

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor ni similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en este de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS AL PRODUCTO, LESIONES A LAS PERSONAS, INCLUIDOS LOS USUARIOS Y OTROS, Y DAÑOS A OTRA PROPIEDAD.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA QUE SURJA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE) NI DEL USO DE DICHOS PRODUCTOS FUERA DEL ÁMBITO DE LAS LICENCIAS EXPRESAS ESCRITAS O LOS PERMISOS OTORGADOS POR ILLUMINA EN CONEXIÓN CON LA ADQUISICIÓN DE DICHOS PRODUCTOS POR PARTE DE LOS CLIENTES.

PARA USO EXCLUSIVO EN INVESTIGACIÓN

© 2013 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina, IlluminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSpPro, DASL, DesignStudio, Eco, GAIIX, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, el color naranja calabaza del diseño y el diseño de ondas de Genetic Energy son marcas comerciales registradas o marcas comerciales de Illumina, Inc. Todas las demás marcas y nombres mencionados en el presente documento pertenecen a sus respectivos propietarios.

Leer antes de usar este producto

Este producto, y su uso y disposición, están sujetos a los siguientes términos y condiciones. Si el comprador no acepta estos términos y condiciones, el comprador no contará con la autorización de Illumina para utilizar este producto, y no deberá utilizar este producto.

- Definiciones.** "**PI de aplicaciones específicas**" hace referencia a los derechos de propiedad intelectual que controla o posee Illumina que pertenecen a este producto (y al uso del mismo) solo en relación con aplicaciones específicas o campos específicos. La IP de aplicaciones específicas excluye la propiedad intelectual que controla o posee Illumina que cubre los aspectos o las características de este producto (o el uso del mismo) que son comunes a este producto en todas las posibles aplicaciones y todos los posibles campos de uso (la "**PI común**"). La PI de aplicaciones específicas y la PI común son subconjuntos separados y no superpuestos de todos los derechos de propiedad intelectual que controla o posee Illumina. A modo de ejemplo, pero sin limitarse a este, los derechos de propiedad intelectual de Illumina sobre métodos diagnósticos específicos, métodos forenses específicos o biomarcadores de ácido nucleico, secuencias o combinaciones de biomarcadores o secuencias específicas son ejemplos de una PI de aplicaciones específicas. "**Consumibles**" hacen referencia a los elementos fungibles y los reactivos de marca Illumina que ha concebido Illumina para su uso junto con el hardware, así como para su consumo mediante el uso del hardware. "**Documentación**" comprende el manual del usuario de Illumina correspondiente a este producto, incluido, entre otros, los prospectos y cualquier otro tipo de documentación que se adjunte a este producto, al que el producto haga referencia o se encuentre en el embalaje del mismo vigentes en la fecha de envío de Illumina. La documentación incluye este documento. "**Hardware**" engloba los instrumentos, accesorios o periféricos de marca Illumina. "**Illumina**" hace referencia a Illumina, Inc. o a un afiliado de Illumina, según corresponda. "**Producto**" comprende el producto al que se adjunta este documento (por ejemplo, hardware, consumibles o software). "**Comprador**" es la persona o entidad que adquiere de manera legal y correcta este producto de Illumina o de un distribuidor autorizado de Illumina. "**Software**" hace referencia al software de marca Illumina (por ejemplo, el software que opera el hardware o el software de análisis de datos). Todo el software se concede mediante licencia y no se vende, al tiempo que puede estar sujeto a términos adicionales que figuren en el acuerdo de licencia del usuario final del software. "**Especificaciones**" incluye las especificaciones escritas de Illumina con respecto a este producto vigentes en la fecha de envío del producto por parte de Illumina.
- Derechos para uso exclusivo en investigación.** De conformidad con estos términos y condiciones y, a menos que se acuerde lo contrario por escrito a través de un funcionario de Illumina, al comprador solo se le concede un derecho no exclusivo, no transferible, personal y sin posibilidad de sublicencia sobre la PI común de Illumina, existente en la fecha de envío de este producto por parte de Illumina, con el único fin de utilizar este producto en las instalaciones del comprador para los fines de investigación interna del comprador (que incluye los servicios de investigación prestados a terceros) y solo conforme a la documentación de este producto, **pero excluyendo de manera específica cualquier uso que** (a) requiriera derechos o una licencia por parte de Illumina sobre una PI de aplicaciones específicas, (b) constituya un nuevo uso de un consumible utilizado previamente, (c) constituya el desmontaje, la ingeniería inversa, la compilación inversa o el montaje inverso de este producto, (d) constituya la separación, la extracción o el aislamiento de los componentes de este producto o de otros análisis no autorizados de este producto, (e) conceda acceso a los métodos de funcionamiento de este producto o determine dichos métodos, (f) constituya el uso de consumibles o reactivos que no sean de Illumina con el hardware de Illumina (no se aplica si las especificaciones o la documentación disponen lo contrario), o bien (g) constituya la transferencia a un tercero, o la sublicencia, del software o cualquier software de terceros. Todo el software, ya se proporcione por separado, se instale o se incorpore en un producto, se otorga en forma de licencia al comprador y no se vende. Salvo que se estipule de manera expresa en esta sección, ningún derecho ni ninguna licencia de los derechos de propiedad intelectual de Illumina se otorgan de manera expresa, implícita o por impedimento legal (estoppel).



El comprador solo será responsable de determinar si el comprador posee todos los derechos de propiedad intelectual necesarios para los usos previstos de este producto por parte del comprador, incluidos entre otros, cualquier derecho de terceros o derechos en relación con la PI de aplicaciones específicas. Ilumina no garantiza que los usos previstos específicos del comprador no infrinjan los derechos de propiedad intelectual de un tercero o de una PI de aplicaciones específicas.

- 3 **Conformidad normativa.** Este producto no se ha aprobado, autorizado ni se le ha otorgado licencia alguna por parte de la Food and Drug Administration (FDA) de EE. UU. o de cualquier otra entidad regulatoria, ya sea extranjera o nacional, para ningún uso previsto específico, bien para su uso en investigación, uso comercial, uso diagnóstico o de cualquier otro tipo. Este producto contiene la etiqueta "Para uso exclusivo en investigación". El comprador debe asegurarse de que cuenta con todas las aprobaciones regulatorias pertinentes para los usos previstos de este producto por parte del comprador.
- 4 **Usos no autorizados.** El comprador acepta: (a) utilizar cada consumible solo una vez, y (b) utilizar solo consumibles o reactivos de Ilumina con el hardware de Ilumina. Las limitaciones en (a)-(b) no se aplican si la documentación o las especificaciones de este producto disponen lo contrario. El comprador acepta no involucrarse en ninguna de las siguientes actividades, ni tampoco autoriza a ningún tercero a involucrarse en ninguna de las mismas: (i) desmontar, llevar a cabo actos de ingeniería inversa, compilación inversa o montaje inverso del producto, (ii) separar, extraer o aislar componentes de este producto, o bien someter a este producto o a sus componentes a cualquier análisis que no se haya autorizado expresamente en la documentación de este producto, (iii) otorgar acceso a los métodos de funcionamiento de este producto o intentar determinarlos, o bien (iv) transferir a un tercero, o conceder una sublicencia, en relación con cualquier software o cualquier software de terceros. Además, el comprador acepta que el contenido y los métodos de funcionamiento de este producto son propiedad de Ilumina y que este producto contiene o incluye secretos de mercado de Ilumina. Las condiciones y restricciones que figuran en estos términos y condiciones se negocian como condiciones de venta y, por tanto, controlan la venta de este producto, así como su uso por parte del comprador.
- 5 **Limitación de responsabilidades. EN LA MEDIDA EN QUE LO PERMITA LA LEY, EN NINGÚN CASO SE CONSIDERARÁ RESPONSABLE A ILLUMINA NI A SUS PROVEEDORES EN RELACIÓN CON EL COMPRADOR O CUALQUIER TERCERO DE LOS COSTES DE GESTIÓN DE SUSTITUCIÓN DE PRODUCTOS O SERVICIOS, DE LA PÉRDIDA DE BENEFICIOS, DATOS U OPERACIONES COMERCIALES, NI DE NINGÚN DAÑO INDIRECTO, ESPECIAL, ACCIDENTAL, EJEMPLAR, CONSECUENTE O PUNITIVO DE NINGÚN TIPO DERIVADO DE O RELACIONADO CON, ENTRE OTROS, LA VENTA DE ESTE PRODUCTO, SU USO, EL CUMPLIMIENTO DE ILLUMINA DE LA PRESENTE NI DE CUALQUIERA DE ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, YA SE DERIVEN O PROCEDAN DE CUALQUIER PRINCIPIO DE RESPONSABILIDAD (BIEN POR CONTRATO, DELITO [INCLUIDA LA NEGLIGENCIA], RESPONSABILIDAD ESTRICTA O CUALQUIER OTRO TIPO DE RESPONSABILIDAD).**
- 6 **LA RESPONSABILIDAD TOTAL Y ACUMULATIVA DE ILLUMINA CON RESPECTO AL COMPRADOR O CUALQUIER TERCERO DERIVADA DE, O EN RELACIÓN CON, ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, INCLUIDOS, ENTRE OTROS, ESTE PRODUCTO (INCLUIDO EL USO DEL MISMO) Y EL CUMPLIMIENTO DE ILLUMINA CONFORME A LA PRESENTE, YA SEA POR CONTRATO, DELITO (INCLUIDA LA NEGLIGENCIA), RESPONSABILIDAD ESTRICTA O CUALQUIER OTRO TIPO DE RESPONSABILIDAD, NO SUPERARÁ EN NINGÚN CASO LA CANTIDAD PAGADA A ILLUMINA POR ESTE PRODUCTO.**
- 7 **Limitaciones sobre las garantías concedidas por Ilumina. EN LA MEDIDA QUE LO PERMITA LA LEY Y SUJETO A LA GARANTÍA EXPRESA DEL PRODUCTO QUE FIGURA EN ESTOS TÉRMINOS Y CONDICIONES, ILLUMINA NO OTORGA NINGUNA GARANTÍA (Y RENUNCIA DE MANERA EXPRESA A CUALQUIER GARANTÍA), YA SEA EXPRESA, IMPLÍCITA O LEGAL, EN RELACIÓN CON ESTE PRODUCTO, INCLUIDAS ENTRE OTRAS, CUALQUIER GARANTÍA IMPLÍCITA DE COMERCIALIZACIÓN, IDONEIDAD PARA UN PROPÓSITO PARTICULAR, DE NO INFRACCIÓN O DERIVADA DE UN RENDIMIENTO, ACUERDO, USO O TRANSACCIÓN COMERCIAL. SIN LIMITAR LA GENERALIDAD DE LO DISPUESTO**

ANTERIORMENTE, ILLUMINA NO AFIRMA, REPRESENTA NI GARANTIZA DE NINGUNA MANERA LA UTILIDAD DE ESTE PRODUCTO PARA LOS USOS PREVISTOS DEL COMPRADOR.

- 8 **Garantía del producto.** Todas las garantías son personales en relación con el comprador y no se pueden transferir ni asignar a un tercero, incluido un afiliado del comprador. Todas las garantías son específicas de las instalaciones y no se transfieren si el producto se traslada a otra instalación del comprador, a menos que Illumina efectúe dicho traslado.
- a **Garantía de los consumibles.** Illumina garantiza que los consumibles, que no sean consumibles personalizados, cumplirán sus especificaciones hasta un periodo de (i) 3 meses a partir de la fecha de envío por parte de Illumina, y (ii) cualquier fecha de caducidad o el final de su vida útil impresa previamente en dicho consumible por parte de Illumina, pero en ningún caso será superior a un periodo de 12 meses a partir de la fecha de envío. En relación con los consumibles personalizados (esto es, consumibles fabricados de acuerdo con las especificaciones o los diseños elaborados por el comprador o que el comprador, o alguna entidad en su nombre, proporciona a Illumina), Illumina solo garantiza que los consumibles personalizados se fabricarán y probarán de acuerdo con los procesos de control de calidad y fabricación estándar de Illumina. Illumina no garantiza que los consumibles personalizados funcionen de manera prevista por el comprador o para los usos previstos del comprador.
 - b **Garantía del hardware.** Illumina garantiza que el hardware, siempre que no se trate de componentes actualizados, cumplirá sus especificaciones durante un periodo de 12 meses tras la fecha de envío por parte de Illumina, a menos que el hardware incluya la instalación ofrecida por Illumina, en cuyo caso el periodo de garantía comienza en la fecha de instalación o 30 días después de la fecha de envío, lo que ocurra primero ("Garantía básica del hardware"). El término "componentes actualizados" hace referencia a los componentes, las modificaciones o las mejoras de Illumina en el hardware que el comprador haya adquirido previamente. Illumina garantiza que los componentes actualizados cumplirán sus especificaciones durante un periodo de 90 días a partir de la fecha de instalación de dichos componentes actualizados. Los componentes actualizados no amplían el periodo de garantía del hardware a menos que la actualización la haya llevado a cabo Illumina en las instalaciones de Illumina, en cuyo caso el hardware actualizado enviado al comprador incorporará una garantía básica del hardware.
 - c **Exclusiones de la cobertura de la garantía.** Las anteriores garantías no se aplican en la medida en que un incumplimiento se deba a (i) un abuso, uso indebido, abandono, negligencia, accidente, almacenamiento inadecuado o un uso contrario a las disposiciones de la documentación o las especificaciones, (ii) una manipulación, instalación, mantenimiento o reparación indebidas (que no sean realizadas por el personal de Illumina), (iii) alteraciones no autorizadas, (iv) sucesos de fuerza mayor, o bien (v) su uso con un producto de terceros no suministrado por Illumina (a menos que la documentación o las especificaciones del producto dispongan de manera expresa que dicho producto de tercero es para su uso con el producto).
 - d **Procedimiento para la cobertura de la garantía.** Con el objeto de ser apto para cualquier servicio de reparación o sustitución conforme a esta garantía, el comprador debe (i) ponerse en contacto con la mayor brevedad posible con el departamento de asistencia de Illumina para informarle del incumplimiento, (ii) cooperar con Illumina en la confirmación o el diagnóstico del incumplimiento y (iii) devolver este producto, con pago previo de los costes de transporte a Illumina de acuerdo con las instrucciones de Illumina o, si se acuerda entre Illumina y el comprador, conceder acceso a este producto al personal de reparación autorizado de Illumina con el objeto de confirmar el incumplimiento y realizar las reparaciones pertinentes.
 - e **Único recurso legal conforme a la garantía.** Según su criterio, Illumina reparará o sustituirá el producto no conforme a las especificaciones que se confirme que está cubierto por esta garantía. Los consumibles reparados o sustituidos ofrecen una garantía de 30 días. El hardware se puede reparar o sustituir por un hardware o componentes funcionalmente equivalentes, reacondicionados o nuevos (solo si un componente del hardware no cumple las especificaciones). Si el hardware se sustituye en su totalidad, el periodo de garantía correspondiente a la sustitución es de 90 días a partir de la fecha de envío o el periodo restante de la garantía del hardware original, lo que sea más breve. Si solo se repara o sustituye un componente, el periodo de garantía de dicho componente será de 90 días a partir de la fecha de envío o el periodo restante de la garantía del hardware original, lo que finalice antes. Las

anteriores disposiciones establecen la única solución del comprador y las únicas obligaciones de Illumina conforme a la garantía que se otorga por la presente.

