyrzucić pustą płytkę BIND1 MIDI.
- 11 Dodać 30 µl odczynnika RSB do każdego dołka na próbkę na płytce PCF.
- 12 Pipetować 10 razy w celu wymieszania.
- 13 Nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą na płytkę PCF i umieścić ją na lodzie.
- 14 Odstawić odczynniki EPH3, FSM, RVT i SSM do przechowywania.
- 15 Jeśli użytkownik przetwarza próbki uzyskane wyłącznie z RNA (cDNA) i nie zatrzymuje się w punkcie bezpiecznego zatrzymania, należy przejść do etapu **Wykonanie naprawy końców i tworzenie ogona poli-A** na stronie 15.

PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku zatrzymania procedury należy wirować płytkę PCF PCR z prędkością 280 × g przez 1 minutę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 7 dni.

Data i godzina zatrzymania _____

Przygotowanie do etapów protokołu

- 1 Wyjąć kontrole DNA z przechowywania.
- 2 Wyjąć próbkę z odczynnikami z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 6 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (nr kat. 20031119)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
TEB	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Fragmentacja gDNA

Fragmentacja gDNA

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 W celu ilościowego oznaczenia próbek należy pamiętać o przestrzeganiu instrukcji zawartych w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (nr dokumentu: 200007789)*.
- 2 Przygotować wymieniony poniżej odczynnik.
 - ▶ TEB – odwrócić lub użyć mieszadła wirowego w celu wymieszania.

Procedura

Przygotowanie płytki

- 1 Wybrać jedną z trzech poniższych opcji przygotowania płytki.
 - ▶ **Opcja 1:** przetworzyć próbki gDNA jednocześnie z próbkami cDNA na płytce PCF MIDI.
 - a Oznakować płytkę PCF MIDI jako LP (Library Preparation, przygotowanie biblioteki).
 - b Umieścić na lodzie i odłożyć do wykorzystania, jak opisano w części *Przenoszenie pofragmentowanego DNA na stronie 14*.
 - ▶ **Opcja 2:** przetworzyć próbki gDNA jednocześnie z próbkami cDNA, płytka PCF PCR jest zamrożona.
 - a Rozmrozić płytkę PCF PCR do temperatury pokojowej.
 - b Wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
 - c Pipetować 10 razy w celu wymieszania.
 - d Oznakować nową 96-dołkową płytkę MIDI jako LP (Library Preparation, przygotowanie biblioteki).
 - e Przenieść całą objętość (50 µl) każdej próbki z płytki PCF PCR do odpowiedniego dołka na płytce LP MIDI.
 - f Wyrzucić płytkę PCF PCR.
 - g Nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą i umieścić na lodzie do momentu wykonania czynności opisanych w części *Przenoszenie pofragmentowanego DNA na stronie 14*.
 - ▶ **Opcja 3:** przetworzyć wyłącznie próbki gDNA.
 - a Oznakować nową 96-dołkową płytkę MIDI jako LP (Library Preparation, przygotowanie biblioteki).
 - b Jeśli użytkownik przerywa w *PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ na stronie 14*, należy użyć płytki PCR.
 - c Przykryć i odłożyć do wykorzystania jak opisano w punkcie *Przenoszenie pofragmentowanego DNA na stronie 14*.

Rozcieńczanie gDNA

- 1 Rozmrozić próbki gDNA i kontrole DNA w temperaturze pokojowej.
Przez pozostałą część protokołu przetwarzać kontrole DNA tak jak próbki.
- 2 Każdą próbkę gDNA pipetować 10 razy w celu wymieszania.
- 3 Krótco odwirować próbówkę, aby zebrać kropelki.
- 4 Wymieszać odczynnik TEB przez odwrócenie go lub użycie mieszadła wirowego.
- 5 Użyć odczynnika TEB do przygotowania 40 ng każdej próbki gDNA w końcowej objętości 52 µl (0,77 ng/µl).
Test wymaga minimalnego stężenia ekstraktu 3,33 ng/µl, aby z objętości 52 µl przeznaczyć co najmniej 40 µl na odczynnik TEB. W przypadku kontroli DNA należy użyć stężenia podanego na etykiecie próbówki. Aby zapobiec utracie próbki, do tego rozcieńczenia nie należy pipetować mniej niż 2 µl próbki.

Fragmentacja

- 1 Dodać 52 µl każdej próbki gDNA do oddzielnego dołka w probówce ultrasonikatora.
- 2 Zanotować orientację paska.
- 3 Przeprowadzić fragmentację gDNA za pomocą ultrasonikatora.

Przenoszenie pofragmentowanego DNA

- 1 Upewnić się, że układ płytki z próbkami oraz indeksy dla każdej próbki są zgodne z przebiegiem zaplanowanym w lokalnym menedżerze przebiegu podczas konfiguracji przebiegu.
- 2 Aby odzyskać próbkę, należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta ultrasonikatora. W przypadku niektórych typów probówek do ultrasonikatora konieczne może być odwirowanie w celu konsolidacji próbki w probówce.
- 3 W przypadku każdej próbki pofragmentowanego gDNA należy użyć pipety p20 z mikrokońcówkami, aby wykonać 3 transfery po 16,7 µl do pustego dołka na płytce LP MIDI.
- 4 Na płytkę LP MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.

PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku zatrzymania procedury nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą na płytkę LP PCR, a następnie wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę. Przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C do 7 dni.

Data i godzina zatrzymania _____

Przygotowanie do etapów protokołu

- 1 Przygotować wiaderko z lodem.
- 2 Wyjąć probówkę z odczynnikami z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 7 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (nr kat. 20031118)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
ERA1-A	Od -25°C do -15°C	Umieścić na lodzie.	Wykonanie naprawy końców i tworzenie ogona poli-A
ERA1-B	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Wykonanie naprawy końców i tworzenie ogona poli-A
ALB1	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Ligacja adapterów
LIG3	Od -25°C do -15°C	Umieścić na lodzie.	Ligacja adapterów
SUA1 (niebieska zatyczka)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Ligacja adapterów
UMI (biała zatyczka)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Ligacja adapterów
STL	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Ligacja adapterów
EPM	Od -25°C do -15°C	Umieścić na lodzie.	Indeksowanie PCR

Tabela 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (nr kat. 20031119)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
SPB (jasnozielona etykieta)	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej w ciągu 30 minut.	Oczyszczanie po ligacji
RSB	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Oczyszczanie po ligacji

Tabela 9 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (nr kat. 20031120)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
UPxx	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić odpowiednie próbki ze starterami do indeksowania do temperatury pokojowej.	Indeksowanie PCR

Tabela 10 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (nr kat. 20031126)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
CPxx	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić odpowiednie próbki ze starterami do indeksowania do temperatury pokojowej.	Indeksowanie PCR

Wykonanie naprawy końców i tworzenie ogona poli-A

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Podgrzać 2 inkubatory mikropróbek z wkładkami bloku grzejnego MIDI w następujący sposób.
 - ▶ Podgrzać inkubator mikropróbek do 30°C.
 - ▶ Podgrzać inkubator mikropróbek do 72°C.
- 2 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ▶ ERA1-A – krótko wirować, a następnie pipetować w celu wymieszania. Umieścić na lodzie.
 - ▶ ERA1-B – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować. Sprawdzić pod kątem obecności osadów. Jeśli występują, ogrzać próbkę do 37°C, a następnie pipetować i mieszać do momentu rozpuszczenia osadów.
- 3 Przygotować mieszaninę wyjściową ERA1 w próbce do mikrowirówki.

