

Sporings skjema for laboratoriet for TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK
KUN FOR EKSPORT

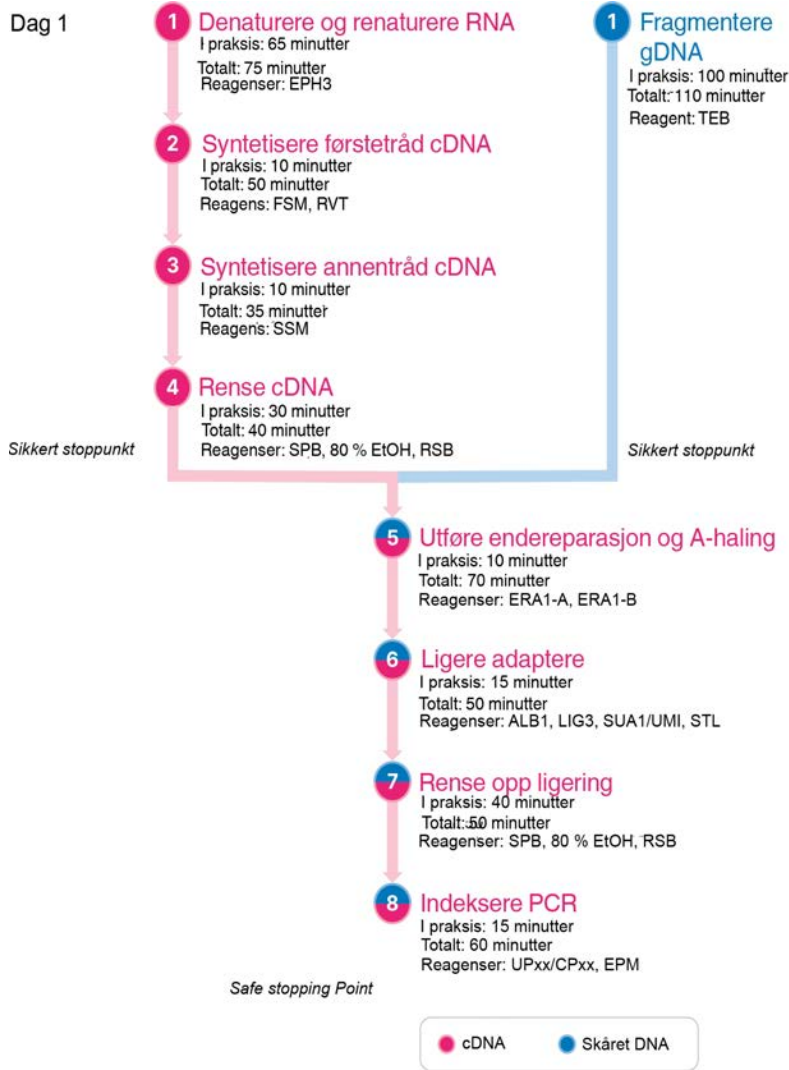
Bruksanvisning

Figur 1 og **Figur 2** viser en oversikt over TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive)-arbeidsflyten.

Før du begynner på protokollen må du gjennomgå advarslene og forholdsreglene i *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789).

Arbeidsflyt for bibliotekklargjøring

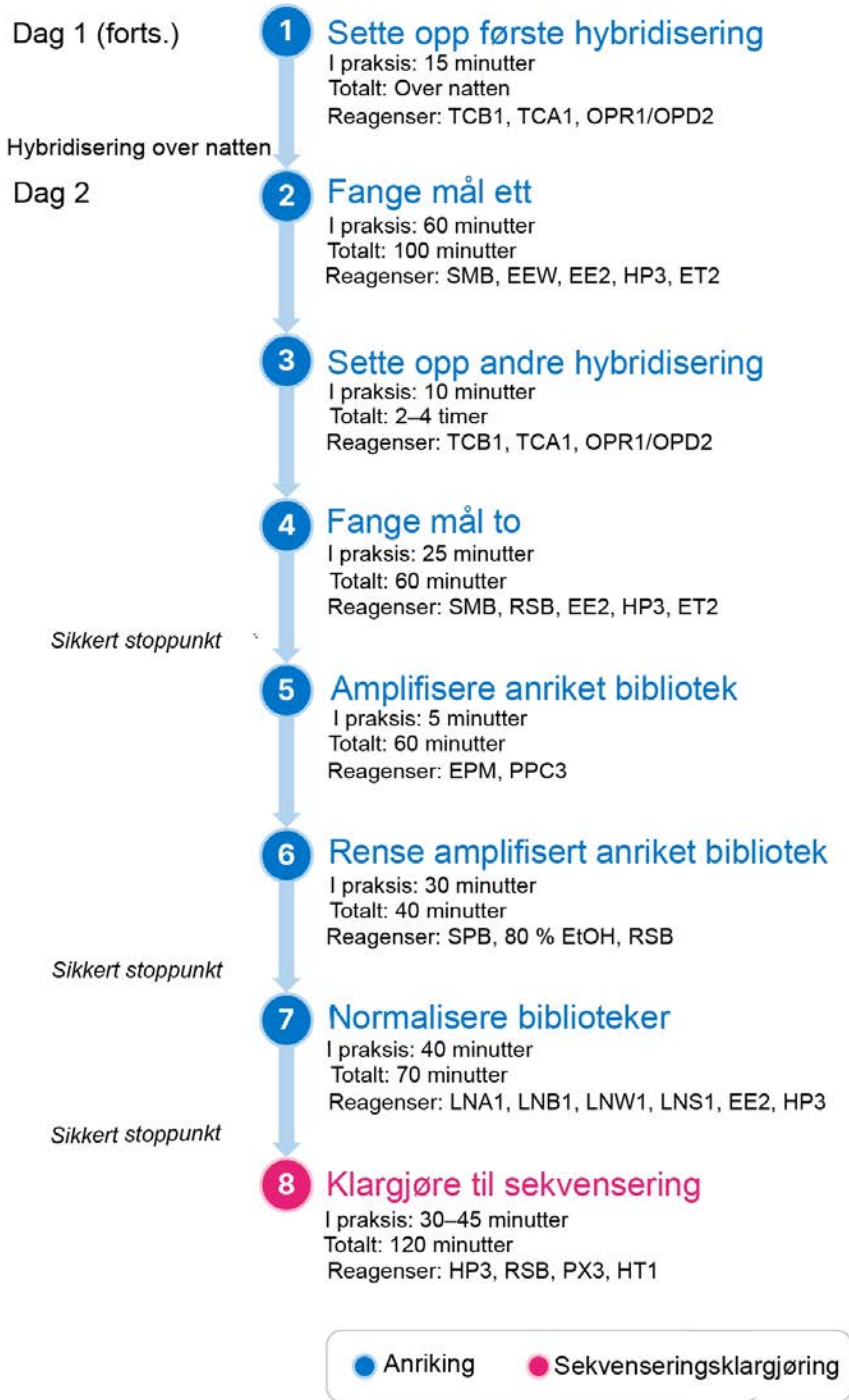
Figur 1 TSO Comprehensive-arbeidsflyt (del 1)



* I praksis-tider og samlede tider er omtrentlige.

Arbeidsflyt for anriking

Figur 2 TSO Comprehensive-arbeidsflyt (del 2)



Programmere termosyklere

- 1 Før analysen startes, må følgende programmer lagres på termosyklerne for pre- og postamplifisering.

Tabell 1 Termosyklereprogrammer for preamplifisering

Prosedyretrinn	Programnavn	Lokktemperatur	Reaksjonsvolum	Termosyklereparametere
Denaturere og renaturere RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C i 5 minutter • 4 °C i 1 minutt • 4 °C hold
Syntetisere førstetråd cDNA	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25 °C i 10 minutter • 42 °C i 15 minutter • 70 °C i 15 minutter • 4 °C i 1 minutt • 4 °C hold
Syntetisere annetråd cDNA	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16 °C i 25 minutter • 4 °C i 1 minutt • 4 °C hold

Slå av oppvarmingsalternativet for forvarmet lokk hvis lokktemperaturen for 2ndSS ikke kan settes til 30 °C.

Tabell 2 Termosyklereprogrammer etter amplifisering

Prosedyretrinn	Programnavn	Lokktemperatur	Reaksjonsvolum	Termosyklereparametere
Indeksere PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 30 sekunder • 15 sykluser med: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i 5 minutter • 10 °C hold
Utføre første hybridisering	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 min 30 sekunder • 75 °C i 2 min 30 sekunder • 65 °C i 2 min 30 sekunder • 57 °C hold i 8 til 24 timer
Utføre andre hybridisering	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 min 30 sekunder • 75 °C i 2 min 30 sekunder • 65 °C i 2 min 30 sekunder • 57 °C hold i 1,5 til 4 timer
Amplifisere anriket bibliotek	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 30 s • 18 sykluser med: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 10 s • 60 °C i 30 s • 72 °C i 30 s • 72 °C i 5 min • 10 °C hold

Oppgi kjøringsinformasjon

NextSeq 550Dx-instrumentets Local Run Manager er programvaren som brukes til å sette opp en TSO Comprehensive-kjøring. Du finner mer informasjon i *Arbeidsflytveiledning for Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (dokumentnr. 200008661)*.

Angi informasjon om kjøring og prøveoppsett direkte i TruSight Oncology Comprehensive-analysemodulen.

Angi kjøringsparametere

- 1 Logg på Local Run Manager på instrumentet eller fra en datamaskin i et nettverk.
- 2 Velg **Create Run** (Opprett kjøring), og velg deretter **TSO Comp (EU)**.
- 3 Skriv inn et kjøringsnavn som identifiserer kjøringen fra sekvensering til analyse. Følgende kriterier gjelder:
 - ▶ 1–40 tegn.
 - ▶ Kun alfanumeriske tegn, understrekingstegn eller bindestreker.
 - ▶ Det skal være et alfanumerisk tegn før og etter understrekingstegn og bindestreker.
 - ▶ Unikt på tvers av alle kjøring på instrumentet.
- 4 **[Valgfritt]** Angi en kjøringsbeskrivelse som gjør det lettere å identifisere kjøringen. Følgende kriterier gjelder:
 - ▶ 1–150 tegn.
 - ▶ Kun alfanumeriske tegn eller mellomrom.
 - ▶ Det skal være et alfanumerisk tegn før og etter mellomrom.