- f **Productos de terceros y garantía.** Illumina no tiene ninguna obligación de garantía en relación con ningún producto procedente de un tercero y que se suministre al comprador de acuerdo con los presentes términos y condiciones. Los productos de terceros son aquellos que están etiquetados o se comercializan con el nombre de un tercero. La garantía de los productos de terceros, si la hubiera, la proporciona el fabricante original. Mediante una solicitud por escrito, Illumina intentará transferir dicha garantía al comprador.

9 **Indemnización.**

- a **Indemnización por infracción por parte de Illumina.** Conforme a estos términos y condiciones, incluidas entre otras, las exclusiones de las obligaciones de indemnización de Illumina (sección 9(b) más adelante) y las condiciones de obligación de indemnización (sección 9(d) a continuación), Illumina (i) defenderá, indemnizará y eximirá al comprador frente a cualquier reclamación o demanda de terceros en la que se alegue que este producto, al utilizarse con fines de investigación, de acuerdo con estos términos y condiciones y de acuerdo con la documentación y las especificaciones de este producto, infringe los derechos de propiedad intelectual válidos y ejecutables de un tercero, y (ii) pagará todas las liquidaciones derivadas, y todos los costes y juicios finales (incluidos los honorarios razonables de los abogados) que se le imputen al comprador en relación con dicha reclamación de infracción. Si este producto, o alguna de sus partes, pasa a ser, o según la opinión de Illumina puede ser, el objeto de una reclamación por infracción, Illumina tendrá derecho, según su propio criterio, a (A) procurar al comprador el derecho a continuar utilizando este producto, (B) modificar o sustituir este producto con una sustitución no infractora sustancialmente equivalente, o bien (C) solicitar la devolución de este producto y finalizar los derechos, la licencia y cualquier otro permiso otorgado al comprador en relación con este producto, así como a reembolsar al comprador el valor depreciado (tal como se muestra en los registros oficiales del comprador) del producto devuelto en el momento de dicha devolución; siempre que, no se otorgue ningún tipo de reembolso para consumibles utilizados o caducados. Esta sección establece la responsabilidad total de Illumina por cualquier infracción de derechos de propiedad intelectual de terceros.
- b **Exclusiones de obligaciones de indemnización por parte de Illumina.** Illumina no tiene la obligación de defender, indemnizar ni eximir al comprador frente a ninguna reclamación por infracción de Illumina en la medida en que dicha infracción se deba a los siguientes casos: (i) el uso de este producto en una manera o para un propósito que se encuentre fuera del ámbito de la finalidad de uso para investigación, (ii) el uso de este producto en una manera que no sea conforme a sus especificaciones, su documentación, los derechos concedidos de manera expresa al comprador conforme estos términos y condiciones, o cualquier infracción por parte del comprador de estos términos y condiciones, (iii) el uso de este producto junto con cualquier otro producto, material o servicio no prestados por Illumina, (iv) el uso de este producto para realizar un ensayo u otro proceso no proporcionado por Illumina, o bien (v) el cumplimiento de las especificaciones o instrucciones por parte de Illumina para este producto que ha proporcionado el comprador, o que se han proporcionado en su nombre (las condiciones de (i) a (v) se denominan "reclamación excluida").
- c **Indemnización por parte del comprador.** El comprador defenderá, indemnizará y eximirá a Illumina, sus afiliados, sus colaboradores no afiliados y los socios de desarrollo que contribuyeron al desarrollo de este producto, así como a sus funcionarios, directores, representantes y empleados correspondientes frente a cualquier reclamación, responsabilidad, daño, multa, pena, demanda y pérdida de cualquier tipo, incluidos entre otros, reclamaciones por daños personales o muerte y la infracción de los derechos de propiedad intelectual de terceros, que se deriven, estén relacionados o procedan de (i) una infracción por parte del comprador de cualquiera de estos términos y condiciones, (ii) el uso del comprador de este producto fuera del ámbito de su uso para investigación, (iii) cualquier uso de este producto que no sea conforme a las especificaciones o la documentación de este documento, o bien (iv) cualquier reclamación excluida.
- d **Condiciones para obligaciones de indemnización.** Las obligaciones de indemnización de las partes estarán condicionadas por las siguientes acciones de la parte que solicita la indemnización: (i) notificación inmediata a la otra parte por escrito de dicha reclamación o demanda, (ii) concesión de autorización y control exclusivo a la otra parte

sobre la defensa y arreglo de cualquier reclamación o demanda, (iii) no admisión de la infracción de ningún derecho de propiedad intelectual sin el consentimiento previo por escrito de la otra parte, (iv) la no negociación de ningún acuerdo o compromiso en relación con dicha reclamación o demanda sin el consentimiento previo por escrito de la otra parte y (v) la prestación de asistencia razonable a la otra parte en la defensa de la reclamación o demanda; siempre que, la parte reembolse a la parte indemnizada los gastos razonables complementarios que se deriven de la prestación de dicha asistencia.

- e **Productos de terceros e indemnización.** Illumina no tiene ninguna obligación de indemnización en relación con ningún producto procedente de un tercero y que se suministre al comprador. Los productos de terceros son aquellos que están etiquetados o se comercializan con el nombre de un tercero. Los derechos de indemnización del comprador, si los hubiera, en relación con los productos de terceros serán conforme a la indemnización del propietario de la patente o del fabricante original. Mediante una solicitud por escrito, Illumina intentará transferir dicha indemnización, si la hubiera, al comprador.

Historial de revisiones

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15046433_ESP	A	Octubre de 2013	Publicación inicial

Índice

Historial de revisiones	viii
Índice	ix
Capítulo 1 Descripción general	1
Introducción	2
Recomendaciones de entrada de ADN	3
Pasos fundamentales para un enriquecimiento y cobertura satisfactorios	4
Recursos adicionales	5
Capítulo 2 Protocolo	7
Introducción	8
Flujo de trabajo de la preparación de bibliotecas	9
Marcado de ADN genómico	10
Limpieza de ADN marcado	14
Primera amplificación PCR	17
Primera limpieza de PCR	22
Primera hibridación	28
Primera captura	32
Segunda hibridación	38
Segunda captura	40
Limpieza de muestras de captura	46
Segunda amplificación PCR	49
Segunda limpieza de PCR	52
Validación de bibliotecas	55
Preparación de bibliotecas para la secuenciación en un MiSeq	58
Biblioteca de secuencias	60
Apéndice A Información complementaria	61
Introducción	62
Acrónimos	63
Ciclador térmico alternativo: pasos para un enriquecimiento adecuado	65
Contenido del kit	66
Consumibles y equipos	71
Secuencias de índice	75
Asistencia técnica	77

X

N.º de referencia 15046431 Rev. A ESP

Descripción general

Introducción	2
Recomendaciones de entrada de ADN	3
Pasos fundamentales para un enriquecimiento y cobertura satisfactorios	4
Recursos adicionales	5



Introducción

Este protocolo explica cómo preparar hasta 36 bibliotecas "paired-end" indexadas, seguido de enriquecimiento mediante el panel de secuenciación TruSight One™ y los reactivos suministrados en un kit de Illumina Panel de secuenciación TruSight One. El objetivo de este protocolo es fragmentar y añadir secuencias de adaptadores a la plantilla de ADN para generar bibliotecas indexadas que se puedan someter al enriquecimiento para aplicaciones de resecuenciación objetivo.

El protocolo de Panel de secuenciación TruSight One ofrece:

- ▶ Preparación de muestras rápida y sencilla.
 - Preparación de un máximo de 36 bibliotecas enriquecidas en aproximadamente 1,5 días, con unas 5 horas de tiempo de participación activa.
 - Procedimientos de alto rendimiento y fácilmente automatizables sin cuellos de botella en la fragmentación.
- ▶ Entrada de ADN baja y una calidad de datos excelente.
 - Calidad de datos excelente con entrada baja de 50 ng.
 - Muestras de acceso valiosas sin influencia en el rendimiento.
 - Capacidad para archivar muestras para análisis posteriores.
- ▶ Tasas de enriquecimiento altas, duplicados inferiores y uniformidad de cobertura excepcional.
 - Uso eficaz de la secuenciación.
 - Detección de variantes fiable.
 - Reducción del tiempo de participación activa con un flujo de trabajo más rentable y de mayor rendimiento.

Recomendaciones de entrada de ADN

En la preparación de la biblioteca de TruSight One se emplea un paso de fragmentación del ADN enzimática y, por tanto, puede ser más sensible a la entrada de ADN en comparación con los métodos de fragmentación mecánicos. El éxito final del enriquecimiento depende en gran medida del uso de una cantidad cuantificada con precisión del ADN de entrada. Por lo tanto, es fundamental una cuantificación precisa del gADN.

Illustra recomienda cuantificar el gADN inicial mediante un método basado en la fluorimetría específico para ADN de cadena doble (ADNds), así como analizar muestras por triplicado para obtener más mediciones fiables. Se deben evitar los métodos que miden el contenido de ácido nucleico total (por ejemplo, NanoDrop u otros métodos de absorbancia de UV), ya que los contaminantes comunes, como ssADN, ARN y oligonucleótidos, no son sustratos para Panel de secuenciación TruSight One.

Se ha optimizado el protocolo de TruSight One para 50 ng de gADN total. Una entrada de masa superior de gADN puede dar como resultado un marcado incompleto y tamaños de fragmentos más grandes, lo que puede afectar al rendimiento de enriquecimiento. Al contrario, una entrada de masa inferior de gADN o la baja calidad de gADN en la reacción de marcado puede generar tamaños de fragmentos más pequeños de lo esperado, que pueden perderse durante los pasos de limpieza posteriores y derivar en una diversidad inferior.

Para minimizar la variabilidad de la entrada de muestras de gADN en el paso de marcado, Illustra recomienda encarecidamente un método de dos pasos de normalización de gADN. Tras la cuantificación inicial, las muestras de gADN se normalizan primero en 10 ng/ μ l. A continuación, las muestras se vuelven a cuantificar mediante un método basado en fluorimetría similar y se normalizan finalmente en 5 ng/ μ l.

Pasos fundamentales para un enriquecimiento y cobertura satisfactorios

Para garantizar el rendimiento sólido de Panel de secuenciación TruSight One, Illumina recomienda el uso de un sistema de microcalentamiento con una inserción de placa MIDI para los pasos de lavado de enriquecimiento. Los pasos del lavado de enriquecimiento reducen la unión del ADN no específico y requieren que las muestras se conserven a la temperatura indicada. Temperaturas demasiado altas o demasiado bajas pueden originar porcentajes de enriquecimiento inferiores y la disminución de rendimientos. Si no se dispone de un sistema de microcalentamiento, se puede usar un ciclador térmico con algunas modificaciones. Consulte *Ciclador térmico alternativo: pasos para un enriquecimiento adecuado* en la página 65 para obtener instrucciones sobre el uso de un ciclador térmico.

Obtención de lecturas deseadas por muestra:

El número de lecturas resultantes para cada muestra de una agrupación depende de los factores siguientes:

- ▶ Cuantificación precisa de muestras marcadas antes de la agrupación para el enriquecimiento. Una cuantificación imprecisa puede derivar en una agrupación desigual entre muestras en el enriquecimiento y puede ocasionar unas lecturas inferiores a las esperadas para una muestra determinada.
- ▶ Cuantificación precisa de agrupaciones de bibliotecas enriquecidas finales. Illumina recomienda el uso de la misma dilución de la biblioteca final tanto para la cuantificación como para la generación de grupos. La cuantificación imprecisa puede derivar en densidades de grupos objetivo inferiores a las deseadas, en un número inferior de lecturas que superen el filtro o en una demultiplexación ineficaz en caso de una generación excesiva de grupos. Illumina recomienda alcanzar el objetivo de 1200k-1400k grupos/mm² (densidad aparente) en experimentos de MiSeq v3[®], a pesar de que la densidad de grupos óptima puede variar entre distintos instrumentos.

Recursos adicionales

Los recursos siguientes están disponibles para la guía de protocolo de Panel de secuenciación TruSight One y el seguimiento de muestras. Acceda a estos y otros recursos en el sitio web de Illumina en support.illumina.com/sequencing/kits.ilmn. A continuación, seleccione **Panel de secuenciación TruSight One** (Asistencia) **Support** (Asistencia).