Tabela 11 Mieszanina wyjściowa ERA1

Składnik mieszaniny wyjściowej	3 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

W tej tabeli uwzględniono nadwyżkę objętości. Informacje o obliczeniach zawiera część „Postępowanie z odczynnikami” w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (nr dokumentu 200007789)*.

- 4 Powoli pipetować 10 razy, aby wymieszać, następnie krótko odwirować, a potem umieścić mieszaninę wyjściową ERA1 na lodzie.
- 5 Wybrać jedną z dwóch poniższych opcji przygotowania płytki.
 - ▶ **Opcja 1:** jeśli próbki znajdują się na płytce MIDI.
 - a Ponownie oznakować płytkę MIDI napisem LP2 (Library Preparation 2, przygotowanie biblioteki 2). Jeśli niektóre próbki znajdują się na oddzielnych płytkach MIDI, należy przenieść wszystkie próbki do oddzielnych dołków na tej samej płytce MIDI zgodnie z układem płytki.
 - ▶ **Opcja 2:** jeśli płytka jest zamrożona.
 - a Rozmrozić płytkę PCF PCR lub płytkę LP PCR do temperatury pokojowej.
 - b Wirować płytkę z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
 - c Pipetować 10 razy w celu wymieszania.
 - d Oznakować nową 96-dołkową płytkę MIDI napisem LP2 (Library Preparation 2, przygotowanie biblioteki 2).
 - e Przenieść całą objętość (50 µl) każdej próbki z płytki PCF PCR lub płytki LP PCR do odpowiedniego dołka na płytce LP2 MIDI.
 - f Wyrzucić płytkę PCF PCR lub płytkę LP PCR.

Procedura

- 1 Dodać 10 µl mieszaniny wyjściowej ERA1 do każdego dołka na próbkę na płytce LP2 MIDI.
- 2 Wyrzucić pozostałą mieszaninę wyjściową ERA1.
- 3 Na płytkę LP2 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
- 4 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 5 Inkubować w podgrzanym inkubatorze do mikropróbek w temperaturze 30°C przez 30 minut.
- 6 Natychmiast przenieść do drugiego podgrzanego inkubatora do mikropróbek i inkubować w temperaturze 72°C przez 20 minut.
- 7 Umieścić płytkę LP2 MIDI na lodzie na 5 minut.

Ligacja adapterów

Ten proces przeprowadza ligację adapterów do końców fragmentów cDNA i/lub gDNA.

Test TSO Comprehensive obejmuje adaptory SUA1 i UMI.

- ▶ Adapterów SUA1 należy używać z próbkami RNA.
- ▶ Adapterów UMI należy używać z próbkami DNA.

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ▶ ALB1 – mieszać mieszadłem wirowym przez co najmniej 10 sekund, a następnie krótko wirować.
 - ▶ LIG3 – krótko odwirować, a następnie pipetować w celu wymieszania. Umieścić na lodzie.
 - ▶ SUA1 – mieszać mieszadłem wirowym przez co najmniej 10 sekund, a następnie krótko wirować.
 - ▶ UMI – mieszać mieszadłem wirowym przez co najmniej 10 sekund, a następnie krótko wirować.
 - ▶ STL – odstawić do wykorzystania podczas procedury.

Procedura

- 1 Wyjąć płytkę LP2 MIDI z lodu.
- 2 Dodać 60 µl odczynnika ALB1 do każdego dołka na próbkę na płytce LP2 MIDI, pamiętając, aby pipetować powoli.
- 3 Dodać 5 µl odczynnika LIG3 do każdego dołka na próbkę.
- 4 Dodać adaptory.
Nie łączyć różnych rodzajów adapterów.
 - **Dołki na próbki RNA** – 10 µl odczynnika SUA1 (niebieska zatyczka) do każdej próbki uzyskanej z RNA.
 - **Dołki na próbki DNA** – 10 µl odczynnika UMI (biała zatyczka) do każdej próbki uzyskanej z DNA.
- 5 Na płytkę LP2 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 6 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 7 Inkubować w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
- 8 Odczynnik STL wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 9 Dodać 5 µl odczynnika STL do każdego dołka na próbkę na płytce LP2 MIDI.
- 10 Na płytkę LP2 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
- 11 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.

Oczyszczanie po ligacji

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ▶ SPB — upewnić się, że kulki znajdują się w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
 - ▶ RSB — odstawić do wykorzystania podczas procedury.
- 2 Przygotować świeży roztwór 80% EtOH w probówce stożkowej 15 ml lub 50 ml.

Odczynnik	3 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
100% alkohol etylowy, czysty	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Woda pozbawiona RNazy/DNazy	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Świeży roztwór 80% EtOH wymieszać mieszadłem wirowym.
- 4 Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

- 1 Odczynnik SPB mieszać mieszadłem wirowym przez 1 minutę, aby ponownie rozprowadzić kulki w zawieszynie.
- 2 Niezwłocznie dodać 112 µl odczynnika SPB do każdego dołka na próbkę na płytce LP2 MIDI.
W przypadku korzystania z korytka do dozowania odczynnika SPB należy uwzględnić współczynnik nadmiaru wynoszący 1,05, aby podczas rozdzielania na równe porcje mieć wystarczającą ilość materiału na próbkę. Po dodaniu odczynnika SPB do każdego dołka na próbkę wyrzucić jakikolwiek pozostały materiał.
- 3 Na płytkę LP2 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 4 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 5 Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
- 6 Umieścić płytkę LP2 MIDI na statywie magnetycznym na 10 minut.
- 7 Użyć pipety P200 ustawionej na objętość 200 µl, aby usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka na próbkę bez naruszania osadu kulek.

Płukanie

- 1 Przepłukać kulki zgodnie z poniższym opisem.
 - a Pozostawić na statywie magnetycznym i do każdego dołka na próbkę dodać 200 µl świeżego 80% roztworu EtOH.
 - b Odczekać 30 sekund.
 - c Usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka bez naruszania osadu nośników.
- 2 Przepłukać nośniki po raz **drugi**.
- 3 Usunąć pozostałość roztworu EtOH z każdego dołka.
Użyć pipety P20 z mikrokońcówkami.
- 4 Wyrzucić niewykorzystany roztwór 80% EtOH.

Elucja

- 1 Usunąć płytkę LP2 MIDI ze statywu magnetycznego.
- 2 Wymieszać odczynnik RSB przez odwrócenie go lub użycie mieszadła wirowego.
- 3 Dodać 27,5 µl odczynnika RSB do każdego dołka na próbkę.
- 4 Na płytkę LP2 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 5 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 6 Inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
- 7 Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
- 8 Oznakować nową 96-dołkową płytkę PCR jako LS (Library Samples, próbki bibliotek).

- 9 Przenieść 25 µl każdego eluatu z płytki LP2 MIDI do odpowiedniego dołka na płytce LS PCR.
- 10 Wyrzucić pustą płytkę LP2 MIDI.
- 11 Na płytkę LS PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.

Indeksowanie PCR

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ▶ EPM – umieścić na lodzie.
 - ▶ UPxx – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować. UPxx to starter do indeksowania wybrany podczas konfiguracji przebiegu na ekranie Create Run (Utwórz przebieg) w Lokalnym menedżerze przebiegu.
 - ▶ CPxx – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować. CPxx to starter do indeksowania wybrany podczas konfiguracji przebiegu na ekranie Create Run (Utwórz przebieg) w Lokalnym menedżerze przebiegu.
- 2 Upewnić się, że indeksy dla każdej próbki są zgodne z przebiegiem zaplanowanym w Lokalnym menedżerze przebiegu podczas konfiguracji przebiegu. Należy pamiętać o przestrzeganiu instrukcji dotyczących wyboru indeksów w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (nr dokumentu 200007789)*.