Spesifisere prøvene for kjøringen

Spesifiser prøvene for kjøringen ved å velge ett av følgende alternativer.

- ▶ **Enter samples manually** (Angi prøver manuelt) – Bruk den tomme tabellen på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).
- ▶ **Import samples** (Importer prøver) – Naviger til en ekstern fil i kommadelt CSV-format. En mal kan lastes ned på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).



FORSIKTIG

Misforhold mellom prøvene og indeksprimere fører til feil resultatrapportering pga. tap av positiv prøveidentifikasjon. Angi prøve-ID-er og tilordne indekser i Local Run Manager før du starter bibliotekklargjøringen. Registrer prøve-ID-er, indekser og platebrønnenes retning for referanse under bibliotekklargjøringen.



FORSIKTIG

Unngå datatap ved å kontrollere at installasjon av kunnskapsbasen ikke pågår før du lagrer en kjøring.

Legge inn prøver manuelt

- 1 Angi en unik prøve-ID i feltet Sample ID (Prøve-ID). Følgende kriterier gjelder: **Alle kontrollprøver skal legges til først.** Mer informasjon finnes under *Kontrollprøver på side 6*.
 - ▶ 1–25 tegn.
 - ▶ Kun alfanumeriske tegn, understrekingstegn eller bindestreker.
 - ▶ Det skal være et alfanumerisk tegn før og etter understrekingstegn og bindestreker.
- 2 **[Valgfritt]** Angi en prøvebeskrivelse i feltet Sample Description (Prøvebeskrivelse). Følgende kriterier gjelder:
 - ▶ 1–50 tegn.
 - ▶ Kun alfanumeriske tegn, bindestreker, understrekingstegn eller mellomrom.
 - ▶ Det skal være et alfanumerisk tegn før og etter mellomrom, understrekingstegn og bindestreker.
- 3 Velg en indeks for DNA-biblioteket og/eller RNA-biblioteket som er klagt fra prøven. Sørg for at RNA- og DNA-prøvene er i separate kolonner. Feltet for sekvens DNA i7+i5 fylles ut automatisk etter at du har valgt en DNA-indeks-ID. Feltet for sekvens RNA i7+i5 fylles ut automatisk etter at du har valgt en RNA-indeks-ID. I tillegg til denne oppsummeringen bør du også se *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200007789)* for valg av indeks-ID.
 - ▶ For et DNA-prøvebibliotek velger du en unik indeks-ID (UPxx- eller CPxx-indekser) fra rullegardinlisten DNA Index ID (DNA-indeks-ID).
 - ▶ For et RNA-prøvebibliotek velger du en unik indeks-ID (kun UPxx) fra rullegardinlisten RNA Index ID (RNA-indeks-ID).

- ▶ Hvis det er totalt tre biblioteker i kjøringen, følger du retningslinjene for valg av indeks i *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200007789)*.
- 4 Bruk feltet Tumor Type (Tumortype) for å tilordne en tumortype for hver prøve. Velg den mest spesifikke tumortypen som er tilgjengelig. Se *Velge en tumortype på side 6*.
- 5 Bruk feltet Tumor Type (Tumortype) for å tilordne én av følgende kontrolltyper for hver kontroll. Se *Kontrollprøver på side 6*.
 - Ekstern DNA-kontroll
 - Ekstern RNA-kontroll
 - DNA No-Template Control (DNA-kontroll uten mal)
 - RNA No-Template Control (RNA-kontroll uten mal)

Hvis Consumable Prefix DNA Control brukes, er kontrolltypen DNA External Control. Hvis Consumable Prefix RNA Control brukes, er kontrolltypen RNA External Control.
- 6 Tilordne kjønn.
- 7 **[Valgfritt]** Velg **Export to CSV** (Eksporter til CSV) for å eksportere prøveinformasjon til en ekstern fil.
- 8 Gjennomgå informasjonen på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring). Feil informasjon kan påvirke resultatene.
- 9 Velg **Save Run** (Lagre kjøring).

Importere prøver

- 1 Velg **Import CSV** (Importer CSV), og bla til plasseringen av prøveinformasjonsfilen. Det finnes to typer filer du kan importere.
 - Velg **Download CSV** (Last ned CSV) på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) for å laste ned en ny mal for prøveinformasjon. CSV-filen inneholder nødvendige kolonnetopptekster og format for import. Angi prøveinformasjon i hver kolonne for prøvene i kjøringen. For kolonnen Tumor Type (Tumortype) angir du betegnelsen for tumortype eller tilknyttet kode (se *Download Tumor Types (Last ned tumortyper) på side 1*). Feltet Tumor Type (Tumortype) brukes også for å angi prøver som kontroller (se *Kontrollprøver på side 6*).
 - Bruk en fil med prøveinformasjon som ble eksportert fra TSO Comprehensive-analysemodulen ved hjelp av funksjonen Export to CSV (Eksporter til CSV).
- 2 Gjennomgå den importerte informasjonen på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring). Feil informasjon kan påvirke resultatene.
- 3 **[Valgfritt]** Velg **Export to CSV** (Eksporter til CSV) for å eksportere prøveinformasjon til en ekstern fil.
- 4 Velg **Save Run** (Lagre kjøring).

Kontrollprøver

TSO Comprehensive krever bruk av panelkontroll. Når en prøve angis som kontroll, settes Sex (Kjønn) for prøven automatisk som Unknown (Ukjent). For å angi en prøve som kontroll velger du én av fire kontrolltyper fra feltet Tumor Type (Tumortype): ekstern DNA-kontroll (positiv DNA-kontroll), DNA-kontroll uten mal, ekstern RNA-kontroll (positiv RNA-kontroll) eller RNA-kontroll uten mal. Se *Velge en tumortype på side 6* for mer informasjon om innstilling av tumortyper for alle typer prøver under kjøringsoppsett.

Kun én av hver kontrolltype kan spesifiseres innenfor en kjøring. Bare et DNA-bibliotek kan spesifiseres for en ekstern DNA-kontroll eller en DNA-kontroll uten mal. Bare et RNA-bibliotek kan spesifiseres for en ekstern RNA-kontroll eller en RNA-kontroll uten mal. Biblioteker som angis som DNA- eller RNA-kontroller uten mal, tas ikke med i beregningen av det maksimale antallet biblioteker i en kjøring.

Velge en tumortype

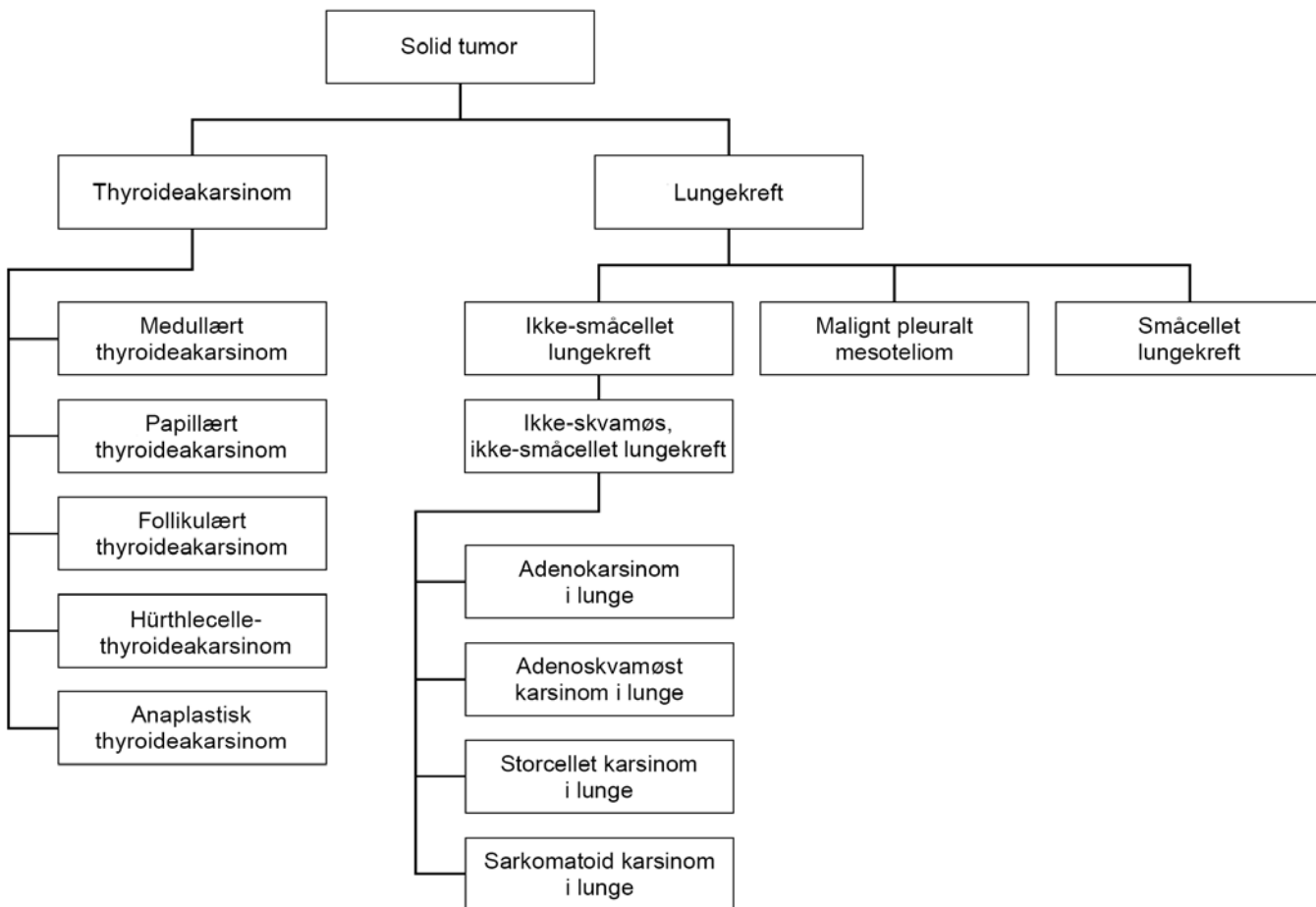
En tumortype må spesifiseres for hver prøve. Bortsett fra kontrolltypene er de tilgjengelige tumortypene avledet fra den installerte kunnskapsbasen (KB). De vil kunne bli endret når det kommer oppdaterte versjoner av KB.