Recurso	Descripción
Mejores prácticas	<p>Ofrece las mejores prácticas específicas de este protocolo. Revise esta sección antes de iniciar la preparación de muestras. Temas que se incluyen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Coherencia • Manipulación de bolas magnéticas • Procedimientos para evitar la contaminación cruzada • Lavado durante la limpieza de SPB • Congelación/descongelación de una pequeña cantidad de muestras • Prevención de contaminación de productos de PCR <p>Haga clic en Best Practices (Mejores prácticas) en la página de asistencia Panel de secuenciación TruSight One Support.</p>
Tarjeta de usuario experimentado y formulario de seguimiento de laboratorio de Panel de secuenciación TruSight One (n.º de referencia 15046433)	<p>Ofrece instrucciones del protocolo, pero de forma menos detallada que en la guía del usuario. A los usuarios nuevos o con menos experiencia se les recomienda encarecidamente que sigan esta guía del usuario y no la EUC y el LTF.</p> <p>Haga clic en Documentation & Literature (Documentación) en la página de asistencia Panel de secuenciación TruSight One Support.</p>
Illumina Experiment Manager (IEM) Tarjeta de referencia rápida de captura rápida TruSight o IEM TruSight One (n.º de referencia 15048138)	<p>Le permite crear y editar hojas de muestras adecuadas para el software de análisis y secuenciadores de Illumina y registrar los parámetros para su placa de muestras.</p> <p>Para descargar el software, haga clic en Downloads (Descargas) en la página de asistencia Panel de secuenciación TruSight One Support.</p> <p>Para descargar la documentación, haga clic en Documentation & Literature (Documentación) en la página de asistencia Panel de secuenciación TruSight One Support.</p>

Protocolo

Introducción	8
Flujo de trabajo de la preparación de bibliotecas	9
Marcado de ADN genómico	10
Limpieza de ADN marcado	14
Primera amplificación PCR	17
Primera limpieza de PCR	22
Primera hibridación	28
Primera captura	32
Segunda hibridación	38
Segunda captura	40
Limpieza de muestras de captura	46
Segunda amplificación PCR	49
Segunda limpieza de PCR	52
Validación de bibliotecas	55
Preparación de bibliotecas para la secuenciación en un MiSeq	58
Biblioteca de secuencias	60



Introducción

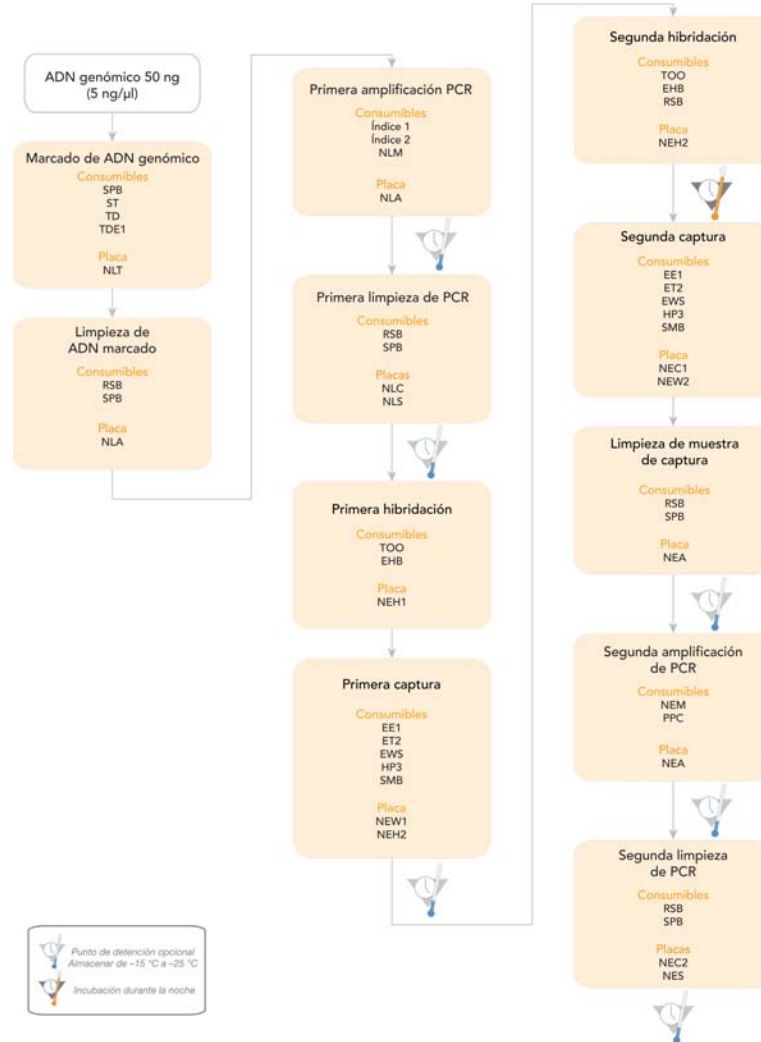
Este capítulo describe del protocolo de TruSight One.

- ▶ Revise las mejores prácticas antes de seguir. Consulte *Recursos adicionales* en la página 5 para obtener más información sobre cómo acceder a las Mejores prácticas de Panel de secuenciación TruSight One en el sitio web de Illumina.
- ▶ Siga los protocolos en el orden mostrado, con los volúmenes especificados y los parámetros de incubación.
- ▶ Si está realizando agrupaciones, registre la información acerca de las muestras antes de iniciar la preparación de bibliotecas para un uso posterior en los análisis de datos.
 - Utilice IEM para crear y editar hojas de muestras bien formadas para software de análisis y secuenciadores de Illumina. Los procedimientos detallados sobre cómo crear una hoja de muestras para Panel de secuenciación TruSight One están disponibles en una tarjeta de referencia rápida de IEM. Consulte *Recursos adicionales* en la página 5 para obtener más información sobre cómo descargar el software de IEM y la documentación de IEM apropiada de TruSight One del sitio web de Illumina.
 - Cada columna debe contener un índice común. Esto facilitará las operaciones de pipeteo cuando se dispensen adaptadores indexados y al agrupar bibliotecas indexadas en el protocolo.

Flujo de trabajo de la preparación de bibliotecas

El diagrama siguiente ilustra el flujo de trabajo cuando se usa un kit de Panel de secuenciación TruSight One. Los puntos de detención segura se marcan entre los pasos.

Figura 1 Flujo de trabajo de TruSight One



Marcado de ADN genómico

En este proceso se marca (marca y fragmentos) el gADN mediante el transposoma de Nextera. El transposoma de Nextera fragmenta de manera simultánea el gADN y añade secuencias de adaptadores a los extremos, lo que permite la amplificación mediante PCR en los procesos posteriores.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Bolas de purificación de muestras (SPB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina
Tampón de marcado de detención (ST)	1 tubo	Entre 15 °C y 30 °C	Illumina
Tampón de ADN marcado (TD)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Enzima de ADN marcado (TDE1)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Placa MIDI de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
gADN (5 ng/μl)	50 ng	Entre -15 °C y -25 °C	Usuario
Cubitera	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Agua apta para PCR	10 μl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (para procesar diversas muestras)	3	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósito de reactivos sin ARNasa/ADNasa (para procesamiento de varias muestras)	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tris-HCl 10 mM, pH 8,5	Según sea necesario	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire el tampón de ADN marcado, la enzima de ADN marcado 1 y el gADN almacenados a una temperatura de -15 °C a -25 °C y descongele en hielo.
 - Tras la descongelación, asegúrese de que todos los reactivos se mezclan de forma adecuada. Invierta con cuidado los tubos de 3 a 5 veces y, a continuación, agítelos brevemente en una microcentrífuga.
- ▶ Extraiga las bolas de purificación de muestras almacenadas a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y deje que alcancen la temperatura ambiente.
- ▶ Asegúrese de que el tampón de marcado de detención no presenta precipitados. Si los hubiera, agite hasta que todas las partículas se resuspendan.
- ▶ Para el procesamiento de varias muestras:
 - Utilice una pipeta multicanal.
 - Distribuya el tampón de marcado de detención, el tampón de ADN marcado y la enzima de ADN marcado 1 en gradillas de ocho tubos separadas y dispense volúmenes equivalentes en cada uno de los pocillos.
 - Vierta las bolas de purificación de muestras en un depósito de reactivos multicanal.
- ▶ Coloque una inserción de placa MIDI en el sistema de microcalentamiento.
- ▶ Caliente previamente el sistema de microcalentamiento a 58 °C .
- ▶ Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como **NLT** (marcado de biblioteca Nextera) con un rotulador permanente.

- ▶ Utilice el Illumina Experiment Manager para determinar los cebadores de índice que se deben utilizar. Para obtener más información sobre IEM, consulte *Recursos adicionales* en la página 5.



ADVERTENCIA

Permitir que la enzima de ADN marcado 1 se caliente hasta alcanzar la temperatura ambiente podría derivar en una disminución de la actividad.

Procedimiento



NOTA

Asegúrese de que la reacción se prepara en el orden descrito para obtener un rendimiento óptimo del kit. No es necesario preparar la reacción en hielo.

- 1 Realice los pasos siguientes para normalizar las muestras de gADN:
 - a Cuantifique las muestras de gADN mediante un método fluorimétrico, como QuantiFluor o Qubit.
 - b Normalice las muestras de gADN en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 a 10 ng/μl.
 - c Recuantifique la muestra normalizada de 10 ng/μl mediante el mismo método de cuantificación fluorimétrico.
 - d En función de la cuantificación, diluya las muestras de gADN en Tris-HCl 10 mM, pH 8,5 en un volumen final de 10 μl a 5 ng/μl (50 ng total).
- 2 Añada 10 μl de gADN a 5 ng/μl (50 ng en total) a cada pocillo de la nueva placa MIDI de 96 pocillos etiquetada como NLT.
- 3 Añada 25 μl de tampón de ADN marcado a cada pocillo de la placa NLT.
- 4 Añada 5 μl de enzima de ADN marcado 1 a cada pocillo de la placa NLT.
- 5 Añada 10 μl de agua apta para PCR a cada pocillo de la placa NLT.
- 6 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NLT con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NLT en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 1 minuto.
- 7 Centrifugue la placa NLT a 280 × g durante 1 minuto.
- 8 Coloque la placa NLT sellada en el sistema de microcalentamiento calentado previamente. Cierre la tapa e incube a 58 °C durante 10 minutos.

- 9 Extraiga la placa NLT del sistema de microcalentamiento.
- 10 Extraiga el sello adhesivo de la placa NLT.
- 11 Añada 15 μ l de tampón de marcado de detención a cada pocillo de la placa NLT.
- 12 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NLT con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NLT en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 1 minuto.
- 13 Centrifugue la placa NLT a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 14 Incube la placa NLT a temperatura ambiente durante 4 minutos.
- 15 Prosiga con la *Limpieza de ADN marcado* en la página 14.

Limpieza de ADN marcado

En este proceso se purifica el ADN marcado en el transposoma de Nextera. Este paso es crítico porque el transposoma de Nextera se puede unir fuertemente a los extremos del ADN e interferirá en los procesos descendentes si no se elimina.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Bolas de purificación de muestras (SPB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina
Placa de carcasa dura (HSP) de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Etolol (EtOH) recién preparado al 80 %	400 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (para procesamiento de varias muestras)	3	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Extraiga el tampón de resuspensión almacenado a una temperatura de -15 °C a -25 °C y descongele a temperatura ambiente.




NOTA

El tampón de resuspensión se puede almacenar a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C tras la descongelación inicial.

- ▶ Consulte las mejores prácticas para la *manipulación de bolas magnéticas*. Consulte *Recursos adicionales* en la página 5 para obtener información sobre cómo acceder a las mejores prácticas de TruSight One en el sitio web Illumina.

- ▶ Asegúrese de que las bolas de purificación de muestras se encuentran a temperatura ambiente.
- ▶ Para el procesamiento de varias muestras:
 - Utilice una pipeta multicanal.
 - Vierta el tampón de resuspensión, las bolas de purificación de muestras y el EtOH al 80 % en depósitos de reactivos multicanal separados.
- ▶ Etiquete una nueva placa HSP de 96 pocillos como NLA (amplificación de biblioteca Nextera) con un rotulador permanente.

Procedimiento

- 1 Extraiga el sello adhesivo de la placa NLT.
 - 2 Agite las bolas de purificación de muestras a temperatura ambiente hasta que estén bien dispersas.
- 

NOTA
Mantenga el tubo de bolas de purificación de muestras a temperatura ambiente para usarlo posteriormente en el protocolo.
- 3 Añada 65 μ l de bolas de purificación de muestras bien resuspendidas a cada pocillo de la placa NLT.
 - 4 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NLT con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NLT en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 1 minuto.
 - 5 Incube la placa NLT a temperatura ambiente durante 8 minutos.
 - 6 Centrifugue la placa NLT a $280 \times g$ durante 1 minuto.
 - 7 Extraiga el sello adhesivo de la placa NLT.
 - 8 Coloque la placa en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
 - 9 Con una pipeta monocanal o multicanal de 200 μ l establecida en 130 μ l, extraiga y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa NLT.



NOTA
Deje la placa NLT en el soporte magnético mientras lleva a cabo los siguientes pasos de lavado de EtOH al 80 % (10-12).

- 10 Con la placa NLT en el soporte magnético, añada lentamente 200 μl de EtOH al 80 % recién preparado a cada pocillo sin alterar las bolas. Incube la placa a temperatura ambiente durante 30 segundos.
- 11 Extraiga y deseche el EtOH al 80 % de cada pocillo de la placa NLT.
- 12 Repita los pasos 10 y 11 una vez para un total de dos lavados de EtOH al 80 %.
- 13 Con una pipeta monocal o multicanal de 20 μl , extraiga el EtOH al 80 % restante de cada pocillo de la placa NLT sin alterar las bolas.
- 14 Con la placa NLT en el soporte magnético, incúbela a temperatura ambiente durante 10 minutos para que se seque.
- 15 Extraiga la placa NLT del soporte magnético.
- 16 Añada 22,5 μl de tampón de resuspensión a cada pocillo de la placa NLT. No toque las bolas con las puntas de pipeta.
- 17 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NLT con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NLT en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 1 minuto.
- 18 Incube la placa NLT a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 19 Centrifugue la placa NLT a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 20 Coloque la placa NLT en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 21 Extraiga el sello adhesivo de la placa NLT.
- 22 Transfiera 20 μl de sobrenadante transparente de cada pocillo de la placa NLT al pocillo correspondiente de la nueva placa HSP etiquetada como NLA. Tenga cuidado de no alterar las bolas.



NOTA

Ilumina recomienda usar una pipeta monocal o multicanal de 20 μl establecida en 10 μl para realizar dos transferencias consecutivas de 10 μl . Esta técnica disminuye la pérdida de muestra al asegurarse que se transfiere todo el líquido sin alterar las bolas.

Primera amplificación PCR

Este proceso amplifica el ADN marcado purificado mediante un programa de PCR de 10 ciclos. También añade las secuencias del índice 1 (i7) y el índice 2 (i5) necesarias para la secuenciación, así como los adaptadores comunes (P5 y P7) necesarios para la generación de grupos y la secuenciación. Es fundamental usar toda la cantidad del ADN de entrada recomendado. Es fundamental que no se añadan ciclos adicionales al proceso de PCR para garantizar la generación de bibliotecas que produzcan resultados de secuenciación de alta calidad.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Cebadores de índice 1 (i7, N701–N712)	1 tubo de cada índice	Entre -15 °C y -25 °C	Illustrina
Tapas del tubo del índice 1, naranjas	1 por tubo de cebador de índice 1	Entre 15 °C y 30 °C	Illustrina
Cebadores del índice 2 (i5, E502–E505)	1 tubo de cada índice	Entre -15 °C y -25 °C	Illustrina
Tapas del tubo de índice 2, blancas	1 por tubo de cebador de índice 2	Entre 15 °C y 30 °C	Illustrina
Mezcla para amplificación de bibliotecas Nextera (NLM)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illustrina
Tubos de microcentrífuga, 1,7 ml	1 por tubo de cebador de índice	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Película Microseal "A"	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sello adhesivo Microseal "B"	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (para procesar diversas muestras)	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
[Opcional] Kit de fijación de placa de índices TruSeq®	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire la mezcla para amplificación de bibliotecas Nextera almacenada a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C y descongele en hielo.