PRZESTROGA

Niezgodności między próbkami i starterami do indeksowania powodują zgłaszanie nieprawidłowych wyników z powodu utraty identyfikacji próbki dodatniej.

Procedura

- 1 Dodać 5 µl odpowiedniego startera do indeksowania (UPxx lub CPxx) do odpowiedniego dołka na próbkę na płytce LS PCR zgodnie z indeksami wybranymi podczas konfiguracji przebiegu na ekranie Create Run (Tworzenie przebiegu) w Lokalnym menedżerze przebiegu.



PRZESTROGA

W danym momencie należy obsługiwać i otwierać tylko jedną probówkę ze starterem do indeksowania. Każdą probówkę ze starterem do indeksowania należy ponownie zamknąć bezpośrednio po użyciu. Nie łączyć starterów do indeksowania.

- 2 Odczynnik EPM mieszać mieszadłem wirowym przez 5 sekund, a następnie krótko wirować.
- 3 Dodać 20 µl odczynnika EPM do każdego dołka na próbkę.
- 4 Na płytkę LS PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
- 5 Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 1 minutę.
- 6 Odstawić odczynniki stosowane przed amplifikacją do przechowywania.



PRZESTROGA

Wszystkie kolejne czynności należy wykonać w obszarze po amplifikacji, aby zapobiec przeniesieniu produktu amplifikacji.

- 7 Płytkę LS PCR wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
- 8 Umieścić na wstępnie zaprogramowanym termocyklerze przeznaczonym do etapów po amplifikacji i uruchomić program I-PCR.
Patrz *Programowanie termocykleriów na stronie 4*.

UWAGA W przypadku kontynuowania procedury od etapu *Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji na stronie 19* należy przestrzegać instrukcji dotyczących rozmrażania odczynników podanych w części „Przygotowanie do etapów protokołu”.

- 9 Po zakończeniu programu I-PCR odwirować płytkę LS PCR z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
- 10 Ponownie oznakować płytkę jako ALS (Amplified Library Samples, biblioteki próbek po amplifikacji).

PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku przerwania procedury płytkę ALS PCR należy przechowywać w temperaturze od –25°C do –15°C nie dłużej niż przez 30 dni.

Data i godzina zatrzymania _____

Przygotowanie do etapów protokołu

- 1 Upewnić się, że ustawione są programy termocyklera po amplifikacji. Patrz *Programowanie termocyklerów na stronie 4*.
- 2 Wyjąć probówkę z odczynnikami z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 12 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (nr kat. 20031123)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
TCB1	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji

Tabela 13 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (nr kat. 20031121)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
TCA1	Od –25°C do –15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji

Tabela 14 TruSight Oncology Comp Content Set Box (nr kat. 20031122)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
OPR1 (czerwona zatyczka)	Od –25°C do –15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji
OPD2 (biała zatyczka)	Od –25°C do –15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji

Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ▶ TCB1 – ogrzewać probówkę w temperaturze 37°C przez 5 minut. Mieszać mieszadłem wirowym przez 10 sekund, a następnie krótko wirować.
 - ▶ TCA1 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
 - ▶ OPR1 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
 - ▶ OPD2 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 2 Jeśli płytka ALS PCR była przechowywana, należy rozmrozić ją do temperatury pokojowej, a następnie wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę. Następnie pipetować w celu wymieszania.
- 3 Oznakować nową 96-dołkową płytkę PCR jako HYB1 (Hybridization 1, hybrydyzacja 1).

Procedura

- 1 Przenieść 20 µl każdej biblioteki cDNA i/lub gDNA z płytki ALS PCR do odpowiedniego dołka na płytce HYB1 PCR.

- 2 Nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą na płytkę ALS PCR i odłożyć ją. Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 3 Sprawdzić odczynnik TCB1 pod kątem obecności osadów. Jeśli występują, ponownie ogrzać probówkę i mieszać mieszadłem wirowym, aż kryształy się rozpuszczą.
- 4 Dodać 15 µl odczynnika TCB1 do każdego dołka biblioteki na płytce HYB1 PCR.
- 5 Dodać 10 µl odczynnika TCA1 do każdego dołka biblioteki na płytce HYB1 PCR.
- 6 Dodać sondy.
 - Nie** łączyć ze sobą różnych rodzajów sond.
 - ▶ **Dołki na bibliotekę RNA** – 5 µl odczynnika OPR1 do każdej biblioteki uzyskanej z RNA.
 - ▶ **Dołki na bibliotekę DNA** – 5 µl odczynnika OPD2 do każdej biblioteki uzyskanej z DNA.
- 7 Na płytkę HYB1 PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.

**PRZESTROGA**

Upewnić się, że krawędzie i dołki są całkowicie uszczelnione, aby zapobiec parowaniu.

- 8 Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 2 minuty.
- 9 Umieścić w termocyklerze i uruchomić program HYB1.
 - Patrz *Programowanie termocyklerów na stronie 4.*
- 10 Hybrydyzować w temperaturze 57°C przez co najmniej 8 godzin i nie dłużej niż 24 godziny.
- 11 Odstawić odczynniki do hybrydyzacji do przechowywania.
- 12 Płytkę ALS PCR przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C do 30 dni.

Przygotowanie do etapów protokołu

- 1 Na początku 2. dnia wyjąć probówkę z odczynnikiem z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (nr kat. 20031123)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
SMB (ciemnoniebieska etykieta)	Od 2°C do 8°C	Doprowadzać do temperatury pokojowej w ciągu 30 minut.	Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych Drugie wychwycenie sekwencji docelowych
ET2	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych Drugie wychwycenie sekwencji docelowych
HP3	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych Drugie wychwycenie sekwencji docelowych Normalizacja bibliotek
TCB1	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie drugiej hybrydyzacji
RSB	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Drugie wychwycenie sekwencji docelowych Oczyszczanie amplifikowanej biblioteki wzbogaconej

Tabela 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (nr kat. 20031121)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
EE2	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych Drugie wychwycenie sekwencji docelowych Normalizacja bibliotek
EEW	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych
TCA1	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie drugiej hybrydyzacji

Tabela 17 TruSight Oncology Comp Content Set Box (nr kat. 20031122)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
OPR1 (czerwona zatyczka)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie drugiej hybrydyzacji
OPD2 (biała zatyczka)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie drugiej hybrydyzacji

Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Podgrzać inkubator mikropróbek z wkładką bloku grzejnego MIDI do temperatury 57°C.
- 2 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ▶ EEW – mieszać mieszadłem wirowym przez 1 minutę.
 - ▶ EE2 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
 - ▶ HP3 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
 - ▶ SMB – upewnić się, że kulki znajdują się w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
 - ▶ Należy pamiętać, że do tej procedury należy użyć odczynnika **SMB**, a nie SPB.
 - ▶ ET2 – odstawić do wykorzystania podczas procedury.
- 3 Przygotować świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 w probówce do mikrowirówki.

Tabela 18 Mieszanina elucyjna EE2+HP3 do pierwszego wychwytywania sekwencji docelowych

Składnik mieszaniny elucyjnej	3 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

W tej tabeli uwzględniono nadwyżkę objętości. Informacje o obliczeniach zawiera część „Postępowanie z odczynniki” w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (nr dokumentu 200007789)*.