**FORSIKTIG**

Feil valg av tumortype kan gi feil resultater. Løs eventuelle advarsler som vises når du spesifiserer tumortyper, for å unngå analysefeil.

Tumortype-begrepene inngår i en hierarkisk sykdomsontologi i KB, som er konstruert som et sett med overordnede/underordnede relasjoner. For eksempel er begrepet "ikke-småcellet lungekreft" underordnet "lungekreft", ettersom ikke-småcellet lungekreft er en type lungekreft. Figur 3 viser et delsett i en sykdomsontologi som eksempel. Her vises "solid tumor" som grunnbegrep og begrepene knyttet til lungekreft og skjoldbruskkjertelkreft (andre tumortyper vises ikke). Et begrep som er knyttet til et begrep på et lavere nivå gjennom en overordnet/underordnet relasjon, kalles et overordnet begrep. Det tilknyttede begrepet på lavere nivå er et underordnet begrep i forhold til det overordnede begrepet. For eksempel er «lungekreft» et overordnet begrep i forhold til «adenokarsinom i lunge» og «småcellet lungekreft», og «medullært thyroideakarsinom» er et underordnet begrep i forhold til både «thyroideakarsinom» og «solid tumor».

Figur 3 Delsett av et eksempel på sykdomsontologi



Den valgte tumortypen for en pasientprøve påvirker:

- ▶ Hvilken tiltenkt bruk av CDx som evalueres for prøven. Kun pasientprøver med en tumortype som er i nøyaktig samsvar med, eller en underordnet tumortype for en tiltenkt bruk av CDx, blir evaluert for denne påstanden.
- ▶ Hvilke tumorprofileringsvarianter som inkluderes i TSO Comprehensive-rapporten.

Instruksjonene nedenfor beskriver prosessen for å velge en tumortype via skjermbildet Create Run (Opprett kjøring). Tumortypen kan også angis ved å importere en CSV-fil som inneholder en tumortype (se *Importere prøver på side 6*).

- 1 Viser de tilgjengelige tumortypene ved å dobbeltklikke inne i tumortype-cellen i raden til prøven. Tilgjengelige tumortyper vises i en hierarkisk liste som er ordnet alfabetisk. Feltet Tumor Type (Tumortype) brukes også for å angi en kontrolltype for kontrollprøver (se *Kontrollprøver på side 6*).
- 2 Finn og velg ønsket tumortype ved hjelp av listen, eller bruk søkefeltet øverst i vinduet Tumor Type (Tumortype).

Klargjøring til protokolltrinn

- 1 Dekontaminer arbeidsområdene grundig med RNase-/DNase-hemmende rensmiddel.



FORSIKTIG

Alle prosedyrer i arbeidsflyten krever et RNase-/DNase-fritt miljø.

- 2 Angi termosyklusprogrammer for preamplifisering. Se *Programmere termosyklere på side 4*.
- 3 Følg produsentens instruksjoner for å sette opp ultrasonikatorene.
- 4 Dersom bare DNA-prøver prosesseres, gå direkte videre til *Fragmentere gDNA på side 12*.
- 5 Ta RNA-kontrollene ut fra oppbevaring.
- 6 Fjern reagensrørene fra esken, og følg instruksjon for tining.

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

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
EPH3	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Denaturere og renaturere RNA
FSM	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Syntetisere førstetråd cDNA
RVT	-25 °C til -15 °C	Oppbevares på is.	Syntetisere førstetråd cDNA
SSM	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Syntetisere annentråd cDNA

Tabell 4 TruSight Oncology Comp Library Prep (i kjøleskap) (PN 20031119)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
SPB (lysegrønn etikett)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur i 30 minutter.	Rense cDNA
RSB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Rense cDNA

Denaturere og renaturere RNA

Klargjøring

- 1 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ EPH3 – Legg til side.
 - ▶ FSM – Bland ved å rotere. Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Inspiser for utfellinger. Hvis det forekommer utfellinger, bland ved å pipettere til utfellingene løser seg opp.
 - ▶ RVT – Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Oppbevares på is.

MERK RVT er en viskøs løsning. Alltid pipetter sakte for å unngå å danne bobler.

- 2 Kombiner følgende volumer i et mikrosentrifugerør for å klargjøre en FSM+RVT-hovedblanding.

Tabell 5 FSM+RVT-hovedblanding

Hovedblandingskomponent	3 RNA-prøver (µl)	8 RNA-prøver (µl)	16 RNA-prøver (µl)	24 RNA-prøver (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se delen om håndtering av reagenser i *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789) for beregninger.

- 3 Bland ved å pipettere ti ganger.
- 4 Sett FSM+RVT-hovedblandingen på is til følgende bruk: *Syntetisere førstetråd cDNA* på side 9.

Prosedyre

- 1 Tin ekstraherte RNA-prøver og RNA-kontroller på is.
Behandle RNA-kontroller som prøver for resten av protokollen.
Se *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789) for informasjon om å kvantifisere prøver.
- 2 Bland ved å pipettere hver RNA-prøve 10 ganger.
- 3 Bruk RNase-/DNase-fritt vann til å klargjøre 40 ng av hver RNA-prøve i et endelig volum på 8,5 µl (4,7 ng/µl).
For RNA-kontroller må konsentrasjonen på røretiketten brukes.
- 4 Merk en ny 96-brønners PCR-plate CF (cDNA Fragments).
- 5 Tilsett 8,5 µl av hver RNA-prøve i en unik brønn på CF PCR-platen.
- 6 Kontroller at prøveplateoppsett og indekser for hver prøve samsvarer med kjøringen som er planlagt i Local Run Manager under kjøringsoppsettet.
- 7 Bland ved å rotere EPH3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 8 Tilsett 8,5 µl EPH3 i hver prøvebrønn.
- 9 Påfør klebende plateforsegling på CF PCR-platen.



FORSIKTIG

Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.

- 10 Rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
- 11 Sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt.
- 12 Plasser på termosykleren, og kjør LQ-RNA programmet.
Se *Programmere termosyklere* på side 4.
- 13 Når prøvene når 4 °C, må du vente i ett minutt og deretter gå umiddelbart videre til neste trinn.

Syntetisere førstetråd cDNA

Prosedyre

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Fjern CF PCR-platen fra termosykleren.
- 2 Pipetter 5 ganger for å blande FSM+RVT-hovedblandingen.
- 3 Tilsett 8 µl FSM+RVT-hovedblanding i hver prøvebrønn.
- 4 Pipetter for å blande 5 ganger.
- 5 Kast gjenværende FSM+RVT-hovedblanding.
- 6 Påfør klebende plateforsegling på CF PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- 7 Rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
- 8 Sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt.
- 9 Plasser på en termosyklar, og kjør 1stSS-programmet.
Se *Programmere termosyklere* på side 4.

- 10 Gå umiddelbart videre til neste trinn når prøvene når 4 °C. Førstetrådprøver kan holdes ved 4 °C i opptil 5 minutter.

Syntetisere annentråd cDNA

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Klargjør følgende reagens:
 - ▶ SSM – Bland ved å vende 10 ganger. Sentrifuger et kort øyeblikk.

Prosedyre

- 1 Fjern CF PCR-platen fra termosykleren.
- 2 Tilsett 25 µl SSM i hver prøvebrønn.
- 3 Påfør klebende plateforsegling på CF PCR-platen. Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- 4 Rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
- 5 Sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt.
- 6 Plasser på en termosyklar, og kjør 2ndSS-programmet. Se *Programmere termosyklere på side 4*.
- 7 Når prøvene når 4 °C, må du vente i ett minutt og deretter gå umiddelbart videre til neste trinn.

Rense cDNA

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ SPB – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - ▶ RSB – Legg til side for bruk i prosedyren.
- 2 Klargjør ny 80 % EtOH i et 15 ml eller 50 ml kjegleformet rør.

Reagens	3 prøver	8 prøver	16 prøver	24 prøver
100 % etanolalkohol, ren	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase-/DNase-fritt vann	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Bland ved å rotere ny 80 % EtOH.
- 4 Merk en ny 96-brønners MIDI-plate BIND1 (cDNA-binding).
- 5 Dekk til, og legg til side.
- 6 Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

- 1 Fjern CF PCR-platen fra termosykleren.
- 2 Roter SPB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
- 3 Tilsett umiddelbart 90 µl SPB i hver prøvebrønn på BIND1 MIDI-platen. Hvis du bruker en beholder for å dispensere SPB, må det inkluderes en 1,05 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale når SPB er tilsatt i hver prøvebrønn.
- 4 Overfør hele volumet (50 µl) av hver prøve fra CF PCR-platen til tilsvarende brønn på BIND1 MIDI-platen.
- 5 Kast den tomme CF PCR-platen.
- 6 Påfør klebende plateforsegling på BIND1 MIDI-platen. Forsegl kanter og brønner fullstendig.

- 7 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 8 Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
- 9 Plasser BIND1 MIDI-platen på et magnetstativ i 5 minutter.
- 10 Bruk et P200-dråpetellersett satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver prøvebrønn uten å forstyrre kulepelleten.

Vaske

- 1 Vask kuler på følgende måte:
 - a La dem stå på magnetstativet, og tilsett 200 µl ny 80 % EtOH i hver brønn.
 - b Vent i 30 sekunder.
 - c Fjern og kast all supernatant fra hver brønn.
- 2 Vask kulene **andre** gang.
- 3 Fjern rester av EtOH fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.
- 4 Kast ubrukt 80 % EtOH.