- ▶ Retire lo siguiente del almacenamiento a una temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongele a temperatura ambiente.
 - Cebadores de índice 1 (i7, N7xx) (extraiga solamente los cebadores que se usen)
 - Cebadores de índice 2 (i5, E5xx) (extraiga solamente los cebadores que se usen)



NOTA

Los kits de Panel de secuenciación TruSight One están diseñados para funcionar solamente con cebadores de índice 2 con el prefijo "E". No utilice cebadores de índice 2 de otros kits de preparación de muestras.

- ▶ Para el procesamiento de varias muestras:
 - Utilice una pipeta multicanal.
 - Dispense la mezcla para amplificación de bibliotecas Nextera en volúmenes iguales en cada uno de los pocillos de la gradilla de ocho tubos.
- ▶ Programe previamente el ciclador térmico con el programa siguiente y guárdelo como **NLM AMP**:
 - Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 minutos.
 - $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos.
 - **10 ciclos** de:
 - $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 segundos.
 - $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos.
 - $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos.
 - $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos.
 - Mantenga la temperatura a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.



NOTA

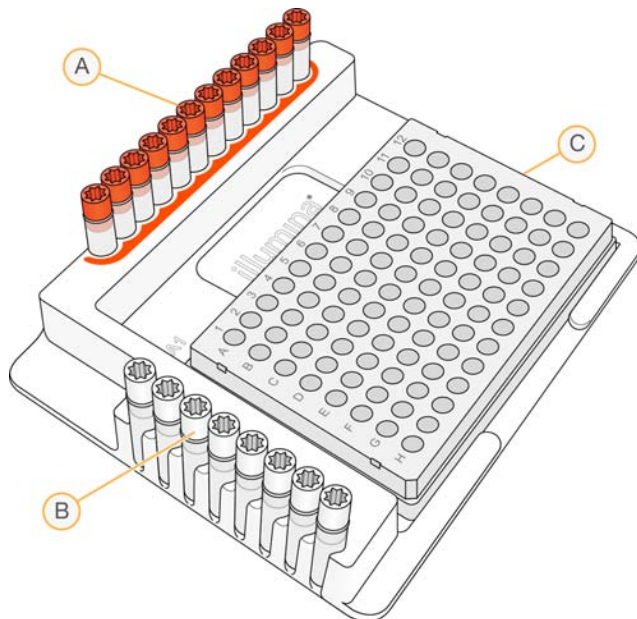
Ilumina ha optimizado el número de ciclos de PCR recomendados para ensayos de enriquecimiento en función del nivel de agrupación de muestras enriquecidas previamente y del tamaño del conjunto de oligonucleótidos. No añada ni reduzca los ciclos de PCR, ya que podrían afectar a la calidad de los datos.

Configuración de los cebadores de índice

- 1 Agite los tubos del cebador de índice durante 5 segundos.
- 2 Centrifugue los tubos del cebador de índice a $600 \times g$ durante 5 segundos. Utilice tubos de microcentrífuga de 1,7 ml como adaptadores de tubo para la microcentrífuga.

- 3 Disponga los cebadores de índice en una gradilla con hielo (es decir, la fijación de placa de índices TruSeq) con la disposición siguiente:
 - a Disponga los tubos del cebador de índice 1 (tapas naranjas) de forma vertical, alineados con las columnas 1-12.
 - b Disponga los tubos del cebador de índice 2 (tapas blancas) de forma horizontal, alineados con las filas A-H.

Figura 2 Fijación de la placa de índices



- A Tubos del cebador de índice 1 (tapas naranjas)
- B Tubos del cebador de índice 2 (tapas blancas)
- C Placa NLA

Procedimiento



NOTA

Cuando se agrupan bibliotecas antes del enriquecimiento con el kit de 9 muestras, es recomendable agrupar bibliotecas para que todos los índices del índice 1 (i7) sean únicos. Seleccione cebadores de índice 1 e índice 2 para PCR, consecuentemente. Para agrupar 3 muestras en un solo enriquecimiento para la secuenciación en un MiSeq, Illumina recomienda usar cebadores de índice 1 N701, N705 y N709, junto con cebadores de índice 2 para las tres muestras. Para la agrupación con el kit de 36 muestras, asegúrese de que cada muestra posea una combinación única de secuencias del índice 1 y del índice 2.

- 1 Añada 5 µl del cebador de índice 1 a cada pocillo de la placa NLA.
- 2 Añada 5 µl del cebador de índice 2 a cada pocillo de la placa NLA.
- 3 Añada 20 µl de la mezcla para amplificación de bibliotecas Nextera a cada pocillo de la placa NLA.
- 4 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NLA con una película Microseal "A".
 - b Agite la placa NLA en un agitador de microplacas a 1200 rpm durante 1 minuto.
- 5 Centrifugue la placa NLA a 280 × g durante 1 minuto.
- 6 Coloque la placa NLA sellada en el ciclador térmico preprogramado. Cierre la tapa; a continuación, seleccione y ejecute el programa **NLM AMP** con una tapa calentada.



PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si no tiene pensado proceder inmediatamente con la *Primera limpieza de PCR* en la página 22, la placa NLA puede permanecer en el ciclador térmico durante la noche. Si va a parar, reemplace el sello adhesivo Microseal "A" por un Microseal "B" y almacene la placa NLA a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de dos días.

Primera limpieza de PCR

En este proceso se emplean bolas de purificación de muestras para purificar el ADN de la biblioteca y eliminar los productos no deseados.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustrina
Bolas de purificación de muestras (SPB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustrina
Placa HSP de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placa MIDI de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Etanol (EtOH) recién preparado al 80 %	400 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	3	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Depósitos de reactivos sin ARNasa/ADNasa (para procesamiento de varias muestras)	3	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- Consulte las mejores prácticas para la *manipulación de bolas magnéticas*. Consulte *Recursos adicionales* en la página 5 para obtener información sobre cómo acceder a las mejores prácticas de TruSight One en el sitio web Illustrina.

- ▶ Asegúrese de que el tampón de resuspensión y las bolas de purificación de muestras se encuentran a temperatura ambiente.
- ▶ Para el procesamiento de varias muestras:
 - Utilice una pipeta multicanal.
 - Vierta el tampón de resuspensión, las bolas de purificación de muestras y el EtOH al 80 % en depósitos de reactivos multicanal separados.
- ▶ Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como **NLC** (limpieza de biblioteca Nextera) con un rotulador permanente.
- ▶ Etiquete una nueva placa HSP de 96 pocillos como **NLS** (muestra de biblioteca Nextera) con un rotulador permanente.

Procedimiento

- 1 Extraiga la placa NLA del ciclador térmico y centrifugue a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 2 Extraiga el sello adhesivo de la placa NLA.
- 3 Transfiera 50 μl de sobrenadante transparente de cada pocillo de la placa NLA al pocillo correspondiente de la nueva placa MIDI de 96 pocillos etiquetada como NLC.
- 4 Agite las bolas de purificación de muestras hasta que estén bien dispersas.
- 5 Añada 90 μl de bolas de purificación de muestras bien resuspendidas a cada pocillo de la placa NLC.
- 6 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NLC con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NLC en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 1 minuto.
- 7 Incube la placa NLC a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 8 Centrifugue la placa NLC a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 9 Extraiga el sello adhesivo de la placa NLC.
- 10 Coloque la placa NLC en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 11 Con una pipeta monocal o multicanal de 200 μl establecida en 140 μl , todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa NLC.



NOTA

Deje la placa NLC en el soporte magnético mientras lleva a cabo los siguientes pasos de lavado de EtOH al 80 % (12-14).

- 12 Con la placa NLC en el soporte magnético, añada lentamente 200 μl de EtOH al 80 % recién preparado a cada pocillo sin alterar las bolas. Incube a temperatura ambiente durante 30 segundos.
- 13 Extraiga y deseche el EtOH al 80 % de cada pocillo de la placa NLC.
- 14 Repita los pasos 12 y 13 una vez para un total de dos lavados de EtOH al 80 %.
- 15 Con una pipeta monocal o multicanal de 20 μl , extraiga el EtOH al 80 % restante de cada pocillo de la placa NLC sin alterar las bolas.
- 16 Deje la placa NLC a temperatura ambiente durante 10 minutos para que se seque en el soporte magnético.
- 17 Extraiga la placa NLC del soporte magnético.
- 18 Añada 27,5 μl de tampón de resuspensión a cada pocillo de la placa NLC. No toque las bolas con las puntas de pipeta.
- 19 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NLC con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NLC en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 1 minuto.
- 20 Incube la placa NLC a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 21 Centrifugue la placa NLC a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 22 Extraiga el sello adhesivo de la placa NLC.
- 23 Coloque la placa NLC en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 24 Transfiera 25 μl de sobrenadante transparente de cada pocillo de la placa NLC al pocillo correspondiente de la nueva placa HSP etiquetada como NLS. Tenga cuidado de no alterar las bolas.



NOTA

Ilumina recomienda usar una pipeta monocal o multicanal de 20 μl establecida en 12,5 μl para realizar dos transferencias consecutivas de 12,5 μl . Esta técnica disminuye la pérdida de muestra al asegurarse que se transfiere todo el líquido sin alterar las bolas.

- 25 Cuantifique la biblioteca en la placa NLS mediante un método de cuantificación

fluorimétrico que emplee colorantes de unión de ADNds.



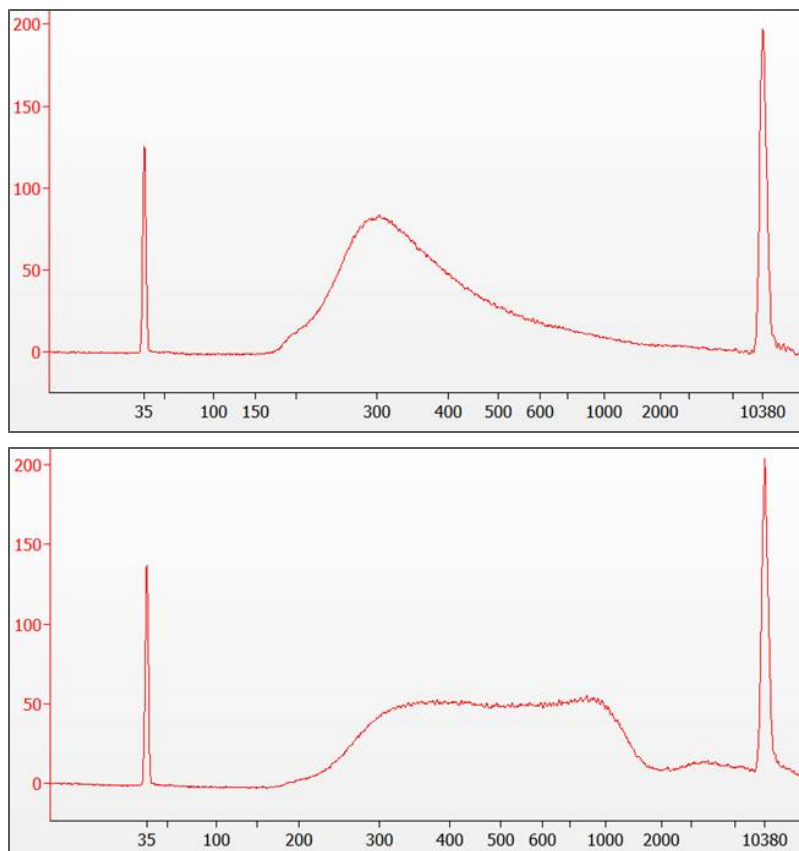
NOTA

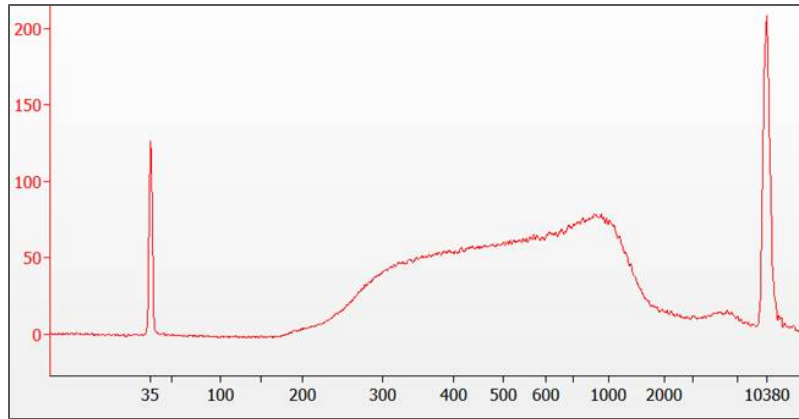
Es necesaria una cuantificación precisa de la biblioteca para conseguir una agrupación uniforme para el enriquecimiento. Una cuantificación o agrupación imprecisa puede dar lugar a una representación mayor de algunas muestras en comparación con otras de la misma agrupación.

- 26 [Opcional] Cargue 1 μ l de la biblioteca en un bioanalizador 2100 de Agilent Technologies con un chip de ADN 1000 de Agilent. Compruebe el tamaño de la biblioteca para obtener una distribución de fragmentos de ADN con un intervalo de tamaño de aproximadamente entre 300 bp-1 kb.

No es necesario tener un pico marcado, sino que lo más importante es que la mayoría de los fragmentos se encuentren en el intervalo de 300 bp-1 kb. Las trazas pueden variar de una preparación a otra. Las trazas muestran algunos ejemplos de posibles distribuciones, pero esto no significa que sean preparaciones correctas.

Figura 3 Ejemplo de distribuciones de biblioteca enriquecida previamente, posterior a PCR de TruSight One





PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si no tiene pensado continuar inmediatamente con la *Primera hibridación* en la página 28, puede detener el protocolo de forma segura en este punto. Si va a parar, selle la placa NLS con un sello adhesivo Microseal "B" y almacénela a una temperatura de entre -15°C y -25°C durante 14 días como máximo.