- 4 Mieszaninę elucyjną EE2+HP3 mieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować. Odstawić do wykorzystania na etapie *Elucja*.
- 5 Oznakować nową 96-dołkową płytkę MIDI jako CAP1 (Capture 1, wychwytywanie 1).
- 6 Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

- 1 Wyjąć płytkę HYB1 PCR z termocyklera.
- 2 Wirować płytkę HYB1 PCR z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
- 3 Odczynnik SMB mieszać mieszadłem wirowym przez 1 minutę, aby ponownie rozprowadzić kulki w zawieszynie.

- 4 Niezwłocznie dodać 150 µl odczynnika SMB do każdego dołka na bibliotekę na płytce CAP1 MIDI. W przypadku korzystania z korytka do dozowania odczynnika SMB należy uwzględnić współczynnik nadmiaru wynoszący 1,15, aby podczas rozdzielania na równe porcje mieć wystarczającą ilość materiału na próbkę. Po dodaniu odczynnika SMB do każdego dołka na próbkę wyrzucić jakikolwiek pozostały materiał.
- 5 Ustawić pipetę na 50 µl i przenieść całą objętość każdej biblioteki z płytki HYB1 PCR do odpowiedniego dołka na płytce CAP1 MIDI.
- 6 Wyrzucić pustą płytkę HYB1 PCR.
- 7 Na płytkę CAP1 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
- 8 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 9 Inkubować w podgrzanym inkubatorze do mikropróbek w temperaturze 57°C przez 25 minut.
- 10 Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
- 11 Pozostawiając płytkę CAP1 MIDI na statywie magnetycznym, za pomocą pipety P200 ustawionej na objętość 200 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz bez naruszania osadu kulek.

**PRZESTROGA**

Przejsz natychmiast do następnej czynności (*Płukanie*). Nie dopuszczać do tego, aby osad kulek pozostawał w bezruchu przez dłuższy czas bez obecności płynu.

Płukanie

- 1 Przeplukać kulki zgodnie z poniższym opisem.
 - a Zdjąć płytkę CAP1 MIDI ze statywu magnetycznego.
 - b Dodać 200 µl odczynnika EEW do każdego dołka.
 - c Ustawić objętość pipety na 150 µl i pipetować co najmniej 10 razy w celu wymieszania. Upewnić się, że kulki zostały ponownie rozprowadzone w zawiesinie.

**PRZESTROGA**

Upewnić się, że nie jest obecny żaden osad kulek, delikatnie zasysając cały roztwór nośnika z dołka do końcówki. Następnie obejrzeć dno każdego dołka pod kątem osadu. Podczas etapów płukania skierować końcówkę pipety w stronę osadu nośnika, aby go poruszyć. Upewnić się, że cały osad kulek został w całości przeniesiony do roztworu. Roztwór powinien mieć ciemnobrązowy kolor i jednorodną konsystencję.

- d Na płytkę CAP1 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
 - e Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
 - f Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 4 minuty.
 - g Inkubować w inkubatorze do mikropróbek w temperaturze 57°C przez 5 minut.
 - h Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
 - i Pozostawić na statywie magnetycznym oraz usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka bez naruszania osadu kulek.
- 2 Przeplukać kulki po raz *drugi*.
 - 3 Przeplukać kulki po raz *trzeci*.
 - 4 Usunąć pozostałości nadsącza z każdego dołka. Użyć pipety P20 z mikrokończówkami.

Elucja

- 1 Zdjąć płytkę CAP1 MIDI ze statywu magnetycznego.
- 2 Świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 mieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 3 Ostrożnie dodać 17 µl mieszaniny elucyjnej EE2+HP3 do każdego dołka na bibliotekę na płytce CAP1 MIDI.
- 4 Wyrzucić pozostałą mieszaninę elucyjną EE2+HP3.

- 5 Na płytkę CAP1 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 6 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 7 Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
- 8 Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę PCR jako ELU1 (Elution 1, elucja 1).
- 9 Odczynnik ET2 wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 10 Dodać 5 µl odczynnika ET2 do każdego odpowiedniego dołka na bibliotekę na nowej płytce ELU1 PCR.
- 11 Ostrożnie przenieść 15 µl eluatu z każdego dołka na bibliotekę na płytce CAP1 MIDI do odpowiedniego dołka na płytce ELU1 PCR.
- 12 Wyrzucić pustą płytkę CAP1 MIDI.
- 13 Na płytkę ELU1 PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
- 14 Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
- 15 Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 2 minuty.
- 16 Odstawić odczynnik EEW do przechowywania.

Przygotowanie drugiej hybrydyzacji

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ▶ TCB1 – ogrzewać probówkę w temperaturze 37°C przez 5 minut. Mieszać mieszadłem wirowym przez 10 sekund, a następnie krótko wirować.
 - ▶ TCA1 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
 - ▶ OPR1 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
 - ▶ OPD2 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.

Procedura

- 1 Sprawdzić odczynnik TCB1 pod kątem obecności osadów. Jeśli występują, ponownie ogrzać probówkę i mieszać mieszadłem wirowym, aż kryształy się rozpuszczą.
- 2 Dodać 15 µl odczynnika TCB1 do każdego dołka biblioteki na płytce ELU1 PCR.
- 3 Dodać 10 µl odczynnika TCA1 do każdego dołka na bibliotekę.
- 4 Dodać sondy.

Nie łączyć ze sobą różnych rodzajów sond.

 - ▶ **Dołki na bibliotekę RNA** – 5 µl odczynnika OPR1 do każdej biblioteki uzyskanej z RNA.
 - ▶ **Dołki na bibliotekę DNA** – 5 µl odczynnika OPD2 do każdej biblioteki uzyskanej z DNA.
- 5 Na płytkę ELU1 PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
- 6 Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 2 minuty.
- 7 Umieścić w termocyklerze i uruchomić program HYB2.

Patrz *Programowanie termocyklerów na stronie 4*.
- 8 Hybrydyzować w temperaturze 57°C przez co najmniej 1,5 godziny i nie dłużej niż 4 godziny.
- 9 Odstawić odczynniki TCA1, TCB1, OPR1 i OPD2 do przechowywania.

Drugie wychwycenie sekwencji docelowych

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Podgrzać inkubator mikropróbek z wkładką bloku grzejącego MIDI do temperatury 57°C.
- 2 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ▶ EE2 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.

- ▶ HP3 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
 - ▶ SMB – upewnić się, że kulki znajdują się w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
 - ▶ Należy pamiętać, że do tej procedury należy użyć odczynnika **SMB**, a nie SPB.
 - ▶ RSB – odstawić do wykorzystania podczas procedury.
 - ▶ ET2 – odstawić do wykorzystania podczas procedury.
- 3 Przygotować świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 w próbce do mikrowirówki.

Tabela 19 Mieszanina elucyjna EE2+HP3 do drugiego wychwytywania celów

Składnik mieszaniny elucyjnej	3 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

W tej tabeli uwzględniono nadwyżkę objętości. Informacje o obliczeniach zawiera część „Postępowanie z odczynnikami” w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (nr dokumentu 200007789)*.

- 4 Wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować. Odstawić do wykorzystania na etapie *Elucja*.
- 5 Oznakować nową 96-dołkową płytkę MIDI napisem CAP2 (Capture 2, wychwytywanie 2).
- 6 Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

- 1 Wyjąć płytkę ELU1 PCR z termocyklera.
- 2 Wirować płytkę ELU1 PCR z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
- 3 Odczynnik SMB mieszać mieszadłem wirowym przez 1 minutę, aby ponownie rozprowadzić kulki w zawieszynie.
- 4 Niezwłocznie dodać 150 µl odczynnika SMB do każdego dołka na bibliotekę na płytce CAP2 MIDI.
W przypadku korzystania z korytka do dozowania odczynnika SMB należy uwzględnić współczynnik nadmiaru wynoszący 1,15, aby podczas rozdzielania na równe porcje mieć wystarczającą ilość materiału na próbkę. Po dodaniu odczynnika SMB do każdego dołka na próbkę wyrzucić jakikolwiek pozostały materiał.
- 5 Ustawić pipetę na objętość 50 µl i przenieść całą objętość każdej biblioteki z płytki ELU1 PCR do odpowiedniego dołka na płytce CAP2 MIDI.
- 6 Wyrzucić pustą płytkę ELU1 PCR.
- 7 Na płytkę CAP2 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
- 8 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 9 Inkubować w inkubatorze do mikropróbek w temperaturze 57°C przez 25 minut.