Eluere

- 1 Fjern BIND1 MIDI-platen fra magnetstativet.
- 2 Bland ved å vende eller rotere RSB.
- 3 Tilsett 22 µl RSB i hver prøvebrønn.
- 4 Påfør klebende plateforsegling på BIND1 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 5 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 6 Inkuberes i romtemperatur i 2 minutter.
- 7 Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
- 8 Merk en ny 96-brønners MIDI-plate PCF (Purified cDNA Fragments (rensede cDNA-fragmenter)).
Dersom du stopper ved **SIKKERT STOPPUNKT** på side 11, skal du bruke en PCR-plate.
- 9 Overfør 20 µl eluat fra hver prøvebrønn på BIND1 MIDI-platen til tilsvarende brønn på PCF-platen.
- 10 Kast den tomme BIND1 MIDI-platen.
- 11 Tilsett 30 µl RSB i hver prøvebrønn på PCF-platen.
- 12 Pipetter for å blande 10 ganger.
- 13 Påfør klebende plateforsegling på PCF-platen, og oppbevar den på is.
- 14 Sett EPH3, FSM, RVT og SSM tilbake til oppbevaring.
- 15 Gå videre til **Utføre endereparasjon og A-haling** på side 13 hvis du behandler prøver avledet fra kun RNA (cDNA) og ikke stopper ved det sikre stoppunktet.

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, sentrifuger PCF PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt og oppbevar ved –25 °C til –15 °C i opptil 7 dager.

Stoppdato og -klokkeslett _____

Klargjøring til protokolltrinn

- 1 Ta DNA-kontrollene ut fra oppbevaring.
- 2 Fjern reagensrøret fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 6 TruSight Oncology Comp Library Prep (i kjøleskap) (PN 20031119)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
TEB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fragmentere gDNA

Fragmentere gDNA

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Sørg for å følge anbefalingene i *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200007789)* for å kvantifisere prøver.
- 2 Klargjør følgende reagens:
 - ▶ TEB – Bland ved å vende eller rotere.

Prosedyre

Klargjøre platen

- 1 Velg ett av følgende tre alternativer for å klargjøre platen.
 - ▶ **Alternativ 1:** Behandle gDNA-prøvene samtidig med cDNA-prøvene på PCF MIDI-platen.
 - a Merk PCF MIDI-platen LP (Library Preparation).
 - b Legg på is, og sett til side til følgende bruk: *Overføre fragmentert DNA på side 13.*
 - ▶ **Alternativ 2:** Behandle gDNA-prøvene samtidig med cDNA-prøvene, og PCF PCR-platen er fryst.
 - a Tin PCF PCR-platen til romtemperatur.
 - b Sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt.
 - c Bland ved å pipettere 10 ganger.
 - d Merk en ny 96-brønners MIDI-plate LP (Library Preparation).
 - e Overfør hele volumet på 50 µl av hver prøve fra PCF PCR-platen til tilsvarende brønn på LP MIDI-platen.
 - f Kast PCF PCR-platen.
 - g Påfør klebende plateforsegling, og legg på is for følgende bruk: *Overføre fragmentert DNA på side 13.*
 - ▶ **Alternativ 3:** Behandle prøver som bare inneholder gDNA.
 - a Merk en ny 96-brønners MIDI-plate LP (Library Preparation).
 - b Dersom du stopper ved *SIKKERT STOPPUNKT på side 13*, skal du bruke en PCR-plate.
 - c Dekk til og sett til side til følgende bruk: *Overføre fragmentert DNA på side 13.*

Fortynne gDNA

- 1 Tin gDNA-prøvene og DNA-kontrollene ved romtemperatur.
Behandle DNA-kontroller som prøver for resten av protokollen.
- 2 Bland ved å pipettere hver gDNA-prøve 10 ganger.
- 3 Sentrifuger røret et kort øyeblikk for å samle opp dråper.
- 4 Bland ved å vende eller rotere TEB.
- 5 Bruk TEB til å klargjøre 40 ng av hver gDNA-prøve i et endelig volum på 52 µl (0,77 ng/µl).
Analysen krever en minimumskonsentrasjon for ekstraksjon på 3,33 ng/µl, for å tillate minst 40 µl TEB for 52 µl-volumet. For DNA-kontroller må konsentrasjonen på røretiketten brukes. Ikke pipetter mindre enn 2 µl prøve i denne fortynningen for å hindre prøvetap.

Fragmentere

- 1 Tilsett 52 µl av hver gDNA-prøve i en separat brønn på ultrasonikorrøret.
- 2 Registrer strimmelens orientering.
- 3 Fragmenter gDNA i fragmenter med en ultrasonikator.

Overføre fragmentert DNA

- 1 Kontroller at prøveplateoppsett og indekser for hver prøve samsvarer med kjøringen som er planlagt i Local Run Manager under kjøringsoppsettet.
- 2 Følg ultrasonikatorprodusentens instruksjoner for å hente ut prøven.
For noen ultrasonikatorrørtyper kan det være nødvendig med sentrifugering for å konsolidere prøven i røret.
- 3 For hver fragmentert gDNA-prøve brukes en p20-dråpeteller med tynne spisser til å utføre 3 overføringer av 16,7 µl til en tom brønn på LP MIDI-platen.
- 4 Påfør klebende plateforsegling på LP MIDI-platen.

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, skal du påføre klebende plateforsegling på LP PCR-platen og sentrifugere ved 280 × g i 1 minutt. Oppbevares ved –25 °C til –15 °C i opptil 7 dager.

Stoppdato og -klokkeslett _____

Klargjøring til protokolltrinn

- 1 Klargjør en isbøtte.
- 2 Fjern reagensrøret fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 7 TruSight Oncology Comp Library Prep (i fryser) boks (PN 20031118)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
ERA1-A	–25 °C til –15 °C	Oppbevares på is.	Utføre endereparasjon og A-haling
ERA1-B	–25 °C til –15 °C	Tin til romtemperatur.	Utføre endereparasjon og A-haling
ALB1	–25 °C til –15 °C	Tin til romtemperatur.	Ligere adaptere
LIG3	–25 °C til –15 °C	Oppbevares på is.	Ligere adaptere
SUA1 (blå hette)	–25 °C til –15 °C	Tin til romtemperatur.	Ligere adaptere
UMI (hvit hette)	–25 °C til –15 °C	Tin til romtemperatur.	Ligere adaptere
STL	–25 °C til –15 °C	Tin til romtemperatur.	Ligere adaptere
EPM	–25 °C til –15 °C	Oppbevares på is.	Indeksere PCR

Tabell 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (i kjøleskap) boks (PN 20031119)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
SPB (lysegrønn etikett)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur i 30 minutter.	Rense opp ligering
RSB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Rense opp ligering

Tabell 9 TruSight Oncology Comp UP-indeksprimerboks (PN 20031120)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
UPxx	–25 °C til –15 °C	Tin de relevante indeksprimerrørene til romtemperatur.	Indeksere PCR

Tabell 10 TruSight Oncology Comp CP-indeksprimerboks (PN 20031126)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
CPxx	–25 °C til –15 °C	Tin de relevante indeksprimerrørene til romtemperatur.	Indeksere PCR

Utføre endereparasjon og A-haling

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Forvarm 2 mikroprøveinkubatorer med MIDI-varmeblokkinnsetser på følgende måte:
 - ▶ Forvarm en mikroprøveinkubator til 30 °C.
 - ▶ Forvarm en mikroprøveinkubator til 72 °C.
- 2 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ ERA1-A – Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Oppbevares på is.
 - ▶ ERA1-B – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Inspiser for utfellinger. Dersom det forekommer utfellinger, varm røret til 37 °C, og bland ved å pipettere, til utfellingene løses opp.
- 3 Klargjør ERA1-hovedblandingen i et mikrosentrifugerør.

Tabell 11 ERA1-hovedblanding

Hovedblandingskomponent	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se delen om håndtering av reagenser i *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789) for beregninger.

- 4 Bland ved å pipettere sakte 10 ganger, sentrifuger et kort øyeblikk, og legg deretter ERA1-hovedblandingen på is.
- 5 Velg det egnede alternativet av de to følgende alternativene for å klargjøre platen.
 - ▶ **Alternativ 1:** Hvis det er prøver i en MIDI-plate.
 - a Merk MIDI-platen på nytt LP2 (Library Preparation 2).
Dersom noen prøver finnes i separate MIDI-plater, må alle prøvene flyttes til separate brønner på samme MIDI-plate i samsvar med plateoppsettet.
 - ▶ **Alternativ 2:** Hvis platen er fryst.
 - a Tin PCF PCR-platen eller LP PCR-platen til romtemperatur.
 - b Sentrifuger platen ved 280 × g i 1 minutt.
 - c Bland ved å pipettere 10 ganger.
 - d Merk en ny 96-brønners MIDI-plate LP2 (Library Preparation 2).
 - e Overfør hele volumet på 50 µl av hver prøve fra PCF PCR-platen eller LP PCR-platen til tilsvarende brønn på LP2 MIDI-platen.
 - f Kast PCF PCR- eller LP PCR-platen.

Prosedyre

- 1 Tilsett 10 µl ERA1-hovedblanding i hver prøvebrønn i LP2 MIDI-platen.
- 2 Kast gjenværende ERA1-hovedblanding.
- 3 Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- 4 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 5 Inkuber i den forvarmede mikroprøveinkubatoren ved 30 °C i 30 minutter.
- 6 Overfør umiddelbart til en andre, forvarmet mikroprøveinkubator, og inkuber ved 72 °C i 20 minutter.
- 7 Legg LP2 MIDI-platen på is i 5 minutter.

Ligere adaptere

Denne prosessen ligerer adaptere til endene av cDNA- og/eller gDNA-fragmentene.

TSO Comprehensive-analysen omfatter SUA1-adaptore og UMI-adaptore.

- ▶ Bruk SUA1-adaptore med RNA-prøver.
- ▶ Bruk UMI-adaptore med DNA-prøver.

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ ALB1 – Bland ved å rotere i minst 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ LIG3 – Sentrifuger et kort øyeblikk, og bland ved å pipettere. Oppbevares på is.
 - ▶ SUA1 – Bland ved å rotere i minst 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ UMI – Bland ved å rotere i minst 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ STL – Legg til side for bruk i prosedyren.