Primera hibridación

Este proceso mezcla la biblioteca de ADN con sondas de captura en regiones objetivo de interés. El tiempo de hibridación recomendado garantiza que las regiones objetivo se unan con las sondas de captura completamente. Este proceso también describe cómo combinar diversas bibliotecas con índices diferentes en un grupo único anterior al enriquecimiento.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Oligonucleótidos de TruSight One (TOO)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Tampón de hibridación de enriquecimiento (EHB)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Placa HSP de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
[Opcional] Unidad de filtro de centrifuga Amicon Ultra-0.5 (0,5 ml, 30 kDa)	1 por muestra agrupada	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sello adhesivo Microseal "B"	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa (para procesar diversas muestras)	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Extraiga lo siguiente del almacenamiento a una temperatura de -15 °C a -25 °C y descongele a temperatura ambiente:
 - Tampón de hibridación de enriquecimiento
 - Oligonucleótidos de TruSight One

- ▶ Para el procesamiento de varias muestras:
 - Utilice una pipeta multicanal.
 - Distribuya y dispense volúmenes equivalentes en cada uno de los pocillos de los oligonucleótidos TruSight One y el tampón de hibridación de enriquecimiento en gradillas de ocho tubos separadas.
- ▶ Extraiga la placa NLS almacenada a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ si se almacenó al final de la *Primera limpieza de PCR* y descongélela en hielo.
 - Centrifugue la placa NLS a $280 \times g$ durante 1 minuto.
 - Extraiga el sello adhesivo de la placa NLS descongelada.
- ▶ Programe previamente el ciclador térmico con el programa siguiente y guárdelo como **NRC HYB**:
 - a Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - b $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.
 - c 18 incubaciones de 1 minuto cada una, que comienzan a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, a continuación, disminuyen $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por incubación
 - d $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ para siempre.
- ▶ Etiquete una nueva placa HSP de 96 pocillos como **NEH1** (hibridación de enriquecimiento Nextera 1) con un rotulador permanente.

Agrupación de bibliotecas

- 1 Consulte la Tabla 1 para saber la cantidad de bibliotecas de ADN que se deben usar para el enriquecimiento. Illumina recomienda usar 500 ng de cada biblioteca de ADN, cuantificadas mediante un método de cuantificación de ADNds fluorimétrico. Consulte *Recomendaciones de entrada de ADN* en la página 3.
 - Si se están agrupando bibliotecas, combine 500 ng de cada biblioteca de ADN. Asegúrese de que cada biblioteca de la agrupación posee un índice único.
 - Si el volumen total es superior a $40\text{ }\mu\text{l}$, concentre la muestra agrupada. Utilice un concentrador de vacío o una unidad de filtro de centrifuga Amicon Ultra-0.5 ($0,5\text{ ml}$, 30 kDa) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
 - Si está utilizando un concentrador de vacío, Illumina recomienda concentrar las muestras con una configuración de tasa de secado del medio y sin calor.
 - Si está utilizando una unidad de filtro de centrifuga Amicon Ultra-0.5 ($0,5\text{ ml}$, 30 kDa), no es necesario enjuagar previamente el dispositivo antes de su uso. La mayoría del volumen se filtra en 5 minutos, pero podrían ser necesarios hasta 30 minutos en función del volumen inicial.

- Si el volumen de muestra agrupada tras la concentración es inferior a 40 µl, llegue hasta los 40 µl de volumen con el tampón de resuspensión.
- 2 La estrategia de agrupación previa al enriquecimiento recomendada es agrupar bibliotecas de manera que cada una contenga un índice único del índice 1/i7. Gracias a este enfoque de agrupación, las muestras se pueden secuenciar mediante un flujo de trabajo de lectura de un solo índice, tal y como se ha descrito en las guías de usuario de HiSeq® y GAIIx.
- Si los índices del índice 1/i7 no fueran únicos, asegúrese de que se incluyen las bibliotecas con índices del índice 2/i5 diferentes (por ejemplo, N703/E503 y N703/E504). Con este enfoque, secuencie las muestras con un flujo de trabajo de lectura del índice doble, tal y como se ha descrito en las guías de usuario de HiSeq y GAIIx.

Tabla 1 Bibliotecas de ADN para enriquecimiento

Complejidad de la agrupación de bibliotecas	Masa total de la biblioteca de ADN (ng)
1 secuencias	500
2 secuencias	1000
3 secuencias	1500
4 secuencias	2000
5 secuencias	2500
6 secuencias	3000
7 secuencias	3500
8 secuencias	4000
9 secuencias	4500
10 secuencias	5000
11 secuencias	5500
12 secuencias	6000



NOTA

El kit de TruSight One de 9 muestras está diseñado para admitir 3 muestras por enriquecimiento. El kit de TruSight One de 36 muestras puede admitir hasta 12 muestras por enriquecimiento.

Procedimiento

- 1 Agite concienzudamente el tubo del tampón de hibridación de enriquecimiento hasta que la solución quede completamente resuspendida. Asegúrese visualmente de que no hay estructuras de cristales.



NOTA

Si se observan cristales o turbidez, agite el tubo del tampón de hibridación de enriquecimiento hasta que la solución sea transparente.

- 2 Añada los reactivos siguientes en el orden indicado a cada pocillo de la nueva placa HSP de 96 pocillos etiquetada como NEH1:

Reactivo	Volumen (μl)
Muestra de biblioteca de ADN o agrupación de bibliotecas de la placa NLS	40
Tampón de hibridación de enriquecimiento	50
TruSight One Oligonucleótidos	10
Volumen total por muestra	100

- 3 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEH1 con un sello adhesivo Microseal "B". Asegúrese de que la placa está bien sellada para evitar una posible evaporación. Utilice un rodillo de sello adhesivo para aplicar fuerza al sello y asegurarse de que el sello quede fijado.
 - b Agite la placa NEH1 en un agitador de microplacas a 1200 rpm durante 1 minuto.
- 4 Centrifugue la placa NEH1 a 280 × g durante 1 minuto.
- 5 Coloque la placa NEH1 sellada en el ciclador térmico preprogramado. Cierre la tapa; a continuación, seleccione y ejecute el programa **NRC HYB**.
Incube la placa a una temperatura de conservación de 58 °C durante al menos 90 minutos y un máximo de 24 horas. No extraiga la placa de la incubación a 58 °C hasta que esté listo para proseguir con la *Primera captura* en la página 32.

Primera captura

Este proceso emplea bolas de estreptavidina para capturar sondas hibridizadas en regiones objetivo de interés. Los dos procedimientos de lavado calentados eliminan la unión no específica de las bolas. La biblioteca enriquecida se eluye de las bolas y se prepara para una segunda ronda de hibridación. Es necesario el uso del equipo y las temperaturas adecuadas para garantizar la extracción de ADN no específico, así como la retención de las regiones objetivo.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
2N NaOH (HP3)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Tampón objetivo de elución 2 (ET2)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustra
Tampón de elución de enriquecimiento 1 (EE1)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Solución de lavado de enriquecimiento (EWS)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Bolas magnéticas de estreptavidina (SMB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustra
Tubo de microcentrífuga de 1,7 ml	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placa HSP de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placa MIDI de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	6	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Extraiga el HP3, tampón de elución de enriquecimiento 1 y la solución de lavado de enriquecimiento de su almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongele a temperatura ambiente.
- ▶ Extraiga el tampón objetivo de elución 2 y las bolas magnéticas de estreptavidina almacenados a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y deje que alcancen la temperatura ambiente.



NOTA

Asegúrese de utilizar las bolas magnéticas de estreptavidina (tubo de 2 ml) en lugar de las bolas de purificación de muestras (tubo de 15 ml) para este procedimiento

- ▶ Caliente previamente el sistema de microcalentamiento a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.



NOTA

Los pasos para el lavado de enriquecimiento son fundamentales para asegurar una especificidad de enriquecimiento elevada. Illumina recomienda el uso de un sistema de microcalentamiento con una inserción de placa MIDI para estos pasos a fin de garantizar que las muestras se conservan a la temperatura deseada. Temperaturas demasiado altas o demasiado bajas pueden originar porcentajes de enriquecimiento inferiores y la disminución de rendimientos. Si no se dispone de un sistema de microcalentamiento, se puede usar un ciclador térmico con modificaciones siguiendo las instrucciones de *Ciclador térmico alternativo: pasos para un enriquecimiento adecuado* en la página 65. Este enfoque precisa transferencias de muestras adicionales.

- ▶ Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como **NEW1** (lavado de enriquecimiento Nextera 1) con un rotulador permanente.
- ▶ Etiquete una nueva placa HSP de 96 pocillos como **NEH2** (hibridación de enriquecimiento Nextera 2) con un rotulador permanente.

Primera unión

- 1 Extraiga la placa NEH1 del ciclador térmico.
- 2 Centrifugue la placa NEH1 a $280 \times \text{g}$ durante 1 minuto.
- 3 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEH1. Tenga cuidado al extraer el sello para evitar que se derrame el contenido de los pocillos.
- 4 Transfiera todo el contenido ($\sim 100\text{ }\mu\text{l}$) de cada pocillo de la placa NEH1 al pocillo correspondiente de la nueva placa MIDI de 96 pocillos etiquetada como NEW1.



NOTA

Si se llevó a cabo una primera hibridación durante la noche, es normal observar una ligera pérdida de muestra. Sin embargo, si la pérdida de muestra es superior al 15 %, Illumina no recomienda seguir con la preparación de muestras. Un sellado insuficiente o no haber calentado la tapa pueden provocar esta pérdida de la cantidad.

- 5 Agite el tubo de bolas magnéticas de estreptavidina hasta que las bolas estén bien dispersas; a continuación, añada 250 μ l de bolas magnéticas de estreptavidina bien mezcladas a los pocillos de la placa NEW1.
- 6 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEW1 con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NEW1 en un agitador de microplacas a 1200 rpm durante 5 minutos.
- 7 Deje que la placa NEW1 alcance la temperatura ambiente durante 25 minutos.
- 8 Centrifugue la placa NEW1 a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 9 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEW1.
- 10 Coloque la placa NEW1 en el soporte magnético durante 2 minutos a temperatura ambiente o hasta que el líquido sea transparente.
- 11 Extraiga con cuidado y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa NEW1 sin alterar las bolas.
- 12 Extraiga la placa NEW1 del soporte magnético.

Primer lavado

- 1 Asegúrese de que el tubo de la solución de lavado de enriquecimiento se encuentra a temperatura ambiente; a continuación, agite concienzudamente el tubo.



NOTA

Es normal que la solución de lavado de enriquecimiento pueda estar turbia tras haberla agitado.

- 2 Añada 200 μ l de solución de lavado de enriquecimiento a cada pocillo de la placa NEW1.
- 3 Mezcle concienzudamente y resuspenda el sedimento de bolas mediante la dispensación repetida de la solución de lavado sobre el sedimento de bolas hasta que se sumerja en la solución. Después, pipetee con cuidado todo el volumen de cada

pocillo arriba y abajo 10 veces para asegurarse que se completa la resuspensión de la muestra.



NOTA

Es necesaria la resuspensión adecuada de las bolas magnéticas de estreptavidina para garantizar la eliminación eficaz de ADN no específico de la reacción, ya que, de lo contrario, ocasionará unas estadísticas de enriquecimiento deficientes.

- 4 Selle la placa NEW1 con un sello adhesivo Microseal "B".
- 5 Coloque la placa NEW1 sellada en el sistema de microcalentamiento **calentado previamente**. Cierre la tapa e incube a 50 °C durante 30 minutos.



NOTA


Los pasos para el lavado de enriquecimiento son fundamentales para asegurar una especificidad de enriquecimiento elevada. Illumina recomienda el uso de un sistema de microcalentamiento con una inserción de placa MIDI para estos pasos a fin de garantizar que las muestras se conservan a la temperatura deseada. Temperaturas demasiado altas o demasiado bajas pueden originar porcentajes de enriquecimiento inferiores y disminución de rendimientos. Si no se dispone de un sistema de microcalentamiento, se puede usar un ciclador térmico con modificaciones siguiendo las instrucciones de *Ciclador térmico alternativo: pasos para un enriquecimiento adecuado* en la página 65. Este enfoque precisa transferencias de muestras adicionales.

- 6 Coloque el soporte magnético cerca del sistema de microcalentamiento para poder acceder de inmediato.
- 7 Retire la placa NEW1 del sistema de microcalentamiento y colóquela *inmediatamente* en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 8 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEW1.
- 9 Extraiga y deseche inmediatamente todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa NEW1.
- 10 Extraiga la placa NEW1 del soporte magnético.
- 11 Repita los pasos del 2 al 10 una vez para un total de dos lavados con solución de lavado de enriquecimiento.

Primera elución

- 1 Añada los reactivos siguientes en el orden indicado en un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml para crear la mezcla previa a la elución. Multiplique cada volumen por el número de muestras agrupadas que se están preparando. Los volúmenes incluyen una cantidad en exceso para procesar diferentes muestras.

Reactivo	Volumen (μl)
Tampón de elución de enriquecimiento 1	28.5
HP3	1.5
Volumen total por muestra	30

- 2 Agite el tubo de la mezcla previa a la elución; a continuación, añada **23,5** μl de la mezcla a cada pocillo de la placa NEW1.
 - 3 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEW1 con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NEW1 en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 2 minutos.
 - 4 Deje que la placa NEW1 alcance la temperatura ambiente durante 2 minutos.
 - 5 Centrifugue la placa NEW1 a 280 × g durante 1 minuto.
 - 6 Retire con cuidado el sello adhesivo de la placa NEW1 para evitar que se derrame el contenido de los pocillos.
 - 7 Coloque la placa NEW1 en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
 - 8 Transfiera 21 μl de sobrenadante transparente de cada pocillo de la placa NEW1 al pocillo correspondiente de la nueva placa HSP etiquetada como NEH2. Tenga cuidado de no alterar las bolas.
-  **NOTA**
 Illumina recomienda usar una pipeta monocanal o multicanal de 20 μl establecida en 10,5 μl para realizar dos transferencias consecutivas de 10,5 μl. Esta técnica disminuye la pérdida de muestra al asegurarse que se transfiere todo el líquido sin alterar las bolas.
- 9 Añada 4 μl del tampón objetivo de elución 2 a cada pocillo de la placa NEH2 que contenga muestras para neutralizar la elución.

- 10 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEH2 con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NEH2 en un agitador de microplacas a 1200 rpm durante 1 minuto.
- 11 Centrifugue la placa NEH2 a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 12 Guarde los reactivos restantes de la siguiente manera:
 - a Almacene los tubos del tampón objetivo de elución 2 y de las bolas magnéticas de estreptavidina a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - b Almacene los tubos de HP3, del tampón de elución de enriquecimiento 1 y de la solución de lavado de enriquecimiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - c Deseche cualquier resto de la mezcla previa a la elución.



PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si no tiene pensado continuar inmediatamente con la *Segunda hibridación* en la página 38, puede detener el protocolo de forma segura en este punto. Si va a parar, selle la placa NEH2 con un sello adhesivo Microseal "B" y almacénela a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante siete días como máximo.