UWAGA W przypadku przejścia do części *Amplifikacja biblioteki wzbogaconej na stronie 26* należy przestrzegać instrukcji dotyczących rozmrażania odczynników podanych w części „Przygotowanie do etapów protokołu”.

- 10 Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
- 11 Pozostawić płytkę CAP2 MIDI na statywie magnetycznym i za pomocą pipety P200 ustawionej na objętość 200 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka na bibliotekę bez naruszania osadu kulek.



PRZESTROGA

Przejdź natychmiast do następnej czynności (*Płukanie*). Nie dopuszczać do tego, aby osad kulek pozostawał w bezruchu przez dłuższy czas bez obecności płynu.

Płukanie

- 1 Zdjąć płytkę CAP2 MIDI ze statywu magnetycznego.
- 2 Wymieszać odczynnik RSB przez odwrócenie go lub użycie mieszadła wirowego.

- 3 Dodać 200 µl odczynnika RSB do każdego dołka.
- 4 Na płytkę CAP2 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 5 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 4 minuty.
- 6 Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
- 7 Pozostawić płytkę CAP2 MIDI na statywie magnetycznym oraz usunąć i odrzucić cały nadsącz bez naruszania osadu kulek.
- 8 Usunąć pozostałości nadsączu z każdego dołka. Użyć pipety P20 z mikrokońcówkami.

Elucja

- 1 Zdjąć płytkę CAP2 MIDI ze statywu magnetycznego.
- 2 Świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 mieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 3 Dodać 22 µl mieszaniny elucyjnej EE2+HP3 do każdego dołka biblioteki na płytce CAP2 MIDI.
- 4 Wyrzucić pozostałą mieszaninę elucyjną EE2+HP3.
- 5 Na płytkę CAP2 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 6 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 7 Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
- 8 Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę PCR jako ELU2 (Elution 2, elucja 2).
- 9 Odczynnik ET2 wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 10 Dodać 5 µl odczynnika ET2 do każdego odpowiedniego dołka na bibliotekę na nowej płytce ELU2 PCR.
- 11 Ostrożnie przenieść 20 µl eluatu z każdego dołka na bibliotekę na płytce CAP2 MIDI do odpowiedniego dołka na płytce ELU2 PCR.
- 12 Wyrzucić pustą płytkę CAP2 MIDI.
- 13 Na płytkę ELU2 PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
- 14 Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 2 minuty.
- 15 Odstawić odczynniki SMB, EE2, HP3 i ET2 do przechowywania.

PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku zatrzymania procedury należy odwirować płytkę ELU2 PCR z prędkością 280 × g przez 1 minutę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 7 dni. Odstawić RSB do przechowywania.

Data i godzina zatrzymania _____

Przygotowanie do etapów protokołu

- 1 Przygotować wiaderko z lodem.
- 2 Wyjąć probówkę z odczynnikiem z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (nr kat. 20031121)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
PPC3	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Amplifikacja biblioteki wzbogaconej
EPM	Od -25°C do -15°C	Umieścić na lodzie.	Amplifikacja biblioteki wzbogaconej

Tabela 21 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (nr kat. 20031123)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
SPB (jasnozielona etykieta)	Od 2°C do 8°C	Doprowadzać do temperatury pokojowej w ciągu 30 minut.	Oczyszczanie amplifikowanej biblioteki wzbogaconej
RSB	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Oczyszczanie amplifikowanej biblioteki wzbogaconej Przygotowanie do sekwencjonowania

Amplifikacja biblioteki wzbogaconej

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Jeśli płytka ELU2 była przechowywana, należy rozmrozić ją do temperatury pokojowej, a następnie odwirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę.

Procedura

- 1 Odczynnik PPC3 wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 2 Dodać 5 µl odczynnika PPC3 do każdego dołka na bibliotekę na płytce ELU2 PCR.
- 3 Odczynnik EPM mieszać mieszadłem wirowym przez 5 sekund, a następnie krótko wirować.
- 4 Dodać 20 µl odczynnika EPM do każdego dołka na bibliotekę.
- 5 Na płytkę ELU2 PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
- 6 Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 2 minuty.
- 7 Umieścić w termocyklerze i uruchomić program EL-PCR.
Patrz *Programowanie termocyklerów na stronie 4*.

UWAGA W przypadku kontynuowania procedury od etapu *Normalizacja bibliotek na stronie 28* należy przestrzegać instrukcji dotyczących rozmrażania podanych w części „Przygotowanie do etapów protokołu”.

- 8 Odłożyć odczynniki PPC3 i EPM do przechowywania.

Oczyszczanie amplifikowanej biblioteki wzbogaconej

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ▶ SPB — upewnić się, że kulki znajdują się w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
 - ▶ Należy pamiętać, że do tej procedury należy użyć odczynnika **SPB**, a nie **SMB**.
 - ▶ RSB — odstawić do wykorzystania podczas procedury.
- 2 Przygotować świeży roztwór 80% etanolu w probówce stożkowej 15 ml lub 50 ml.

Odczynnik	3 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
100% alkohol etylowy, czysty	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Woda pozbawiona RNazy/DNazy	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Świeży roztwór 80% EtOH wymieszać mieszadłem wirowym.
- 4 Oznakować nową 96-dołkową płytkę MIDI jako BIND2 (Clean Up Binding, wiązanie po oczyszczeniu).
- 5 Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

- 1 Wyjąć płytkę ELU2 PCR z termocyklera.
- 2 Odwirować płytkę ELU2 PCR z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
- 3 Odczynnik SPB mieszać mieszadłem wirowym przez 1 minutę, aby ponownie rozprowadzić kulki w zawieszynie.
- 4 Niezwłocznie dodać 110 µl odczynnika SPB do każdego dołka na bibliotekę na płytce BIND2 MIDI.
- 5 Przenieść 50 µl każdej biblioteki z płytki ELU2 PCR do odpowiedniego dołka na płytce BIND2 MIDI.
- 6 Wyrzucić pustą płytkę ELU2 PCR.
- 7 Na płytkę BIND2 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 8 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 9 Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
- 10 Umieścić płytkę na statywie magnetycznym na 5 minut.
- 11 Użyć pipety P200 ustawionej na objętość 200 µl, aby usunąć i odrzucić **cały** nadsącz z każdego dołka na bibliotekę bez naruszania osadu kulek.

Płukanie

- 1 Przepłukać kulki zgodnie z poniższym opisem.
 - a Pozostawić na statywie magnetycznym i dodać 200 µl świeżego 80% roztworu EtOH do każdego dołka.
 - b Odczekać 30 sekund.
 - c Usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka na próbkę bez naruszania osadu kulek.
- 2 Przepłukać kulki po raz **drugi**.
- 3 Usunąć pozostałość roztworu EtOH z każdego dołka.
Użyć pipety P20 z mikrokońcówkami.
- 4 Wyrzucić niewykorzystany roztwór 80% EtOH.