Prosedyre

- 1 Fjern LP2 MIDI-platen fra isen.
- 2 Tilsett 60 µl ALB1 i hver prøvebrønn på LP2 MIDI-platen. Pipetter langsomt.
- 3 Tilsett 5 µl LIG3 i hver prøvebrønn.
- 4 Tilsett adaptere.
 - Ikke** kombiner forskjellige typer adaptere.
 - **RNA-prøvebrønner** – 10 µl SUA1 (blå hette) i hver prøve fra RNA.
 - **DNA-prøvebrønner** – 10 µl UMI (hvit hette) i hver prøve fra DNA.
- 5 Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 6 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 7 Inkuberes ved romtemperatur i 30 minutter.
- 8 Bland ved å rotere STL, og sentrifuger deretter kort.
- 9 Tilsett 5 µl STL i hver prøvebrønn på LP2 MIDI-platen.
- 10 Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- 11 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.

Rense opp ligering

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ SPB – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - ▶ RSB – Legg til side for bruk i prosedyren.
- 2 Klargjør ny 80 % EtOH i et 15 ml eller 50 ml kjegleformet rør.

Reagens	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
100 % etanolalkohol, ren	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase-/DNase-fritt vann	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Bland ved å rotere ny 80 % EtOH.
- 4 Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

- 1 Roter SPB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
- 2 Tilsett umiddelbart 112 µl SPB i hver prøvebrønn i LP2 MIDI-platen.
Hvis du bruker en beholder for å dispensere SPB, må det inkluderes en 1,05 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale når SPB er tilsatt i hver prøvebrønn.

- 3 Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 4 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 5 Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
- 6 Plasser LP2 MIDI-platen på magnetstativet i 10 minutter.
- 7 Bruk et P200-dråpetellersett satt til 200 µl for å fjerne og kaste all supernatant fra hver prøvebrønn uten å forstyrre kulepelleten.

Vaske

- 1 Vask kuler på følgende måte:
 - a La dem stå på magnetstativet, og tilsett 200 µl ny 80 % EtOH i hver prøvebrønn.
 - b Vent i 30 sekunder.
 - c Fjern og kast all supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
- 2 Vask kulene **andre** gang.
- 3 Fjern rester av EtOH fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.
- 4 Kast ubrukt 80 % EtOH.

Eluere

- 1 Fjern LP2 MIDI-platen fra magnetstativet.
- 2 Bland ved å vende eller rotere RSB.
- 3 Tilsett 27,5 µl RSB i hver prøvebrønn.
- 4 Påfør klebende plateforsegling på LP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 5 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 6 Inkuberes i romtemperatur i 2 minutter.
- 7 Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
- 8 Merk en ny 96-brønners PCR-plate LS (Library Samples).
- 9 Overfør 25 µl av hvert eluat fra LP2 MIDI-platen til tilsvarende brønn på LS PCR-platen.
- 10 Kast den tomme LP2 MIDI-platen.
- 11 Påfør klebende plateforsegling på LS PCR-platen.

Indeksere PCR

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ EPM – Oppbevares på is.
 - ▶ UPxx – Bland ved å rotere, og sentrifuger et kort øyeblikk. UPxx er indeksprimeren som ble valgt på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) i Local Run Manager-programvaren under kjøringssoppsettet.
 - ▶ CPxx– Bland ved å rotere, og sentrifuger kort. CPxx er indeksprimeren som ble valgt på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) i Local Run Manager-programvaren under kjøringssoppsettet.
- 2 Kontroller at indekser for hver prøve samsvarer med kjøringen som er planlagt i Local Run Manager under kjøringssoppsettet. Sørg for å følge instruksjonene om valg av indeks i *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789).



FORSIKTIG

Uoverensstemmelser mellom prøvene og indeksprimerne forårsaker feil resultatrapportering på grunn av tapt positiv prøveidentifisering.

Prosedyre

- 1 Tilsett 5 µl av den egnede indeksprimeren (UPxx eller CPxx) i tilsvarende prøvebrønn på LS PCR-platen i samsvar med indeksene som velges på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) i Local Run Manager-programvaren under kjøringssoppsettet.



FORSIKTIG

Håndter og åpne bare ett indeksprimerrør om gangen. Sett hetten tilbake på hvert indeksrør umiddelbart etter bruk. Ikke kombiner indeksprimere.

- 2 Bland ved å rotere EPM i 5 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 3 Tilsett 20 µl EPM i hver prøvebrønn.
 4 Påfør klebende plateforsegling på LS PCR-platen.
 Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
 5 Rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
 6 Sett preamplifiseringsreagensene tilbake til oppbevaring.



FORSIKTIG

Utfør alle etterfølgende trinn i et postamplifiseringsområde for å hindre overføring av amplifiseringsproduktet.

- 7 Sentrifuger LS PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
 8 Plasser på den forhåndsprogrammerte termosyklere for postamplifisering, og kjør I-PCR-programmet.
 Se *Programmere termosyklere på side 4*.

MERK Følg instruksjon for tining for reagenser i Klargjøre protokoll-trinnene hvis du fortsetter med *Sette opp første hybridisering på side 18*.

- 9 Sentrifuger LS PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt når I-PCR-programmet er avsluttet.
 10 Merk platen på nytt ALS (Amplified Library Samples).

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, oppbevar ALS PCR-platen ved –25 °C til –15 °C i opptil 30 dager.

Stoppdato og -klokkeslett _____

Klargjøring til protokolltrinn

- 1 Kontroller at det er angitt termosyklereprogrammer for postamplifisering. Se *Programmere termosyklere på side 4*.
 2 Fjern reagensrøret fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 12 TruSight Oncology Comp Enrichment (i kjøleskap) boks (PN 20031123)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
TCB1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Sette opp første hybridisering

Tabell 13 TruSight Oncology Comp Enrichment (i fryser) boks (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
TCA1	–25 °C til –15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp første hybridisering

Tabell 14 TruSight Oncology Comp-innholdssettets boks (PN 20031122)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
OPR1 (rød hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp første hybridisering
OPD2 (hvit hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp første hybridisering

Sette opp første hybridisering

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ TCB1 – Varm røret ved 37 °C i 5 minutter. Roter for å blande i 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ TCA1 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ OPR1 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ OPD2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 2 Tin ALS PCR-platen til romtemperatur hvis den sto lagret, og sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt. Bland ved å pipettere.
- 3 Merk en ny 96-brønners PCR-plate HYB1 (Hybridization 1).

Prosedyre

- 1 Overfør 20 µl av hvert cDNA- og/eller gDNA-bibliotek fra ALS PCR-platen til tilsvarende brønn på HYB1 PCR-platen.
- 2 Påfør klebende plateforsegling på ALS PCR-platen, og sett den til side.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 3 Inspiser TCB1 for utfelling. Varm røret igjen, og roter det til eventuelle krystaller løses opp.
- 4 Tilsett 15 µl TCB1 i hver bibliotekbrønn på HYB1 PCR-platen.
- 5 Tilsett 10 µl TCA1 i hver bibliotekbrønn på HYB1 PCR-platen.
- 6 Tilsett prober.
Ikke kombiner forskjellige typer prober.
 - ▶ **RNA-bibliotekbrønner** – 5 µl OPR1 i hvert bibliotek fra RNA.
 - ▶ **DNA-bibliotekbrønner** – 5 µl OPD2 i hvert bibliotek fra DNA.
- 7 Påfør klebende plateforsegling på HYB1 PCR-platen.



FORSIKTIG

Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.

- 8 Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
- 9 Plasser på termosykleren, og kjør HYB1-programmet.
Se *Programmere termosyklere* på side 4.
- 10 Hybridiser ved 57 °C i minst 8 timer til maksimalt 24 timer.
- 11 Sett hybridiseringsreagensene tilbake til oppbevaring.
- 12 Oppbevar ALS PCR-platen ved -25 °C til -15 °C i opptil 30 dager.

Klargjøring til protokolltrinn

- 1 Fjern reagensrøret fra esken på begynnelsen av dag 2, og følg instruksjon for tining.

Tabell 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (i kjøleskap) boks (PN 20031123)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
SMB (mørkeblå etikett)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur i 30 minutter.	Fange mål ett Fange mål to
ET2	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål ett Fange mål to
HP3	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål ett Fange mål to Normalisere biblioteker
TCB1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Sette opp andre hybridisering
RSB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Fange mål to Rense amplifisert anriket bibliotek

Tabell 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (i fryser) boks (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
EE2	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Fange mål ett Fange mål to Normalisere biblioteker
EEW	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Fange mål ett
TCA1	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp andre hybridisering

Tabell 17 TruSight Oncology Comp-innholdssett boks (PN 20031122)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
OPR1 (rød hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp andre hybridisering
OPD2 (hvit hette)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Sette opp andre hybridisering

Fange mål ett

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Forvarm en mikroprøveinkubator med MIDI-varmeblokkinnsett til 57 °C.
- 2 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ EEW – Roter for å blande i 1 minutt.
 - ▶ EE2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ HP3 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ SMB – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - ▶ Sørg for å bruke **SMB**, ikke SPB, til denne prosedyren.
 - ▶ ET2 – Legg til side for bruk i prosedyren.
- 3 Klargjør ny EE2+HP3-elueringsblanding i et mikrosentrifugerør.

Tabell 18 EE2+HP3-elueringsblanding for Fange mål ett

Elueringsblandingskomponent	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se delen om håndtering av reagenser i *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789) for beregninger.

- 4 Roter EE2+HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Legg til side for trinnet *Eluere*.
- 5 Merk en ny 96-brønners MIDI-plate CAP1 (Capture 1).

- 6 Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

- 1 Fjern HYB1 PCR-platen fra termosykleren.
- 2 Sentrifuger HYB1 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
- 3 Roter SMB i 1 minutt for å re suspendere kulene.
- 4 Tilsett umiddelbart 150 µl SMB i hver bibliotekbrønn på CAP1 MIDI-platen.
Hvis det brukes en beholder for å dispensere SMB, må det inkluderes en 1,15 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale når SMB er tilsatt i hver prøvebrønn.
- 5 Sett dråpetelleren til 50 µl, og overfør hele volumet av hvert bibliotek fra HYB1 PCR-platen til tilsvarende brønn på CAP1 MIDI-platen.
- 6 Kast den tomme HYB1 PCR-platen.
- 7 Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- 8 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 9 Inkuber i den forvarmede mikroprøveinkubatoren ved 57 °C i 25 minutter.
- 10 Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
- 11 La CAP1 MIDI-platen stå på magnetstativet, og bruk et P200 µl dråpetellersett til 200 µl til å fjerne og kaste all supernatant uten å forstyrre kulepelleten.