Segunda hibridación

Este proceso combina la biblioteca de ADN eluida de la primera ronda de enriquecimiento con sondas de captura adicionales en regiones objetivo de interés. Esta segunda hibridación es necesaria para garantizar la alta especificidad de las regiones capturadas.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Oligonucleótidos de TruSight One (TOO)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illustrina
Tampón de hibridación de enriquecimiento (EHB)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illustrina
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustrina
Sello adhesivo Microseal "B"	1	Entre 15°C y 30°C	Usuario

Preparación

- ▶ Extraiga lo siguiente del almacenamiento a una temperatura de -15 a -25 °C y descongele a temperatura ambiente:
 - Tampón de hibridación de enriquecimiento
 - Oligonucleótidos de TruSight One
- ▶ Asegúrese de que el tampón de resuspensión se encuentra a temperatura ambiente.
- ▶ Extraiga la placa NEH2 almacenada a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C, si se almacenó al final de la *Primera captura* y descongélela en hielo.
 - Centrifugue la placa NEH2 descongelada a 280 × g durante 1 minuto.

Procedimiento

- 1 Agite concienzudamente el tubo del tampón de hibridación de enriquecimiento hasta que la solución quede completamente resuspendida. Asegúrese visualmente de que no hay estructuras de cristales.



NOTA

Si se observan cristales o turbidez, agite el tubo del tampón de hibridación de enriquecimiento hasta que la solución sea transparente.

- 2 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEH2.
- 3 Añada los reactivos siguientes en el orden indicado a cada pocillo de la placa NEH2:

Reactivo	Volumen (μl)
Tampón de resuspensión	15
Tampón de hibridación de enriquecimiento	50
TruSight One Oligonucleótidos	10

- 4 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEH2 con un sello adhesivo Microseal "B". Asegúrese de que la placa está bien sellada para evitar una posible evaporación. Utilice un rodillo de sello adhesivo para aplicar fuerza al sello y asegurarse de que el sello quede fijado.
 - b Agite la placa NEH2 en un agitador de microplacas a 1200 rpm durante 1 minuto.
- 5 Centrifugue la placa NEH2 a 280 × g durante 1 minuto.
- 6 Coloque la placa NEH2 sellada en el ciclador térmico preprogramado. Cierre la tapa; a continuación, seleccione y ejecute el programa **NRC HYB**.
Incube la placa a una temperatura de conservación de 58 °C por la noche durante al menos 14,5 horas y un máximo de 24 horas. No extraiga la placa de la incubación a 58 °C hasta que esté listo para proseguir con la *Segunda captura* en la página 40.

Segunda captura

Este proceso emplea bolas de estreptavidina para capturar sondas hibridizadas en regiones objetivo de interés. Los dos procedimientos de lavado calentados eliminan la unión no específica de las bolas. La biblioteca enriquecida se eluye de las bolas y se prepara para la secuenciación. Es necesario el uso del equipo y las temperaturas adecuadas para garantizar la extracción de ADN no específico, así como la retención de las regiones objetivo.



NOTA

Estos procedimientos son parecidos a los de la *Primera captura* en la página 32.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
2N NaOH (HP3)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Tampón objetivo de elución 2 (ET2)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustra
Tampón de elución de enriquecimiento 1 (EE1)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Solución de lavado de enriquecimiento (EWS)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illustra
Bolas magnéticas de estreptavidina (SMB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustra
Tubo de microcentrífuga de 1,7 ml	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placas MIDI de 96 pocillos	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	6	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Extraiga el HP3, tampón de elución de enriquecimiento 1 y la solución de lavado de enriquecimiento de su almacenamiento a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descongele a temperatura ambiente.
- ▶ Extraiga el tampón objetivo de elución 2 y las bolas magnéticas de estreptavidina almacenados a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ y deje que alcancen la temperatura ambiente.



NOTA

Asegúrese de utilizar las bolas magnéticas de estreptavidina (tubo de 2 ml) en lugar de las bolas de purificación de muestras (tubo de 15 ml) para este procedimiento

- ▶ Caliente previamente el sistema de microcalentamiento a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.



NOTA

Los pasos para el lavado de enriquecimiento son fundamentales para asegurar una especificidad de enriquecimiento elevada. Illumina recomienda el uso de un sistema de microcalentamiento con una inserción de placa MIDI para estos pasos a fin de garantizar que las muestras se conservan a la temperatura deseada. Temperaturas demasiado altas o demasiado bajas pueden originar porcentajes de enriquecimiento inferiores y la disminución de rendimientos. Si no se dispone de un sistema de microcalentamiento, se puede usar un ciclador térmico con modificaciones siguiendo las instrucciones de *Ciclador térmico alternativo: pasos para un enriquecimiento adecuado* en la página 65. Este enfoque precisa transferencias de muestras adicionales.

- ▶ Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como **NEW2** (lavado de enriquecimiento Nextera 2) con un rotulador permanente.
- ▶ Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como **NEC1** (limpieza enriquecida Nextera 1) con un rotulador permanente.

Segunda unión

- 1 Extraiga la placa NEH2 del ciclador térmico.
- 2 Centrifugue a temperatura ambiente la placa NEH2 a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 3 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEH2. Tenga cuidado al extraer el sello para evitar que se derrame el contenido de los pocillos.
- 4 Transfiera todo el contenido ($\sim 100\text{ }\mu\text{l}$) de cada pocillo de la placa NEH2 al pocillo correspondiente de la nueva placa MIDI de 96 pocillos etiquetada como NEW2.



NOTA

Es normal observar una ligera pérdida de muestra tras la hibridación por la noche. Sin embargo, si la pérdida de muestra es superior al 15 %, Illumina no recomienda seguir con la preparación de muestras. Un sellado insuficiente o no haber calentado la tapa pueden provocar esta pérdida de la cantidad.

- 5 Agite el tubo de bolas magnéticas de estreptavidina hasta que las bolas estén bien dispersas; a continuación, añada 250 μ l de bolas magnéticas de estreptavidina bien mezcladas a los pocillos de la placa NEW2.
- 6 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEW2 con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NEW2 en un agitador de microplacas a 1200 rpm durante 5 minutos.
- 7 Deje que la placa NEW2 alcance la temperatura ambiente durante 25 minutos.
- 8 Centrifugue la placa NEW2 a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 9 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEW2.
- 10 Coloque la placa NEW2 en el soporte magnético durante 2 minutos a temperatura ambiente o hasta que el líquido sea transparente.
- 11 Extraiga con cuidado y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa NEW2 sin alterar las bolas.
- 12 Extraiga la placa NEW2 del soporte magnético.

Segundo lavado

- 1 Asegúrese de que el tubo de la solución de lavado de enriquecimiento se encuentra a temperatura ambiente; a continuación, agite concienzudamente el tubo.



NOTA

Es normal que la solución de lavado de enriquecimiento pueda estar turbia tras haberla agitado.

- 2 Añada 200 μ l de solución de lavado de enriquecimiento a cada pocillo de la placa NEW2.
- 3 Mezcle concienzudamente y resuspenda el pellet de bolas mediante la dispensación repetida de la solución de lavado sobre el pellet de bolas hasta que se sumerja en la

solución. Después, pipetee con cuidado todo el volumen de cada pocillo arriba y abajo 10 veces para asegurarse que se completa la resuspensión de la muestra.



NOTA

Es necesaria la resuspensión adecuada de las bolas magnéticas de estreptavidina para garantizar la eliminación eficaz de ADN no específico de la reacción, ya que, de lo contrario, ocasionará unas estadísticas de enriquecimiento deficientes.

- 4 Selle la placa NEW2 con un sello adhesivo Microseal "B".
- 5 Incube la placa NEW2 en el sistema de microcalentamiento **calentado previamente**, con la tapa cerrada, a 50 °C durante 30 minutos.



NOTA


Los pasos para el lavado de enriquecimiento son fundamentales para asegurar una especificidad de enriquecimiento elevada. Illumina recomienda el uso de un sistema de microcalentamiento con una inserción de placa MIDI para estos pasos a fin de garantizar que las muestras se conservan a la temperatura deseada. Temperaturas demasiado altas o demasiado bajas pueden originar porcentajes de enriquecimiento inferiores y disminución de rendimientos. Si no se dispone de un sistema de microcalentamiento, se puede usar un ciclador térmico con modificaciones siguiendo las instrucciones de *Ciclador térmico alternativo: pasos para un enriquecimiento adecuado* en la página 65. Este enfoque precisa transferencias de muestras adicionales.

- 6 Coloque el soporte magnético cerca del sistema de microcalentamiento para poder acceder de inmediato.
- 7 Retire la placa NEW2 del sistema de microcalentamiento y colóquela *inmediatamente* en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 8 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEW2.
- 9 Extraiga y deseché inmediatamente todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa NEW2.
- 10 Extraiga la placa NEW2 del soporte magnético.
- 11 Repita los pasos 2 al 10 una vez para un total de dos lavados con solución de lavado de enriquecimiento.

Segunda elución

- 1 Añada los reactivos siguientes en el orden indicado en un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml para crear la mezcla previa a la elución. Multiplique cada volumen por el número de muestras agrupadas que se están preparando. Los volúmenes incluyen una cantidad en exceso para procesar diferentes muestras.

Reactivo	Volumen (μl)
Tampón de elución de enriquecimiento 1	28.5
HP3	1.5
Volumen total por muestra	30

- 2 Agite el tubo de la mezcla previa a la elución; a continuación, añada **23,5** μl de la mezcla a cada pocillo de la placa NEW2.
 - 3 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEW2 con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NEW2 en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 2 minutos.
 - 4 Deje que la placa NEW2 alcance la temperatura ambiente durante 2 minutos.
 - 5 Centrifugue la placa NEW2 a 280 × g durante 1 minuto.
 - 6 Retire con cuidado el sello adhesivo de la placa NEW2 para evitar que se derrame el contenido de los pocillos.
 - 7 Coloque la placa NEW2 en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
 - 8 Transfiera 21 μl de sobrenadante transparente de cada pocillo de la placa NEW2 al pocillo correspondiente de la nueva placa MIDI etiquetada como NEC1. Tenga cuidado de no alterar las bolas.
-  **NOTA**
 Illumina recomienda usar una pipeta monocanal o multicanal de 20 μl establecida en 10,5 μl para realizar dos transferencias consecutivas de 10,5 μl. Esta técnica disminuye la pérdida de muestra al asegurarse que se transfiere todo el líquido sin alterar las bolas.
- 9 Añada 4 μl del tampón objetivo de elución 2 a cada pocillo de la placa NEC1 que contenga muestras para neutralizar la elución.

- 10 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEC1 con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NEC1 en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 1 minuto.
- 11 Centrifugue la placa NEC1 a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 12 Guarde los reactivos restantes de la siguiente manera:
 - a Almacene los tubos del tampón objetivo de elución 2 y de las bolas magnéticas de estreptavidina a una temperatura de entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - b Almacene los tubos de HP3, del tampón de elución de enriquecimiento 1 y de la solución de lavado de enriquecimiento a una temperatura de entre -15 y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - c Deseche cualquier resto de la mezcla previa a la elución.

Limpieza de muestras de captura

En este proceso se emplean bolas de purificación de muestras para purificar la biblioteca capturada antes de la amplificación PCR.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustrina
Bolas de purificación de muestras (SPB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustrina
Placa HSP de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Etolol (EtOH) recién preparado al 80 %	400 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	3	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Consulte *Mejores prácticas para la manipulación de bolas magnéticas*. Consulte *Recursos adicionales* en la página 5 para obtener más información sobre cómo acceder a las Mejores prácticas de TruSight One en el sitio web de Illustrina.
- ▶ Asegúrese de que el tampón de resuspensión y las bolas de purificación de muestras se encuentran a temperatura ambiente.
- ▶ Etiquete una nueva placa HSP de 96 pocillos como NEA (amplificación de enriquecimiento Nextera) con un rotulador permanente.

Procedimiento

- 1 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEC1.
- 2 Agite el tubo de las bolas de purificación de muestras hasta que las bolas estén bien dispersas; a continuación, añada 45 μ l de bolas de purificación de muestras bien mezcladas a cada pocillo de la placa NEC1.
- 3 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEC1 con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NEC1 en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 1 minuto.
- 4 Incube la placa NEC1 a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 5 Centrifugue la placa NEC1 a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 6 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEC1.
- 7 Coloque la placa NEC1 en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 8 Extraiga y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa NEC1.



NOTA

Deje la placa NEC1 en el soporte magnético mientras lleva a cabo los siguientes pasos de lavado de EtOH al 80 % (9-11).

- 9 Con la placa NEC1 en el soporte magnético, añada lentamente 200 μ l de EtOH al 80 % recién preparado a cada pocillo sin alterar las bolas. Incube la placa a temperatura ambiente durante 30 segundos.
- 10 Extraiga y deseche el EtOH al 80 % de cada pocillo de la placa NEC1.
- 11 Repita los pasos 9 y 10 una vez para un total de dos lavados de EtOH al 80 %.
- 12 Con una pipeta monocal o multicanal de 20 μ l, retire el EtOH al 80 % restante de cada pocillo de la placa NEC1 sin alterar las bolas.
- 13 Deje la placa NEC1 a temperatura ambiente durante 10 minutos para que se seque en el soporte magnético.
- 14 Extraiga la placa NEC1 del soporte magnético.
- 15 Añada 27,5 μ l de tampón de resuspensión a cada pocillo de la placa NEC1. No toque las bolas con las puntas de pipeta.

- 16 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEC1 con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NEC1 en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 1 minuto.
- 17 Incube la placa NEC1 a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 18 Centrifugue la placa NEC1 a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 19 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEC1.
- 20 Coloque la placa NEC1 en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 21 Transfiera 25 μl de sobrenadante transparente de cada pocillo de la placa NEC1 al pocillo correspondiente de la nueva placa HSP etiquetada como NEA. Tenga cuidado de no alterar las bolas.



NOTA

Ilumina recomienda usar una pipeta monocanal o multicanal de 20 μl establecida en 12,5 μl para realizar dos transferencias consecutivas de 12,5 μl . Esta técnica disminuye la pérdida de muestra al asegurarse de que se transfiere todo el líquido sin alterar las bolas.



PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si no tiene pensado continuar inmediatamente con la *Segunda amplificación PCR* en la página 49, puede detener el protocolo de forma segura en este punto. Si va a parar, selle la placa NEA con un sello adhesivo Microseal "B" y almacénela a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante siete días como máximo.