Elucja

- 1 Usunąć płytkę BIND2 MIDI ze statywu magnetycznego.
- 2 Wymieszać odczynnik RSB przez odwrócenie go lub użycie mieszadła wirowego.
- 3 Dodać 32 µl odczynnika RSB do każdego dołka na bibliotekę.
- 4 Na płytkę BIND2 MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 5 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 6 Inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
- 7 Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
- 8 Oznakować nową 96-dołkową płytkę PCR jako PL (Purified Libraries, biblioteki oczyszczone).
- 9 Przenieść 30 µl każdego eluatu z płytki BIND2 MIDI do odpowiedniego dołka na płytce PL PCR.
- 10 Wyrzucić pustą płytkę BIND2 MIDI.
- 11 Na płytkę PL PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
- 12 Odstawić odczynnik SPB do przechowywania.

PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku zatrzymania procedury należy odwirować płytkę PL PCR z prędkością 280 × g przez 1 minutę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 30 dni. Odstawić RSB do przechowywania.

Data i godzina zatrzymania _____

Przygotowanie do etapów protokołu

- 1 Wyjąć probówkę z odczynnikami z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 22 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (nr kat. 20031121)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
LNA1	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Normalizacja bibliotek
EE2	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Normalizacja bibliotek

Tabela 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (nr kat. 20031123)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
LNB1	Od 2°C do 8°C	Doprowadzać do temperatury pokojowej w ciągu 30 minut.	Normalizacja bibliotek
HP3	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Normalizacja bibliotek Przygotowanie do sekwencjonowania
LNW1	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Normalizacja bibliotek
LNS1	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Normalizacja bibliotek

- 2 W przypadku kontynuowania procedury tego samego dnia od etapu *Przygotowanie do sekwencjonowania na stronie 31* należy przestrzegać instrukcji dotyczących rozmrażania podanych w części „Przygotowanie do etapów protokołu”.

Normalizacja bibliotek

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
- ▶ LNB1 – upewnić się, że nośniki znajdują się w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
 - ▶ LNA1 – wymieszać mieszadłem wirowym.
 - ▶ EE2 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
 - ▶ HP3 – wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
 - ▶ LNW1 – wymieszać mieszadłem wirowym. Odstawić do wykorzystania podczas procedury.
 - ▶ LNS1 – wymieszać mieszadłem wirowym. Odstawić do wykorzystania podczas procedury.
- 2 Odczynnik LNB1 mieszać mieszadłem wirowym przez 1 minutę, aby ponownie rozprowadzić nośniki w zawieszynie. Odwrócić probówkę z LNB1, aby upewnić się, że wszystkie nośniki zostały ponownie rozprowadzone w zawieszynie.
- 3 Za pomocą pipety P1000 ustawionej na objętość 800 µl pipetować odczynnik LNB1 w górę i w dół 10 razy w celu ponownego rozprowadzenia w zawieszynie.
- 4 Natychmiast przygotować świeżą mieszaninę wyjściową LNA1+LNB1 w próbówce stożkowej.



PRZESTROGA

Całkowicie ponownie rozprowadzić w zawieszynie osad nośników LNB1 z dna próbówki, aby zapobiec niejednorodnej gęstości klastra.

Tabela 24 Mieszanina wyjściowa LNA1+LNB1

Składnik mieszaniny wyjściowej	3 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
LNA1	229 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

W tej tabeli uwzględniono nadwyżkę objętości. Informacje o obliczeniach zawiera część „Postępowanie z odczynnikami” w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (nr dokumentu 200007789)*.

- 5 Mieszaninę wyjściową LNA1+LNB1 wymieszać mieszadłem wirowym. Odstawić do etapu *Wiązanie*.
- 6 Przygotować świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 w probówce do mikrowirówki.

Tabela 25 Mieszanina elucyjna EE2+HP3 do normalizacji bibliotek

Składnik mieszaniny elucyjnej	3 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

W tej tabeli uwzględniono nadwyżkę objętości. Informacje o obliczeniach zawiera część „Postępowanie z odczynnikami” w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (nr dokumentu 200007789)*.

- 7 Świeżą mieszaninę elucyjną mieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować. Odstawić do wykorzystania na etapie *Elucja*.
- 8 Jeśli płytka PL PCR była przechowywana, należy rozmrozić ją do temperatury pokojowej, wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę, a następnie pipetować w celu wymieszania.
- 9 Oznakować nową 96-dołkową płytkę MIDI BBN (Bead Based Normalization, normalizacja w oparciu o nośniki).
- 10 Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

- 1 Mieszaninę wyjściową LNA1+LNB1 wymieszać mieszadłem wirowym.
- 2 Niezwłocznie dodać 45 µl mieszaniny wyjściowej LNA1+LNB1 do każdego dołka na bibliotekę na płytce BBN MIDI.
- 3 Wyrzucić pozostałą mieszaninę wyjściową LNA1+LNB1.
- 4 Dodać 20 µl każdej biblioteki z płytki PL PCR do odpowiedniego dołka na płytce BBN MIDI.
- 5 Na płytkę BBN MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 6 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 30 minut.
- 7 Na płytkę PL PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą i odłożyć do przechowywania.
- 8 Umieścić płytkę na statywie magnetycznym na 2 minuty.
- 9 Pozostawić na statywie magnetycznym i za pomocą pipety P200 usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka bez naruszania osadu kulek.

Płukanie

- 1 Przepłukać kulki zgodnie z poniższym opisem.
 - a Zdjąć płytkę BBN MIDI ze statywu magnetycznego.
 - b Dodać 45 µl odczynnika LNW1 do każdego dołka na bibliotekę.
 - c Na płytkę BBN MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
 - d Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
 - e Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 5 minut.
 - f Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
 - g Usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka bez naruszania osadu nośników.
- 2 Przepłukać nośniki po raz *drugi*.
- 3 Usunąć pozostałości nadsącza z każdego dołka. Użyć pipety P20 z mikrokońcówkami.

Elucja

- 1 Zdjąć płytkę BBN MIDI ze statywu magnetycznego.

- 2 Świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 mieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 3 Dodać 32 µl roztworu EE2+HP3 do każdego dołka na bibliotekę na płytce BBN MIDI.
- 4 Wyrzucić pozostałą mieszaninę elucyjną.
- 5 Na płytkę BBN MIDI nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 6 Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- 7 Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
- 8 Oznakować nową 96-dołkową płytkę PCR jako NL (Normalized Libraries, biblioteki znormalizowane).
- 9 Ostrożnie przenieść 30 µl eluatu z każdego dołka na bibliotekę na płytce BBN MIDI do odpowiedniego dołka na płytce NL PCR.

**PRZESTROGA**

Jeśli kulki zostaną zassane do końcówek pipet, należy dozować je z powrotem na płytkę na statywie magnetycznym i poczekać, aż ciecz stanie się klarowna (ok. 2 minuty), przed przejściem do kolejnego etapu procedury.

- 10 Wyrzucić pustą płytkę BBN MIDI.
- 11 Odczynnik LNS1 wymieszać mieszadłem wirowym.
- 12 Dodać 30 µl odczynnika LNS1 do każdego dołka na bibliotekę na nowej płytce NL PCR.
- 13 Pipetować 5 razy w celu wymieszania.
- 14 Na płytkę NL PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 15 Odłożyć odczynniki LNB1, LNA1, EE2, LNW1 i LNS1 do przechowywania.

PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku zatrzymania procedury należy wirować płytkę NL PCR z prędkością 280 × g przez 1 minutę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 30 dni.

Data i godzina zatrzymania _____

Przygotowanie do etapów protokołu

Rozpocząć przygotowanie materiałów eksploatacyjnych do sekwencjonowania z zestawu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (nr kat. 20028871) co najmniej na godzinę przed użyciem.