FORSIKTIG

Gå umiddelbart videre til neste trinn (*Vaske*). Ikke la kulepelleten være lengre tid uten væske.

Vaske

- 1 Vask kuler på følgende måte:
 - a Fjern CAP1 MIDI-platen fra magnetstativet.
 - b Tilsett 200 µl EEW i hver brønn.
 - c Sett dråpetellervolumet til 150 µl, og bland ved å pipettere minst 10 ganger. Kontroller at alle kulene resuspenderes.



FORSIKTIG

Kontroller at det ikke er noen kulepelletter ved å aspirere den samlede kuleløsningen i brønnen forsiktig til spissen. Se deretter på bunnen av hver brønn etter en pellet. Vinkle dråpetellerspissen mot kulepelleten under vasketrinnene for å løse pelleten. Kontroller at kulepelleten er helt omgitt av oppløsningen. Løsningen bør se mørkebrun ut og ha en homogen konsistens.

- d Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.
 - e Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
 - f Rist ved 1800 o/min i 4 minutter.
 - g Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 5 minutter.
 - h Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
 - i Oppbevar på magnetstativet, og fjern og kast all supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
- 2 Vask kulene **andre** gang.
 - 3 Vask kulene en **trede** gang.
 - 4 Fjern rester av supernatant fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.

Eluere

- 1 Fjern CAP1 MIDI-platen fra magnetstativet.
- 2 Roter ny EE2+HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter kort.
- 3 Tilsett 17 µl EE2+HP3-elueringsblanding forsiktig i hver bibliotekbrønn på CAP1 MIDI-platen.
- 4 Kast gjenværende EE2+HP3-elueringsblanding.
- 5 Påfør klebende plateforsegling på CAP1 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 6 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 7 Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
- 8 Merk en ny 96-brønners PCR-plate ELU1 (Elution 1).
- 9 Bland ved å rotere ET2, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 10 Tilsett 5 µl ET2 i hver tilsvarende bibliotekbrønn på den nye ELU1 PCR-platen.
- 11 Overfør 15 µl eluat forsiktig fra hver bibliotekbrønn på CAP1 MIDI-platen til tilsvarende brønn på ELU1 PCR-platen.
- 12 Kast den tomme CAP1 MIDI-platen.
- 13 Påfør klebende plateforsegling på ELU1 PCR-platen.
- 14 Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- 15 Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
- 16 Sett EEW tilbake til oppbevaring.

Sette opp andre hybridisering

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ TCB1 – Varm røret ved 37 °C i 5 minutter. Roter for å blande i 10 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ TCA1 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ OPR1 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ OPD2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Prosedyre

- 1 Inspiser TCB1 for utfellinger. Dersom utfellinger, varm opp røret igjen og roter til krystallene løser seg opp.
- 2 Tilsett 15 µl TCB1 i hver bibliotekbrønn på ELU1 PCR-platen.
- 3 Tilsett 10 µl TCA1 i hver bibliotekbrønn.
- 4 Tilsett prober.
Ikke kombiner forskjellige typer prober.
 - ▶ **RNA-bibliotekbrønner** – 5 µl OPR1 i hvert bibliotek fra RNA.
 - ▶ **DNA-bibliotekbrønner** – 5 µl OPD2 i hvert bibliotek fra DNA.
- 5 Påfør klebende plateforsegling på ELU1 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- 6 Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
- 7 Plasser på en termosyklus, og kjør HYB2-programmet.
Se *Programmere termosyklere på side 4*.
- 8 Hybridiser ved 57 °C i minst 1.5 timer til maksimalt 4 timer.
- 9 Sett TCA1, TCB1, OPR1 og OPD2 tilbake til oppbevaring.

Fange mål to

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Forvarm en mikroprøveinkubator med MIDI-varmeblokkingsats til 57 °C.
- 2 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ EE2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ HP3 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ SMB – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - ▶ Sørg for å bruke **SMB**, ikke SPB, til denne prosedyren.
 - ▶ RSB – Legg til side for bruk i prosedyren.
 - ▶ ET2 – Legg til side for bruk i prosedyren.
- 3 Klargjør ny EE2+HP3-elueringsblanding i et mikrosentrifugerør.

Tabell 19 EE2+HP3-elueringsblanding for Fange mål to

Elueringsblandingskomponent	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se delen om håndtering av reagenser i *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789) for beregninger.

- 4 Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Legg til side for trinnet *Eluere*.
- 5 Merk en ny 96-brønners MIDI-plate CAP2 (Capture 2).
- 6 Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

- 1 Fjern ELU1 PCR-platen fra termosykleren.
- 2 Sentrifuger ELU1 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
- 3 Roter SMB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
- 4 Tilsatt umiddelbart 150 µl SMB i hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen.
Hvis det brukes en beholder for å dispensere SMB, må det inkluderes en 1,15 overskuddsfaktor ved alikvotering av tilstrekkelig materiale per prøve. Kast eventuelt restmateriale når SMB er tilsatt i hver prøvebrønn.
- 5 Sett dråpetelleren til 50 µl, og overfør hele volumet av hvert bibliotek fra ELU1 PCR-platen til tilsvarende brønn på CAP2 MIDI-platen.
- 6 Kast den tomme ELU1 PCR-platen.
- 7 Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- 8 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 9 Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.

MERK Følg instruksjon for tining for reagenser i avsnittet Klargjøre til protokolltrinn hvis du fortsetter med *Amplifisere anriket bibliotek på side 24*.

- 10 Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
- 11 La CAP2 MIDI-platen stå på magnetstativet, og bruk et P200-dråpetellersett til 200 µl til å fjerne og kaste all supernatant fra hver bibliotekbrønn uten å forstyrre kulepelletten.

**FORSIKTIG**

Gå umiddelbart videre til neste trinn (*Vaske*). Ikke la kulepelleten være lengre tid uten væske.

Vaske

- 1 Fjern CAP2 MIDI-platen fra magnetstativet.
- 2 Bland ved å vende eller rotere RSB.
- 3 Tilsett 200 µl RSB i hver brønn.
- 4 Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 5 Rist ved 1800 o/min i 4 minutter.
- 6 Plasser på magnetstativet i 2 minutter.
- 7 La CAP2 MIDI-platen stå på magnetstativet, og fjern og kast all supernatant uten å forstyrre kulepelleten.
- 8 Fjern rester av supernatant fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.

Eluere

- 1 Fjern CAP2 MIDI-platen fra magnetstativet.
- 2 Roter ny EE2+HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter kort.
- 3 Tilsett 22 µl EE2+HP3-elueringsblanding i hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen.
- 4 Kast gjenværende EE2+HP3-elueringsblanding.
- 5 Påfør klebende plateforsegling på CAP2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 6 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 7 Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
- 8 Merk en ny 96-brønners PCR-plate ELU2 (Elution 2).
- 9 Bland ved å rotere ET2, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 10 Tilsett 5 µl ET2 i hver tilsvarende bibliotekbrønn på den nye ELU2 PCR-platen.
- 11 Overfør 20 µl eluat forsiktig fra hver bibliotekbrønn på CAP2 MIDI-platen til tilsvarende brønn på ELU2 PCR-platen.
- 12 Kast den tomme CAP2 MIDI-platen.
- 13 Påfør klebende plateforsegling på ELU2 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- 14 Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
- 15 Sett SMB, EE2, HP3, og ET2 tilbake til oppbevaring.

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, sentrifuger ELU2 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt og oppbevar ved –25 °C til –15 °C i opptil 7 dager. Sett RSB tilbake til oppbevaring.

Stoppdato og -klokkeslett _____

Klargjøring til protokolltrinn

- 1 Klargjør en isbøtte.
- 2 Fjern reagensrøret fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (i fryser) boks (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
PPC3	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Amplifisere anrikt bibliotek
EPM	-25 °C til -15 °C	Oppbevares på is.	Amplifisere anrikt bibliotek

Tabell 21 TruSight Oncology Comp Enrichment (i kjøleskap) boks (PN 20031123)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
SPB (lysegrønn etikett)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur i 30 minutter.	Rense amplifisert anrikt bibliotek
RSB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Rense amplifisert anrikt bibliotek Klargjøre til sekvensering

Amplifisere anrikt bibliotek

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Tin ELU2-platen til romtemperatur hvis den sto lagret, og sentrifuger deretter ved 280 x g i 1 minutt.

Prosedyre

- 1 Bland ved å rotere PPC3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 2 Tilsett 5 µl PPC3 i hver bibliotekbrønn på ELU2 PCR-platen.
- 3 Bland ved å rotere EPM i 5 sekunder, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 4 Tilsett 20 µl EPM i hver bibliotekbrønn.
- 5 Påfør klebende plateforsegling på ELU2 PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig for å hindre fordamping.
- 6 Rist ved 1200 o/min i 2 minutter.
- 7 Plasser på en termosyklus, og kjør EL-PCR-programmet.
Se *Programmere termosyklere* på side 4.

MERK Følg instruksjon for tining i avsnittet Klargjøring til protokolltrinn hvis du fortsetter med *Normalisere biblioteker* på side 26.

- 8 Sett PPC3 og EPM tilbake til oppbevaring.

Rense amplifisert anrikt bibliotek

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ SPB – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - ▶ Sørg for å bruke **SPB**, ikke **SMB**, til denne prosedyren.
 - ▶ RSB – Legg til side for bruk i prosedyren.
- 2 Klargjør ny 80 % etanol i et 15 ml eller 50 ml kjegleformet rør.