Segunda amplificación PCR

Este proceso amplifica la biblioteca capturada mediante un programa de PCR de 10 ciclos. Es fundamental usar toda la cantidad de ADN de entrada recomendada, así como no añadir ciclos adicionales de PCR para garantizar que las bibliotecas generen resultados de secuenciación de alta calidad.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Mezcla para amplificación de enriquecimiento Nextera (NEM)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Mezcla de cebadores de PCR (PPC)	1 tubo	Entre -15 °C y -25 °C	Illumina
Película Microseal "A"	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sello adhesivo Microseal "B"	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Retire la mezcla para amplificación de enriquecimiento Nextera y la mezcla de cebadores de PCR almacenadas a una temperatura de -15 °C a -25 °C y descongele en hielo.
 - Centrifugue brevemente los tubos de mezcla para amplificación de enriquecimiento Nextera y la mezcla de cebadores de PCR descongelados durante 5 segundos.



NOTA

Si no pretende consumir la mezcla para amplificación de enriquecimiento Nextera y la mezcla de cebadores de PCR en un solo uso, dispense los reactivos en alícuotas de un solo uso. Congele las alícuotas para evitar ciclos de congelación-descongelación repetidos.

- ▶ Extraiga la placa NEA almacenada a una temperatura de entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, si se almacenó al final de la *Segunda captura* y descongélela en hielo.
 - Centrifugue la placa NEA descongelada a $280 \times g$ durante 1 minuto.
 - Extraiga el sello adhesivo de la placa NEA descongelada.
- ▶ Programe previamente el ciclador térmico con el programa siguiente y guárdelo como **NEM AMP10**:
 - Seleccione la opción de precalentar la tapa y establézcala a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos.
 - **10 ciclos** de:
 - $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 segundos.
 - $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos.
 - $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos.
 - $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos.
 - Mantenga la temperatura a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.



NOTA

Illustra ha optimizado el número de ciclos de PCR recomendados para ensayos de enriquecimiento en función del nivel de agrupación de muestras enriquecidas previamente y del tamaño del conjunto de oligonucleótidos. No añada ni reduzca los ciclos de PCR, ya que podrían afectar a la calidad de los datos.

Procedimiento

- 1 Añada $5\text{ }\mu\text{l}$ de la mezcla de cebadores de PCR a cada pocillo de la placa NEA.
- 2 Añada $20\text{ }\mu\text{l}$ de la mezcla para amplificación de enriquecimiento Nextera a cada pocillo de la placa NEA.
- 3 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEA con una película Microseal "A". Utilice un rodillo de sello adhesivo para aplicar fuerza a la película y asegurarse de que la película quede fijada.
 - b Agite la placa NEA en un agitador de microplacas a 1200 rpm durante 1 minuto.
- 4 Centrifugue la placa NEA a $280 \times g$ durante 1 minuto.
- 5 Coloque la placa NEA sellada en el ciclador térmico preprogramado. Cierre la tapa; a continuación, seleccione y ejecute el programa **NEM AMP10**.



PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si no tiene pensado continuar inmediatamente con la *Segunda limpieza de PCR* en la página 52, la placa NEA puede permanecer en el ciclador térmico durante la noche. Si va a parar, reemplace la película Microseal "A" por un Microseal "B" y almacene la placa NEA a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C durante un máximo de dos días.

Segunda limpieza de PCR

En este proceso se emplean bolas de purificación de muestras para purificar la biblioteca enriquecida y eliminar los productos no deseados.

Consumibles


Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Tampón de resuspensión (RSB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina
Bolas de purificación de muestras (SPB)	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina
Placa HSP de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placa MIDI de 96 pocillos	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Etanol (EtOH) recién preparado al 80 %	400 µl por muestra	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sellos adhesivos Microseal "B"	3	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- ▶ Consulte las mejores prácticas para la *manipulación de bolas magnéticas*. Consulte *Recursos adicionales* en la página 5 para obtener información sobre cómo acceder a las mejores prácticas de TruSight One en el sitio web Illumina.
- ▶ Asegúrese de que el tampón de resuspensión y las bolas de purificación de muestras se encuentran a temperatura ambiente.
- ▶ Extraiga la placa NEA almacenada a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C, si se almacenó al final de la *Segunda amplificación PCR* y deje que alcance la temperatura ambiente.

- ▶ Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como **NEC2** (limpieza enriquecida Nextera 2) con un rotulador permanente.
- ▶ Etiquete una nueva placa HSP de 96 pocillos como **NES** (muestra de enriquecimiento Nextera) con un rotulador permanente.

Procedimiento

- 1 Centrifugue la placa NEA a $280 \times g$ durante 1 minuto.
 - 2 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEA.
 - 3 Transfiera todo el contenido de cada pocillo de la placa NEA al pocillo correspondiente de la nueva placa MIDI de 96 pocillos etiquetada como NEC2.
 - 4 Agite las bolas de purificación de muestras hasta que estén bien dispersas.
 - 5 Añada $90 \mu\text{l}$ de bolas de purificación de muestras bien mezcladas a cada pocillo de la placa NEC2 que contenga $50 \mu\text{l}$ de biblioteca amplificada de PCR.
 - 6 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEC2 con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NEC2 en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 1 minuto.
 - 7 Incube la placa NEC2 a temperatura ambiente durante 10 minutos.
 - 8 Centrifugue la placa NEC2 a $280 \times g$ durante 1 minuto.
 - 9 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEC2.
 - 10 Coloque la placa NEC2 en el soporte magnético a temperatura ambiente durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
 - 11 Extraiga y deseche con cuidado todo el sobrenadante de cada pocillo de la placa NEC2.
-  **NOTA**
Deje la placa NEC2 en el soporte magnético mientras lleva a cabo los siguientes pasos de lavado de EtOH al 80 % (12-14).
- 12 Con la placa NEC2 en el soporte magnético, añada lentamente $200 \mu\text{l}$ de EtOH al 80 % recién preparado a cada pocillo sin alterar las bolas. Incube la placa a temperatura ambiente durante 30 segundos.
 - 13 Extraiga y deseche el EtOH al 80 % de cada pocillo de la placa NEC2.
 - 14 Repita los pasos 12 y 13 una vez para un total de dos lavados de EtOH al 80 %.

- 15 Con una pipeta monocal o multicanal de 20 μ l, extraiga el EtOH al 80 % restante de cada pocillo de la placa NEC2 sin alterar las bolas.
- 16 Deje la placa NEC2 a temperatura ambiente durante 10 minutos para que se seque en el soporte magnético.
- 17 Extraiga la placa NEC2 del soporte magnético.
- 18 Añada 32,5 μ l de tampón de resuspensión a cada pocillo de la placa NEC2. No toque las bolas con las puntas de pipeta.
- 19 Mezcle concienzudamente como se indica a continuación:
 - a Selle la placa NEC2 con un sello adhesivo Microseal "B".
 - b Agite la placa NEC2 en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 1 minuto.
- 20 Incube la placa NEC2 a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 21 Centrifugue la placa NEC2 a 280 \times g durante 1 minuto.
- 22 Extraiga el sello adhesivo de la placa NEC2.
- 23 Coloque la placa NEC2 en el soporte magnético durante 2 minutos o hasta que el líquido sea transparente.
- 24 Transfiera 30 μ l de sobrenadante transparente de cada pocillo de la placa NEC2 al pocillo correspondiente de la nueva placa HSP etiquetada como NES. Tenga cuidado de no alterar las bolas.



NOTA

Ilumina recomienda usar una pipeta monocal o multicanal de 20 μ l establecida en 15 μ l para realizar dos transferencias consecutivas de 15 μ l. Esta técnica disminuye la pérdida de muestra al asegurarse que se transfiere todo el líquido sin alterar las bolas.

- 25 Selle la placa NES con un sello adhesivo Microseal "B".



PUNTO DE DETENCIÓN SEGURO

Si no tiene pensado continuar inmediatamente con la *Validación de bibliotecas* en la página 55, almacene la placa NES sellada a una temperatura de entre -15°C y -25°C durante un máximo de 7 días. Si se almacena la placa durante más de 7 días, recuantifique la biblioteca para garantizar la precisión de los resultados de enriquecimiento.

Validación de bibliotecas

Ilumina recomienda realizar los siguientes procedimientos para el análisis del control de calidad y la cuantificación de la biblioteca enriquecida.

Cuantificación de bibliotecas

Para lograr la máxima calidad de datos en las plataformas de secuenciación de Illumina, es importante crear las densidades de grupos óptimas en cada carril de las celdas de flujo. Las densidades de grupo óptimas exigen una cuantificación precisa de las plantillas de la biblioteca de ADN.

Ilumina recomienda el ensayo de ADNds fluorimétrico para cuantificar muestras de ADNds, ya que puede cuantificar volúmenes pequeños de ADN y mide el ADN directamente. Otras técnicas se pueden contaminar con ARN o proteínas, por ejemplo. Ilumina recomienda usar un espectrofluorímetro, ya que la fluorimetría ofrece cuantificación específica de ADN. La espectrofotometría también puede medir el ARN y obtener valores que son demasiado elevados.

Si se cuantifica una biblioteca de 3-12 secuencias, antes de la cuantificación diluya la biblioteca enriquecida posteriormente añadiendo 2 μl a 28 μl de tampón de resuspensión en un tubo o pocillo nuevos. Utilice esta dilución para la cuantificación y la evaluación de la calidad, así como para la secuenciación. No es necesaria una dilución para enriquecimientos de 1 o 2 secuencias.



NOTA

Utilice la siguiente fórmula para pasar de $\text{ng}/\mu\text{l}$ a nM . Suponga un tamaño de biblioteca de 650 bp o calcúlelo en función del tamaño medio de la biblioteca enriquecida:

$$\frac{(\text{concentración en ng}/\mu\text{l})}{(660 \text{ g/mol} * \text{tamaño medio de biblioteca})} \times 10^6 = \text{concentración en nM}$$

Por ejemplo:

$$\frac{15 \text{ ng}/\mu\text{l}}{(660 \text{ g/mol} * 650)} \times 10^6 = 34,9 \text{ nM}$$

De forma alternativa, puede cuantificar las bibliotecas mediante qPCR conforme a la *Guía de cuantificación qPCR de la biblioteca de secuenciación (n.º de referencia 11322363)*.



NOTA

Puede descargar la *Guía de cuantificación qPCR de la biblioteca de secuenciación* del sitio web de Illumina en support.illumina.com/sequencing/kits.ilmn.

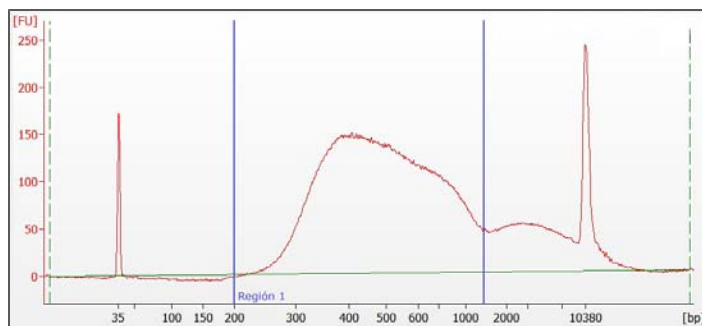
Haga clic en la página de asistencia **Panel de secuenciación TruSight One Support**. A continuación, haga clic en **Documentation & Literature** (Documentación) en la página de asistencia **Panel de secuenciación TruSight One Support**.

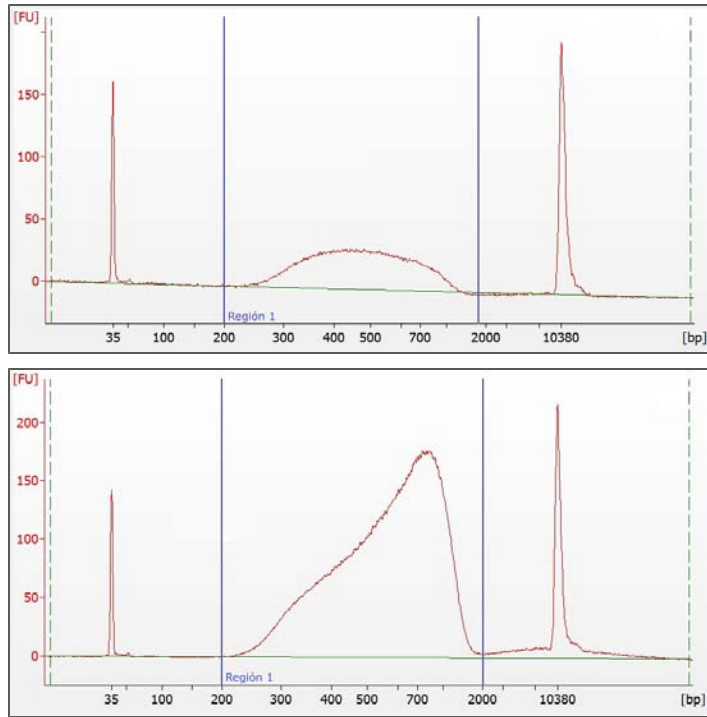
Evaluación de calidad (opcional)

Para evaluar la calidad de la biblioteca, cargue 1 μ l de la biblioteca enriquecida posteriormente diluida en un bioanalizador 2100 de Agilent Technologies con un chip de ADN de alta sensibilidad de Agilent.

Compruebe el tamaño de la biblioteca para obtener una distribución de fragmentos de ADN con un intervalo de tamaño de aproximadamente entre 200 bp y 1 kb. En función del nivel de indexación, la distribución del tamaño del fragmento puede variar ligeramente; sin embargo, el pico de la biblioteca no debe desplazarse significativamente en comparación a los ejemplos de la Figura 4.

Figura 4 Ejemplo de distribuciones de biblioteca de enriquecimiento posterior de TruSight One





NOTA

Las líneas azules indican los límites que se crearon manualmente para determinar el tamaño medio de la biblioteca. En el primer ejemplo, se puede ver un segundo pico inferior a ~2000 bp. No incluya este pico en la determinación del tamaño medio de biblioteca. La presencia de estos fragmentos más grandes no influye en la generación de grupos posterior y la secuenciación de la biblioteca enriquecida.

Preparación de bibliotecas para la secuenciación en un MiSeq

Ilumina recomienda el uso del protocolo siguiente para alcanzar una densidad de grupos óptima al secuenciar una biblioteca de TruSight One en un MiSeq®. Puede ser necesaria la optimización de concentraciones cargadas para alcanzar las densidades de grupo deseadas.

Consumibles

Elemento	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Tampón de hibridación (HT1)	1 tubo	Entre -15 °C y -30 °C	Ilumina
2N NaOH (HP3)	1 tubo	Entre -15 °C y -30 °C	Usuario
Agua apta para PCR		Entre -15 °C y -30 °C	Usuario
PhiX (opcional)		Entre -15 °C y -30 °C	Usuario

Preparación de una nueva dilución de NaOH

- 1 Diluya la dilución enriquecida posteriormente que se ha usado para cuantificación fluorimétrica en una concentración final de 1,25 nM con el tampón RSB. Son necesarios 10 µl de material diluido por cartucho de MiSeq. Intente usar un mínimo de 4 µl de biblioteca para garantizar que se aspiren los volúmenes apropiados.