- 1 Wyjąć bufor do rozcieńczeń bibliotek Library Dilution Buffer (HT1) z miejsca przechowywania w temperaturze od -25°C do -15°C, rozmrozić do temperatury pokojowej, a następnie umieścić na lodzie.
- 2 W odniesieniu do innych materiałów eksploatacyjnych w tym zestawie postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi przygotowania zawartymi w dokumencie *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx)* (nr dokumentu: 100000009513).
 - ▶ Kasetę odczynników na 300 cykli NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - ▶ Kasetę z buforem na 300 cykli NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
 - ▶ Kasetę z komorą przepływową na 300 cykli NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
- 3 Wyjąć probówkę z odczynnikiem z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (nr kat. 20031121)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
Kontrola wewnętrzna PhiX (PhiX)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej. Umieścić na lodzie.	Przygotowanie do sekwencjonowania

Tabela 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (nr kat. 20031123)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
HP3	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie do sekwencjonowania
RSB (różowa etykieta)	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie do sekwencjonowania

Przygotowanie do sekwencjonowania

Przygotowanie

Data i godzina rozpoczęcia _____

- 1 Należy zapoznać się z wytycznymi dotyczącymi liczby bibliotek i wybierania indeksów w dokumencie *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania testu TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (nr dokumentu 200007789)*.
- 2 Oznakować probówkę do mikrowirówki jako dHP3 (diluted HP3, rozcieńczony HP3).
- 3 Oznakować probówkę do mikrowirówki jako dPhiX (diluted PhiX, rozcieńczony PhiX).
- 4 Podgrzać blok grzewczy do 96°C dla próbek do mikrowirówki.
- 5 Przygotować wiaderko z lodem.

Rozcieńczanie i denaturacja kontroli PhiX

- 1 Odczynnik HP3 mieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 2 W próbówce dHP3 do mikrowirówki należy wymieszać podane poniżej objętości.
 - ▶ 10 µl HP3
 - ▶ 190 µl wody pozbawionej RNazy/DNazy
- 3 Zawartość próbki dHP3 mieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 4 Wymieszać odczynnik RSB przez odwrócenie go lub użycie mieszadła wirowego.
- 5 Kontrolę PhiX mieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 6 W próbówce dPhiX do mikrowirówki należy wymieszać podane poniżej objętości.
 - ▶ 8 µl RSB
 - ▶ 2 µl kontroli PhiX
- 7 Dodać 10 µl dHP3 do próbki dPhiX.
- 8 Wyrzucić probówkę dHP3.
- 9 Zawartość próbki dPhiX mieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 10 Inkubować dPhiX w temperaturze pokojowej przez 5 minut w celu denaturacji.
- 11 Odczynnik HT1 wymieszać mieszadłem wirowym.
- 12 Niezwłocznie dodać 980 µl wstępnie schłodzonego odczynnika HT1 do próbki dPhiX.
- 13 Wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 14 Probówkę dPhiX umieścić na lodzie aż do momentu użycia na etapie przygotowania do drugiego rozcieńczenia. Stężenie końcowe wynosi 20 pM dPhiX.
- 15 Odstawić odczynniki PhiX, HP3 i RSB do przechowywania.

Pulowanie i denaturacja bibliotek

- 1 Jeśli płytka NL PCR była przechowywana, należy rozmrozić ją do temperatury pokojowej, a następnie odwirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
- 2 Używając pipety wielokanałowej ustawionej na 30 µl, delikatnie wymieszać biblioteki na płytce NL PCR, pipetując je 5 razy.
Dla każdej biblioteki należy użyć świeżych końcówek.



PRZESTROGA

W celu uzyskania optymalnej wydajności należy upewnić się, że biblioteki zostały dobrze wymieszane.

- 3 Wybrać jedną z poniższych opcji w celu pulowania, denaturowania i rozcieńczania bibliotek.
 - ▶ **Opcja 1:** jednoczesne sekwencjonowanie bibliotek pochodzących z próbek RNA i próbek DNA. Patrz *Opcja 1: biblioteki DNA i RNA razem na stronie 32*.
 - ▶ **Opcja 2:** sekwencjonowanie wyłącznie bibliotek pochodzących z próbek DNA. Patrz *Opcja 2: tylko biblioteki DNA na stronie 32*.
 - ▶ **Opcja 3:** sekwencjonowanie wyłącznie bibliotek pochodzących z próbek RNA. Patrz: *Opcja 3: tylko biblioteki RNA na stronie 33*.

Opcja 1: biblioteki DNA i RNA razem

- 1 Oznakować próbkę do mikrowirówki jako PRL (Pooled RNA Libraries, spulowane biblioteki RNA).
- 2 Oznakować próbkę do mikrowirówki jako PDL (Pooled DNA Libraries, spulowane biblioteki DNA).
- 3 Przenieść 10 µl każdej znormalizowanej biblioteki RNA (cDNA) z płytki NL do próbki PRL.
Nie pulować dwóch bibliotek z tym samym starterem do indeksowania.
- 4 Przenieść 10 µl każdej znormalizowanej biblioteki DNA z płytki NL do próbki PDL.
Nie pulować dwóch bibliotek z tym samym starterem do indeksowania.
- 5 Na płytkę NL PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 6 Każdą próbkę PRL i PDL wymieszać mieszadłem wirowym.
- 7 Probówki PRL i PDL krótko odwirować.
- 8 Probówki PRL i PDL inkubować w bloku grzejnym w temperaturze 96°C przez 2 minuty.
- 9 Probówki PRL i PDL umieścić na lodzie na 5 minut.
- 10 Probówki PRL i PDL wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko odwirować.
- 11 Umieścić probówki PRL i PDL z powrotem na lodzie.

Przygotowanie pierwszego rozcieńczenia

- 1 Oznakować próbkę do mikrowirówki 1,7 ml jako DIL1 (Dilution 1, rozcieńczenie 1).
- 2 Przenieść 20 µl PDL do pustej próbki DIL1.
- 3 Dodać 5 µl PRL do próbki DIL1.
- 4 Wyrzucić probówki PDL i PRL.
- 5 Dodać 475 µl wstępnie schłodzonego HT1 do próbki DIL1 (rozcieńczenie 1:20).
- 6 Wymieszać zawartość próbki DIL1 mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.

Przygotowanie drugiego rozcieńczenia

- 1 Oznaczyć próbkę do mikrowirówki 2,0 ml jako DIL2 (Dilution 2, rozcieńczenie 2).
- 2 Przenieść 40 µl DIL1 do pustej próbki DIL2.
- 3 Wyrzucić próbkę DIL1.
- 4 Dodać 1660 µl wstępnie schłodzonego HT1 do próbki DIL2 (rozcieńczenie 1:850).
- 5 Wymieszać przygotowany 20 pM roztwór dPhiX mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 6 Dodać 2,5 µl przygotowanego 20 pM roztworu dPhiX do próbki DIL2.
- 7 Wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 8 Załadować 1300 µl DIL2 do rozmrożonej kasetki NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
Więcej informacji na ten temat zawiera *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx (nr dokumentu: 1000000009513)*.
- 9 Wyrzucić próbkę DIL2.
- 10 Odwirować płytkę NL PCR z prędkością 280 × g przez 1 minutę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C do 30 dni.
- 11 Przejść do sekwencjonowania.
Więcej informacji na ten temat zawiera *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx (nr dokumentu: 1000000009513)*.

Opcja 2: tylko biblioteki DNA

- 1 Oznakować próbkę do mikrowirówki jako PDL (Pooled DNA Libraries, spulowane biblioteki DNA).