Reagens	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
100 % etanolalkohol, ren	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase-/DNase-fritt vann	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Bland ved å rotere ny 80 % EtOH.
- 4 Merk en ny 96-brønners MIDI-plate BIND2 (rens binding).
- 5 Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

- 1 Fjern ELU2 PCR-platen fra termosykleren.
- 2 Sentrifuger ELU2 PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt.
- 3 Roter SPB i 1 minutt for å resuspendere kulene.
- 4 Tilsett umiddelbart 110 µl SPB i hver bibliotekbrønn på BIND2 MIDI-platen.
- 5 Overfør 50 µl av hvert bibliotek fra ELU2 PCR-platen til tilsvarende brønn på BIND2 MIDI-platen.
- 6 Kast den tomme ELU2 PCR-platen.
- 7 Påfør klebende plateforsegling på BIND2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 8 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 9 Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
- 10 Plasser platen på magnetstativet i 5 minutter.
- 11 Bruk et P200-dråpetellersett ved 200 µl for å fjerne og kaste **all** supernatant fra hver bibliotekbrønn uten å forstyrre kulepelleten.

Vaske

- 1 Vask kuler på følgende måte:
 - a La dem stå på magnetstativet, og tilsett 200 µl ny 80 % EtOH i hver brønn.
 - b Vent i 30 sekunder.
 - c Fjern og kast all supernatant fra hver prøvebrønn uten å forstyrre kulepelleten.
- 2 Vask kulene **andre** gang.
- 3 Fjern rester av EtOH fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.
- 4 Kast ubrukt 80 % EtOH.

Eluere

- 1 Fjern BIND2 MIDI-platen fra magnetstativet.
- 2 Snu eller roter for å blande RSB.
- 3 Tilsett 32 µl RSB i hver bibliotekbrønn.
- 4 Påfør klebende plateforsegling på BIND2 MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 5 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 6 Inkuberes i romtemperatur i 2 minutter.
- 7 Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
- 8 Merk en ny 96-brønners PCR-plate PL (Purified Libraries (rensede biblioteker)).
- 9 Overfør 30 µl av hvert eluat fra BIND2 MIDI-platen til tilsvarende brønn på PL PCR-platen.
- 10 Kast den tomme BIND2 MIDI-platen.
- 11 Påfør klebende plateforsegling på PL PCR-platen.
- 12 Sett SPB tilbake til oppbevaring.

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, sentrifuger PL PCR-platen ved 280 x g i 1 minutt og oppbevar ved -25 °C til -15 °C i opptil 30 dager. Sett RSB tilbake til oppbevaring.

Stoppdato og -klokkeslett _____

Klargjøring til protokolltrinn

- 1 Fjern reagensrøret fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 22 TruSight Oncology Comp Enrichment (i fryser) boks (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
LNA1	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Normalisere biblioteker
EE2	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur.	Normalisere biblioteker

Tabell 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (i kjøleskap) boks (PN 20031123)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
LNB1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur i 30 minutter.	Normalisere biblioteker
HP3	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Normalisere biblioteker Klargjøre til sekvensering
LNW1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Normalisere biblioteker
LNS1	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Normalisere biblioteker

- 2 Følg instruksjon for tining i avsnittet Klargjøring til protokolltrinn hvis du fortsetter på samme dag med *Klargjøre til sekvensering på side 28.*

Normalisere biblioteker

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Klargjør følgende reagenser:
 - ▶ LNB1 – Kontroller at kulene holder romtemperatur i 30 minutter.
 - ▶ LNA1 – Bland ved å rotere.
 - ▶ EE2 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ HP3 – Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
 - ▶ LNW1 – Bland ved å rotere. Legg til side for bruk i prosedyre.
 - ▶ LNS1 – Bland ved å rotere. Legg til side for bruk i prosedyren.
- 2 Roter LNB1 i 1 minutt for å resuspendere kulene.
Vend LNB1-røret for å kontrollere at alle kulene er resuspendert.
- 3 Pipetter LNB1 opp og ned 10 ganger ved hjelp av en P1000 innstilt til 800 µl for å sikre resuspensjon.
- 4 Klargjør umiddelbart ny LNA1+LNB1-hovedblanding i et kjegleformet rør.



FORSIKTIG

Resuspender LNB1-kulepelletten fullstendig i bunnen av røret for å hindre inkonsekvent klyngetetthet.

Tabell 24 LNA1+LNB1-hovedblanding

Hovedblandingskomponent	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
LNA1	229 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se delen om håndtering av reagenser i *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789) for beregninger.

- 5 Roter LNA1+LNB1-hovedblandingen. Legg til side for trinnet *Binde*.
- 6 Klargjør ny EE2+HP3-elueringsblanding i et mikrosentrifugerør.

Tabell 25 EE2+HP3-elueringsblanding for Normaliser biblioteker

Elueringsblandingskomponent	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Denne tabellen inkluderer volumoverskudd. Se delen om håndtering av reagenser i *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789) for beregninger.

- 7 Roter ny elueringsblanding, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Legg til side for trinnet *Eluere*.
- 8 Dersom PL PCR-platen kom fra lagring, tin til romtemperatur, sentrifuger ved 280 × g i 1 minutt og bland ved å pipettere.
- 9 Merk en ny 96-brønners MIDI-plate BBN (Bead Based Normalization).
- 10 Sett ut magneten.

Prosedyre

Binde

- 1 Roter LNA1+LNB1-hovedblandingen.
- 2 Tilsett umiddelbart 45 µl LNA1+LNB1-hovedblanding i hver bibliotekbrønn på BBN MIDI-platen.
- 3 Kast gjenværende LNA1+LNB1-hovedblanding.
- 4 Tilsett 20 µl av hvert bibliotek fra PL PCR-platen i tilsvarende brønn på BBN MIDI-platen.
- 5 Påfør klebende plateforsegling på BBN MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 6 Rist ved 1800 o/min i 30 minutter.
- 7 Påfør klebende plateforsegling på PL PCR-platen, og sett tilbake til oppbevaring.
- 8 Plasser platen på et magnetstativ i 2 minutter.
- 9 La stå på et magnetstativ, og bruk en P20-dråpeteller til å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.

Vaske

- 1 Vask kuler på følgende måte:
 - a Fjern BBN MIDI-platen fra magnetstativet.
 - b Tilsett 45 µl LNW1 i hver bibliotekbrønn.
 - c Påfør klebende plateforsegling på BBN MIDI-platen.
 - d Forsegl kanter og brønner fullstendig.
 - e Rist ved 1800 o/min i 5 minutter.
 - f Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
 - g Fjern og kast all supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
- 2 Vask kulene **andre** gang.
- 3 Fjern rester av supernatant fra hver brønn.
Bruk en P20-dråpeteller med tynne spisser.

Eluere

- 1 Fjern BBN MIDI-platen fra magnetstativet.
- 2 Roter ny EE2+HP3-elueringsblanding, og sentrifuger deretter kort.
- 3 Tilsett 32 µl EE2+HP3-løsning på hver bibliotekbrønn på BBN MIDI-platen.

- 4 Kast gjenværende elueringsblanding.
- 5 Påfør klebende plateforsegling på BBN MIDI-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 6 Rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 7 Plasser på et magnetstativ i 2 minutter.
- 8 Merk en ny 96-brønners PCR-plate NL (Normalized Libraries).
- 9 Overfør 30 µl eluat forsiktig fra hver bibliotekbrønn på BBN MIDI-platen til tilsvarende brønn på NL PCR-platen.



FORSIKTIG

Dersom kuler aspireres inn i dråpetellerspissene, må kulene dispensereres tilbake til platen på magnetstativet. Vent til væsken er klar (~2 minutter) før du går videre til neste trinn i prosedyren.

- 10 Kast den tomme BBN MIDI-platen.
- 11 Bland ved å rotere LNS1.
- 12 Tilsett 30 µl LNS1 i hver bibliotekbrønn i den nye NL PCR-platen.
- 13 Pipetter for å blande 5 ganger.
- 14 Påfør klebende plateforsegling på NL PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 15 Sett LNB1, LNA1, EE2, LNW1 og LNS1 tilbake til oppbevaring.

SIKKERT STOPPUNKT

Dersom du stopper, sentrifuger NL PCR-platen ved 280 x g i 1 minutt og oppbevar ved -25 °C til -15 °C i opptil 30 dager.

Stoppdato og -klokkeslett _____

Klargjøring til protokolltrinn

Start klargjøring av forbruksvarer for sekvensering fra NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) (PN 20028871) minst en time før bruk.

- 1 Ta biblioteksfortynningsbufferen (HT1) ut fra oppbevaring ved -25 °C til -15 °C, tin til romtemperatur, og legg deretter på is.
- 2 Følg klargjøringsinstruksjonene i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)* for andre forbruksvarer i settet.
 - ▶ NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser)
 - ▶ NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 sykluser)
 - ▶ NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 sykluser)
- 3 Fjern reagensrøret fra esken, og følg instruksjon for tining.

Tabell 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (i fryser) boks (PN 20031121)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
PhiX-interntroll (PhiX)	-25 °C til -15 °C	Tin til romtemperatur. Oppbevares på is.	Klargjøre til sekvensering

Tabell 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (i kjøleskap) boks (PN 20031123)

Reagens	Oppbevaring	Instruksjon for tining	Protokolltrinn
HP3	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Klargjøre til sekvensering
RSB (rosa etikett)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur.	Klargjøre til sekvensering

Klargjøre til sekvensering

Klargjøring

Startdato og -klokkeslett _____

- 1 Gjennomgå retningslinjene for antallet biblioteker og valg av indekser i *pakningsvedlegget for TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200007789)*.
- 2 Merk et mikrosentrifugerør dHP3 (fortynnet HP3).
- 3 Merk et mikrosentrifugerør dPhiX (fortynnet PhiX).
- 4 Forvarm en varmeblokk til 96 °C for mikrosentrifugeprøverør.
- 5 Klargjør en isbøtte.

Fortynne og denaturere PhiX-kontrollen

- 1 Bland ved å rotere HP3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 2 Kombiner følgende volumer i dHP3-mikrosentrifugerøret:
 - ▶ 10 µl HP3
 - ▶ 190 µl RNase-/DNase-fritt vann
- 3 Bland ved å rotere dHP3, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 4 Bland ved å vende eller rotere RSB.
- 5 Bland ved å rotere PhiX-kontrollen, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 6 Kombiner følgende volumer i dPhiX-mikrosentrifugerøret:
 - ▶ 8 µl RSB
 - ▶ 2 µl PhiX-kontroll
- 7 Tilsett 10 µl dHP3 i dPhiX-røret.
- 8 Kast dHP3-røret.
- 9 Bland ved å rotere dPhiX-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 10 Denaturer ved å inkubere dPhiX ved romtemperatur i 5 minutter.
- 11 Bland ved å rotere HT1.
- 12 Tilsett umiddelbart 980 µl forhåndskjølt HT1 i dPhiX.
- 13 Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 14 Legg dPhiX på is til det skal brukes i klargjøringen til den andre fortynningen.
Sluttkonsentrasjonen er 20 pM dPhiX.
- 15 Sett PhiX, HP3 og RSB tilbake til oppbevaring.

Poole og denaturere biblioteker

- 1 Tin NL PCR-platen til romtemperatur hvis den sto lagret, og sentrifuger deretter platen ved 280 × g i 1 minutt.
- 2 Bruk et flerkanals dråpetellersett ved 30 µl, og pipetter/bland bibliotekene forsiktig i NL PCR-platen 5 ganger.
Bruk nye spisser til hvert bibliotek.



FORSIKTIG

Sørg for å blande bibliotekbrønnene for optimal ytelse.

- 3 Velg ett av følgende alternativer for å poole, denaturere og fortynne bibliotekene.
 - ▶ **Alternativ 1:** Sekvenser biblioteker fra RNA-prøver og DNA-prøver samtidig. Se *Alternativ 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen på side 29*.
 - ▶ **Alternativ 2:** Sekvenser bare biblioteker fra DNA-prøver. Se *Alternativ 2: Bare DNA-biblioteker på side 30*.
 - ▶ **Alternativ 3:** Sekvenser bare biblioteker fra RNA-prøver. Se *Alternativ 3: Bare RNA-biblioteker på side 31*.

Alternativ 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen

- 1 Merk et mikrosentrifugerør PRL (Pooled RNA Libraries).
- 2 Merk et mikrosentrifugerør PDL (Pooled DNA Libraries).
- 3 Overfør 10 µl av hvert normalisert RNA (cDNA)-bibliotek fra NL-platen til PRL-røret.
Ikke pool to biblioteker med samme indeksprimer.

- 4 Overfør 10 µl av hvert normalisert DNA-bibliotek fra NL-platen til PDL-røret.
Ikke pool to biblioteker med samme indeksprimer.
- 5 Påfør klebende plateforsegling på NL PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 6 Bland ved å rotere hvert PRL- og PDL-rør.
- 7 Sentrifuger PRL- og PDL-rørene et kort øyeblikk.
- 8 Inkuber PRL- og PDL-rør i en varmeblokk ved 96 °C i 2 minutter.
- 9 Legg PRL og PDL på is i 5 minutter.
- 10 Bland ved å rotere PRL- og PDL-rørene, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 11 Sett PRL- og PDL-rørene på is.

Klargjøre første fortykning

- 1 Merk et 1,7 ml mikrosentrifugerør DIL1 (Dilution 1).
- 2 Overfør 20 µl PDL til det tomme DIL1-røret.
- 3 Tilsett 5 µl PRL i DIL1.
- 4 Kast PDL- og PRL-rørene.
- 5 Tilsett 475 µl forhåndskjølt HT1 i DIL1-røret (1:20 fortykning).
- 6 Bland ved å rotere DIL1-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Klargjøre andre fortykning

- 1 Merk et 2,0 ml mikrosentrifugerør DIL2 (Dilution 2).
- 2 Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-røret.
- 3 Kast DIL1-røret.
- 4 Tilsett 1660 µl forhåndskjølt HT1 i DIL2-røret (1:850 fortykning).
- 5 Bland ved å rotere klargjort 20 pM dPhiX, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 6 Tilsett 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX i DIL2-røret.
- 7 Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 8 Plasser 1300 µl DIL2 i den tinte NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser)
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)*.
- 9 Kast DIL2-røret.
- 10 Sentrifuger NL PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt, og lagre ved -25 °C til -15 °C i opptil 30 dager.
- 11 Gå videre til sekvensering.
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)*.

Alternativ 2: Bare DNA-biblioteker

- 1 Merk et mikrosentrifugerør PDL (Pooled DNA Libraries).
- 2 Overfør 10 µl av hvert normalisert DNA-bibliotek fra NL-platen til PDL-røret.
Ikke pool to biblioteker med samme indeksprimer.
- 3 Påfør klebende plateforsegling på NL PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 4 Bland ved å rotere PDL-røret.
- 5 Sentrifuger PDL-røret et kort øyeblikk.
- 6 Inkuber PDL-rør i en varmeblokk ved 96 °C i 2 minutter.
- 7 Legg PDL på is i 5 minutter.
- 8 Bland ved å rotere PDL-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 9 Legg PDL-røret tilbake på is.

Klargjøre første fortykning

- 1 Merk et 1,7 ml mikrosentrifugerør DIL1 (Dilution 1).
- 2 Overfør 10 µl PDL til det tomme DIL1-røret.

- 3 Kast PDL-røret.
- 4 Tilsett 190 µl forhåndskjølt HT1 i DIL1-røret (1:20 fortykning).
- 5 Bland ved å rotere DIL1, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Klargjøre andre fortykning

- 1 Merk et 2,0 ml mikrosentrifugerør DIL2 (Dilution 2).
- 2 Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-røret.
- 3 Kast DIL1-røret.
- 4 Tilsett 1660 µl forhåndskjølt HT1 i DIL2-røret (1:850 fortykning).
- 5 Roter klargjort 20 pM dPhiX, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 6 Tilsett 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX i DIL2-røret.
- 7 Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 8 Plasser 1300 µl DIL2 i den tinte NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser).
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)*.
- 9 Kast DIL2-røret.
- 10 Sentrifuger NL PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt, og oppbevar deretter ved –25 °C til –15 °C i opptil 30 dager.
- 11 Gå videre til sekvensering.
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)*.

Alternativ 3: Bare RNA-biblioteker

- 1 Merk et mikrosentrifugerør PRL (Pooled RNA Libraries).
- 2 Overfør 10 µl av hvert normalisert RNA (cDNA)-bibliotek fra NL-platen til PRL-røret.
Ikke pool to biblioteker med samme indeksprimer.
- 3 Påfør klebende plateforsegling på NL PCR-platen.
Forsegl kanter og brønner fullstendig.
- 4 Bland ved å rotere PRL-røret.
- 5 Sentrifuger PRL-røret et kort øyeblikk.
- 6 Inkuber PRL-rør i en varmeblokk ved 96 °C i 2 minutter.
- 7 Legg PRL på is i 5 minutter.
- 8 Bland ved å rotere PRL-røret, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 9 Legg PRL-røret tilbake på is.

Klargjøre første fortykning

- 1 Merk et 1,7 ml mikrosentrifugerør DIL1 (Dilution 1).
- 2 Overfør 10 µl PRL til det tomme DIL1-røret.
- 3 Kast PRL-røret.
- 4 Tilsett 190 µl forhåndskjølt HT1 i DIL1-røret (1:20 fortykning).
- 5 Bland ved å rotere DIL1, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.

Klargjøre andre fortykning

- 1 Merk et 2,0 ml mikrosentrifugerør DIL2 (Dilution 2).
- 2 Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-røret.
- 3 Kast DIL1-røret.
- 4 Tilsett 1646 µl forhåndskjølt HT1 i DIL2-røret (1:843 fortykning).
- 5 Roter klargjort 20 pM dPhiX, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 6 Tilsett 16,7 µl klargjort 20 pM dPhiX i DIL2-røret.
- 7 Roter for å blande, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- 8 Plasser 1300 µl DIL2 i den tinte NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykluser).
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)*.
- 9 Kast DIL2-røret.

- 10 Sentrifuger NL PCR-platen ved 280 × g i 1 minutt, og lagre ved –25 °C til –15 °C i opptil 30 dager.
- 11 Gå videre til sekvensering.
Du finner mer informasjon i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)*.

Patenter og varemerker

Dette dokumentet og dets innhold er opphavsrettslig beskyttet for Illumina, Inc. og tilknyttede selskaper («Illumina»), og er ment utelukkende for kontraktbruk av kunden i forbindelse med bruk av produktet (produktene) beskrevet her, og for intet annet formål. Dette dokumentet og dets innhold skal ikke brukes eller distribueres til andre formål og/eller på annen måte kommuniseres, fremlegges eller reproduseres på noen måte uten forutgående, skriftlig samtykke fra Illumina. Illumina overfører ikke noen lisens under sitt patent, varemerke, opphavsrett eller sedvanerett eller lignende rettigheter til tredjeparter gjennom dette dokumentet.

Instruksjonene i dette dokumentet skal følges strengt og tydelig av kvalifisert og tilfredsstillende utdannet personell for å sikre riktig og sikker bruk av produktet (produktene) som er beskrevet i dette dokumentet. Alt innhold i dette dokumentet skal leses fullt ut og være forstått før produktet (produktene) brukes.

HVIS DET UNNLATES Å LESE FULLSTENDIG OG UTTRYKkelig FØLGE ALLE INSTRUKSJONENE I DETTE DOKUMENTET, KAN DET FØRE TIL SKADE PÅ PRODUKTET (PRODUKTENE), SKADE PÅ PERSONER, INKLUDERT BRUKERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANNEN EIENDOM, OG DETTE VIL UGYLDIGGJØRE EVENTUELL GARANTI SOM GJELDER FOR PRODUKTET (PRODUKTENE).

ILLUMINA PÅTAR SEG IKKE ANSVAR SOM FØLGE AV FEIL BRUK AV PRODUKTET (PRODUKTENE) SOM ER BESKREVET I DETTE DOKUMENTET (INKLUDERT DELER AV DETTE ELLER PROGRAMVARE).

© 2022 Illumina, Inc. Med enerett.

Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. Ytterligere informasjon om varemerker finner du på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformasjon



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California, 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (utenfor Nord-Amerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Nederland

Produktmerking

Du finner en fullstendig liste over og forklaring på symboler som kan stå på produktemballasjen og i dokumentasjonen for settet du har, på support.illumina.com.