- 2 Przenieść 10 µl każdej znormalizowanej biblioteki DNA z płytki NL do probówki PDL.
Nie pulować dwóch bibliotek z tym samym starterem do indeksowania.
- 3 Na płytkę NL PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 4 Probówkę PDL wymieszać mieszadłem wirowym.
- 5 Probówkę PDL krótko odwirować.
- 6 Probówkę PDL inkubować w bloku grzejnym w temperaturze 96°C przez 2 minuty.
- 7 Umieścić probówkę PDL na lodzie na 5 minut.
- 8 Probówkę PDL wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko odwirować.
- 9 Umieścić probówkę PDL z powrotem na lodzie.

Przygotowanie pierwszego rozcieńczenia

- 1 Oznakować probówkę do mikrowirówki 1,7 ml jako DIL1 (Dilution 1, rozcieńczenie 1).
- 2 Przenieść 10 µl PDL do pustej probówki DIL1.
- 3 Wyrzucić probówkę PDL.
- 4 Dodać 190 µl wstępnie schłodzonego HT1 do probówki DIL1 (rozcieńczenie 1:20).
- 5 Wymieszać zawartość probówki DIL1 mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.

Przygotowanie drugiego rozcieńczenia

- 1 Oznaczyć probówkę do mikrowirówki 2,0 ml jako DIL2 (Dilution 2, rozcieńczenie 2).
- 2 Przenieść 40 µl DIL1 do pustej probówki DIL2.
- 3 Wyrzucić probówkę DIL1.
- 4 Dodać 1660 µl wstępnie schłodzonego HT1 do probówki DIL2 (rozcieńczenie 1:850).
- 5 Wymieszać przygotowany 20 pM roztwór dPhiX mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 6 Dodać 2,5 µl przygotowanego 20 pM roztworu dPhiX do probówki DIL2.
- 7 Wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 8 Załadować 1300 µl zawartości probówki DIL2 do rozmrożonej kasety odczytników na 300 cykli NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
Więcej informacji na ten temat zawiera *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx (nr dokumentu: 1000000009513)*.
- 9 Wyrzucić probówkę DIL2.
- 10 Płytkę NL PCR wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę, a następnie przechowywać w temperaturze od –25°C do –15°C przez maksymalnie 30 dni.
- 11 Przejść do sekwencjonowania.
Więcej informacji na ten temat zawiera *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx (nr dokumentu: 1000000009513)*.

Opcja 3: tylko biblioteki RNA

- 1 Oznakować probówkę do mikrowirówki jako PRL (Pooled RNA Libraries, spulowane biblioteki RNA).
- 2 Przenieść 10 µl każdej znormalizowanej biblioteki RNA (cDNA) z płytki NL do probówki PRL.
Nie pulować dwóch bibliotek z tym samym starterem do indeksowania.
- 3 Na płytkę NL PCR nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Całkowicie uszczelnić krawędzie i dołki.
- 4 Probówkę PRL wymieszać mieszadłem wirowym.
- 5 Probówkę PRL krótko odwirować.
- 6 Inkubować probówkę PRL w bloku grzejnym w temperaturze 96°C przez 2 minuty.
- 7 Umieścić probówkę PRL na lodzie na 5 minut.
- 8 Probówkę PRL wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko odwirować.
- 9 Umieścić probówkę PRL z powrotem na lodzie.

Przygotowanie pierwszego rozcieńczenia

- 1 Oznakować probówkę do mikrowirówki 1,7 ml jako DIL1 (Dilution 1, rozcieńczenie 1).

- 2 Przenieść 10 µl PRL do pustej probówki DIL1.
- 3 Wyrzucić probówkę PRL.
- 4 Dodać 190 µl wstępnie schłodzonego HT1 do probówki DIL1 (rozcieńczenie 1:20).
- 5 Wymieszać zawartość probówki DIL1 mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.

Przygotowanie drugiego rozcieńczenia

- 1 Oznaczyć probówkę do mikrowirówki 2,0 ml jako DIL2 (Dilution 2, rozcieńczenie 2).
- 2 Przenieść 40 µl DIL1 do pustej probówki DIL2.
- 3 Wyrzucić probówkę DIL1.
- 4 Dodać 1646 µl wstępnie schłodzonego HT1 do probówki DIL2 (rozcieńczenie 1:843).
- 5 Wymieszać przygotowany 20 pM roztwór dPhiX mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 6 Dodać 16,7 µl przygotowanego 20 pM roztworu dPhiX do probówki DIL2.
- 7 Wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie krótko wirować.
- 8 Załadować 1300 µl zawartości probówki DIL2 do rozmrożonej kasety odczytników na 300 cykli NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
Więcej informacji na ten temat zawiera *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx (nr dokumentu: 1000000009513)*.
- 9 Wyrzucić probówkę DIL2.
- 10 Odwirować płytkę NL PCR z prędkością 280 × g przez 1 minutę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C do 30 dni.
- 11 Przejść do sekwencjonowania.
Więcej informacji na ten temat zawiera *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx (nr dokumentu: 1000000009513)*.

Patenty i znaki towarowe

Niniejszy dokument oraz jego treść stanowią własność firmy Illumina, Inc. oraz jej podmiotów zależnych („Illumina”) i są przeznaczone wyłącznie do użytku zgodnego z umową przez klienta firmy w związku z użytkowaniem produktów opisanych w niniejszym dokumencie, z wyłączeniem innych celów. Niniejszy dokument oraz jego treść nie będą wykorzystywane ani rozpowszechniane do innych celów i/lub publikowane w inny sposób, ujawniane ani kopiowane bez pisemnej zgody firmy Illumina. Firma Illumina na podstawie niniejszego dokumentu nie przenosi żadnych licencji podlegających przepisom w zakresie patentów, znaków towarowych czy praw autorskich ani prawu powszechnemu lub prawom pokrewnym osób trzecich.

W celu zapewnienia właściwego i bezpiecznego użytkowania produktów opisanych w niniejszym dokumencie podane instrukcje powinny być ściśle przestrzegane przez wykwalifikowany i właściwie przeszkolony personel. Przed rozpoczęciem użytkowania tych produktów należy zapoznać się z całą treścią niniejszego dokumentu.

NIEZAPOZNANIE SIĘ LUB NIEDOKŁADNE PRZESTRZEGANIE WSZYSTKICH INSTRUKCJI PODANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE MOŻE SPOWODOWAĆ USZKODZENIE PRODUKTÓW LUB OBRAŻENIA CIAŁA UŻYTKOWNIKÓW LUB INNYCH OSÓB ORAZ USZKODZENIE INNEGO MIENIA, A TAKŻE SPOWODUJE UNIEWAŻNIENIE WSZELKICH GWARANCJI DOTYCZĄCYCH PRODUKTÓW.

FIRMA ILLUMINA NIE PONOSI ODPOWIEDZIALNOŚCI ZA NIEWŁAŚCIWE UŻYTKOWANIE PRODUKTÓW (W TYM ICH CZĘŚCI I OPROGRAMOWANIA) OPISANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE.

© 2022 Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Wszystkie znaki towarowe są własnością firmy Illumina, Inc. lub ich odpowiednich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych można znaleźć na stronie www.illumina.com/company/legal.html.

Informacje kontaktowe



Illumina

5200 Illumina Way

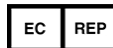
San Diego, California 92122, USA

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (poza Ameryką Północną)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven,

Holandia

Etykiety produktu

Objaśnienia symboli zamieszczonych na opakowaniu i samym produkcie znajdują się w kluczu symboli użytych w danym zestawie, dostępnym na stronie support.illumina.com.