NOTA

Al seguir este protocolo, se alcanza una concentración final de 12,5 pM de biblioteca cargada en el MiSeq mediante la creación de una dilución posteriormente enriquecida de 1,25 nM. Si se desea una concentración final de 8 pM, diluya la dilución enriquecida posteriormente en una concentración final de 0,8 nM. De manera alternativa, si se desea una concentración final de 10,0 pM, diluya la dilución enriquecida posteriormente en una concentración final de 1,0 nM.

- 2 Prepare una nueva solución de NaOH 0,1 N mediante HP3 tomando 10 μ l de HP3 + 190 μ l de agua.
- 3 Combine 10 μ l de 1,25 nM de biblioteca + 10 μ l de NaOH 0,1N y mézclelo bien.
- 4 Incube la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 5 Tras la incubación, añada 980 μ l de HT1 y agítelo para mezclarlo bien.
- 6 Coloque el ADN desnaturalizado en hielo hasta que esté listo para cargarlo en el cartucho MiSeq.
- 7 Cargue toda la muestra en el cartucho MiSeq y siga con la secuenciación.

Biblioteca de secuencias

Proceda con la generación de grupos. Para obtener más información, consulte la sección de generación de grupos de la guía del usuario para la plataforma de Illumina.

- ▶ Cuando se cuantifica una biblioteca enriquecida posteriormente de TruSight One mediante un método fluorimétrico, la formación de grupos a 12,5 pM genera densidades de grupos en el intervalo de 1200 k-1400 k grupos/mm² usando el software MiSeq V3 y los reactivos. Los resultados pueden variar en función del método de cuantificación. Illumina recomienda que determine la concentración de la biblioteca con la relación de la densidad de grupos en función de la instrumentación de su laboratorio.
- ▶ Revise los procedimientos, en la tarjeta de referencia rápida de IEM, sobre cómo crear una hoja de muestras para Panel de secuenciación TruSight One. Consulte *Recursos adicionales* en la página 5 para obtener información sobre cómo descargar el software de IEM y la documentación de IEM apropiada de TruSight One del sitio web de Illumina.
- ▶ También se puede llevar a cabo un pequeño experimento de secuenciación en MiSeq para optimizar la densidad de grupos antes de realizar un experimento de secuenciación de alta densidad.
- ▶ Las bibliotecas preparadas de TruSight One contienen índices dobles de 8 bp. Dependiendo de la combinación de índices usados en la agrupación de bibliotecas, configure el experimento de secuenciación para lecturas de índice únicos o dobles de 8 bp.
- ▶ Al generar grupos de bibliotecas de TruSight One en cBot™ y la secuenciación en HiSeq 1000/2000, GAIIx o en el modo de alto rendimiento de HiSeq 1500/2500, es preciso contar con nuevos cebadores si el experimento es de doble índice, de un solo índice o sin índice. Utilice el kit del cebador de secuenciación del índice doble TruSeq para experimentos "paired-end" (n.º de catálogo PE-121-1003), que sirve para un experimento único y contiene los cebadores requeridos para la secuenciación (HP10, HP11, HP12). Estos cebadores se incluyen con los kits de reactivos para experimentos rápidos MiSeq y HiSeq 1500/2500.
- ▶ Para la secuenciación de bibliotecas de TruSight One, Illumina recomienda un experimento de secuenciación de 151 ciclos "paired-end". Debido a los tamaños de biblioteca generados en TruSight One, la secuenciación en longitudes de lectura más largas puede derivar en un incremento de la probabilidad de secuenciación en la secuencia flanqueadora del adaptador.

Información complementaria

Introducción	62
Acrónimos	63
Ciclador térmico alternativo: pasos para un enriquecimiento adecuado	65
Contenido del kit	66
Consumibles y equipos	71
Secuencias de índice	75



Introducción

En los protocolos descritos en esta guía se asume que ha revisado el contenido del presente apéndice, que ha confirmado el contenido del kit y que ha obtenido todos los consumibles y el equipo necesarios.

Acrónimos

Tabla 2 Acrónimos de Panel de secuenciación TruSight One

Acrónimo	Definición
ADNs	ADN de cadena doble
EE1	Tampón de elución de enriquecimiento 1
EHB	Tampón de hibridación de enriquecimiento
ET2	Tampón objetivo de elución 2
EWS	Solución de lavado de enriquecimiento
gADN	ADN genómico
HP3	2N NaOH
HSP	Placa de carcasa dura
NEA	Placa para amplificación de enriquecimiento Nextera
NEC1	Placa para limpieza enriquecida Nextera 1
NEC2	Placa para limpieza enriquecida Nextera 2
NEH1	Placa de hibridación de enriquecimiento Nextera 1
NEH2	Placa de hibridación de enriquecimiento Nextera 2
NEM	Mezcla para amplificación de enriquecimiento Nextera
NES	Placa de muestras de enriquecimiento Nextera
NEW1	Placa de lavado de enriquecimiento Nextera 1
NEW2	Placa de lavado de enriquecimiento Nextera 2
NLA	Placa para amplificación de biblioteca Nextera
NLC	Placa para limpieza de biblioteca Nextera

Acrónimo	Definición
NLM	Mezcla para amplificación de bibliotecas Nextera
NLS	Placa de muestras de biblioteca Nextera
NLT	Placa de marcado de biblioteca Nextera
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PPC	Mezcla de cebadores de PCR
RSB	Tampón de resuspensión
SMB	Bolas magnéticas de estreptavidina
SPB	Bolas de purificación de muestras
ST	Tampón de marcado de detención
TD	Tampón de ADN marcado
TDE1	Enzima de ADN marcado 1
TOO	Oligonucleótidos de TruSight One

Ciclador térmico alternativo: pasos para un enriquecimiento adecuado

Los pasos del lavado de enriquecimiento eliminan la unión de ADN no específico a las bolas magnéticas de estreptavidina y es preciso que las muestras se conserven a una temperatura específica para que se realice correctamente. Temperaturas demasiado altas o demasiado bajas pueden originar porcentajes de enriquecimiento inferiores a causa de una unión no específica y una disminución de rendimientos debido a la pérdida de regiones objetivo. Illumina recomienda usar un sistema de microcalentamiento para llevar a cabo estos pasos. Si no dispone de un sistema de microcalentamiento, se puede usar un ciclador térmico. Siga estos pasos al usar un ciclador térmico.

- 1 Transfiera la muestra y las bolas resuspendidas en la solución de lavado de enriquecimiento a una placa PCR (unos 200 μ l en volumen).
- 2 Selle la placa PCR con un sello adhesivo Microseal "B". Utilice un rodillo de sello adhesivo para aplicar fuerza al sello y asegurarse de que el sello quede fijado.
- 3 Incube la placa PCR en el ciclador térmico a 42 °C durante 30 minutos con una tapa calentada establecida en 100 °C.



NOTA

Para obtener resultados óptimos, es importante que la tapa del ciclador térmico esté a 100 °C.

- 4 Coloque el soporte magnético cerca del ciclador térmico para poder acceder de inmediato.
- 5 Extraiga la placa PCR del ciclador térmico y colóquelo inmediatamente en el soporte magnético durante 2 minutos hasta que el líquido sea transparente.
- 6 Extraiga el sello adhesivo de la placa PCR.
- 7 Extraiga y deseche inmediatamente todo el sobrenadante de cada pocillo.
- 8 Extraiga la placa PCR del soporte magnético.
- 9 Añada 200 μ l de solución de lavado de enriquecimiento a cada pocillo de muestras de la placa PCR. Pipetee con cuidado todo el volumen arriba y abajo entre 10 y 20 veces. Mezcle concienzudamente y evite que se produzcan demasiadas burbujas o espuma. Asegúrese de que las bolas quedan completamente resuspendidas.
- 10 Repita los pasos del 2 al 8 una vez.
- 11 Siga con el paso de la elución.

Contenido del kit

Asegúrese de que dispone de todos los reactivos identificados en esta sección antes de seguir con los procedimientos de preparación de la biblioteca. Los kits de Panel de secuenciación TruSight One están disponibles en las configuraciones siguientes.

Tabla 3 Kits de Panel de secuenciación TruSight One

Nombre del kit	N.º de catálogo	*N.º de catálogo TG
Panel de secuenciación TruSight One (9 muestras)	FC-141-1006	TG-141-1006
Panel de secuenciación TruSight One (36 muestras)	FC-141-1007	TG-141-1007



NOTA

*Los consumibles que muestran la etiqueta TG presentan características previstas para ayudar a reducir la frecuencia de revalidación. Están disponibles solo bajo acuerdo de suministro y requieren que usted proporcione una estimación vinculante. Póngase en contacto con su comercial para obtener más información.

Nota sobre las patentes de biomarcadores y otras patentes exclusivas para los usos específicos de los productos.

Algunas variantes genómicas, incluidas algunas secuencias de ácidos nucleicos y su uso en aplicaciones específicas podrían estar protegidas por patentes. Se advierte a los clientes de que deberán determinar si deben obtener licencias de la parte que es propietaria o controla dichas patentes para utilizar el producto en la aplicación específica del cliente.

Contenido de Panel de secuenciación TruSight One (9 muestras) (FC-141-1006, TG-141-1006)

Caja 1: reactivos de captura rápida

Esta caja se envía a temperatura ambiente. En cuanto reciba el kit, almacene los componentes según lo especificado.

Cantidad	Acrónimo	Nombre del reactivo	Temperatura de almacenamiento
1	SPB	Bolas de purificación de muestras	Entre 2 °C y 8 °C
2	SMB	Bolas magnéticas de estreptavidina	Entre 2 °C y 8 °C
1	ET2	Tampón objetivo de elución 2	Entre 2 °C y 8 °C
1	ST	Tampón de marcado de detención	Entre 15 °C y 30 °C

Caja 2: reactivos de captura rápida

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto reciba el kit, almacene los componentes a una temperatura de entre -15 y -25 °C.

Cantidad	Acrónimo	Nombre del reactivo	Temperatura de almacenamiento
1	TDE1	Enzima de ADN marcado	Entre -15°C y -25°C
1	EE1	Tampón de elución de enriquecimiento 1	Entre -15 °C y -25 °C
1	TD	Tampón de ADN marcado	Entre -15 °C y -25 °C
1	RSB	Tampón de resuspensión	Entre -15 °C y -25 °C
1	NLM	Mezcla para amplificación de bibliotecas Nextera	Entre -15 °C y -25 °C
1	EHB	Tampón de hibridación de enriquecimiento	Entre -15 °C y -25 °C
1	EWS	Solución de lavado de enriquecimiento	Entre -15 °C y -25 °C
1	HP3	2N NaOH	Entre -15 °C y -25 °C
1	PPC	Mezcla de cebadores de PCR	Entre -15 °C y -25 °C
2	NEM	Mezcla para amplificación de enriquecimiento Nextera	Entre -15 °C y -25 °C

Caja 3: índices

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto reciba el kit, almacene los componentes a una temperatura de entre -15 y -25 °C.

Cantidad	Nombre del reactivo	Temperatura de almacenamiento
1 tubo	Cebador de índice, de E503 a E504	Entre -15 °C y -25 °C
1 tubos	Cebador de índice, N701, N705 y N709	Entre -15 °C y -25 °C

Caja 4: oligonucleótidos

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto reciba el kit, almacene los componentes a una temperatura de entre -15 y -25 °C.

Cantidad	Nombre del reactivo	Temperatura de almacenamiento
1 tubo	Contenido de TruSight One	Entre -15 °C y -25 °C

Kit de reactivos MiSeq v3, caja 1

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto reciba el kit, almacene los componentes a una temperatura de entre -15 y -25 °C.

Cantidad	Nombre del reactivo	Temperatura de almacenamiento
3	Tampón de hibridación	Entre -15 °C y -25 °C
3	Cartucho MiSeq V3	Entre -15 °C y -25 °C

Kit de reactivos MiSeq v3, caja 2

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto reciba el kit, almacene los componentes a una temperatura de entre -15 y -25 °C.

Cantidad	Nombre del reactivo	Temperatura de almacenamiento
3	Celda de flujo de MiSeq	Entre -15 °C y -25 °C
3	Botella de PR2	Entre -15 °C y -25 °C

Contenido de Panel de secuenciación TruSight One (36 muestras) (FC-141-1007, TG-141-1007)

Caja 1: reactivos de captura rápida

Esta caja se envía a temperatura ambiente. En cuanto reciba el kit, almacene los componentes según lo especificado.

Cantidad	Acrónimo	Nombre del reactivo	Temperatura de almacenamiento
2	SPB	Bolas de purificación de muestras	Entre 2 °C y 8 °C
2	SMB	Bolas magnéticas de estreptavidina	Entre 2 °C y 8 °C
1	ET2	Tampón objetivo de elución 2	Entre 2 °C y 8 °C
1	ST	Tampón de marcado de detención	Entre 15 °C y 30 °C

Caja 2: reactivos de captura rápida

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto reciba el kit, almacene los componentes a una temperatura de entre -15 °C y -25 °C.

Cantidad	Acrónimo	Nombre del reactivo	Temperatura de almacenamiento
2	TDE1	Enzima de ADN marcado	Entre -15 °C y -25 °C
1	EE1	Tampón de elución de enriquecimiento 1	Entre -15 °C y -25 °C
1	TD	Tampón de ADN marcado	Entre -15 °C y -25 °C
1	RSB	Tampón de resuspensión	Entre -15 °C y -25 °C
2	NLM	Mezcla para amplificación de bibliotecas Nextera	Entre -15 °C y -25 °C
1	EHB	Tampón de hibridación de enriquecimiento	Entre -15 °C y -25 °C
1	EWS	Solución de lavado de enriquecimiento	Entre -15 °C y -25 °C
1	HP3	2N NaOH	Entre -15 °C y -25 °C
1	PPC	Mezcla de cebadores de PCR	Entre -15 °C y -25 °C
2	NEM	Mezcla para amplificación de enriquecimiento Nextera	Entre -15 °C y -25 °C

Caja 3: índices

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto reciba el kit, almacene los componentes a una temperatura de entre -15 y -25 °C.

Cantidad	Nombre del reactivo	Temperatura de almacenamiento
1 tubo	Cebador de índice, de E502 a E505	Entre -15 °C y -25 °C
2 tubos	Cebador de índice, de N701 a N712	Entre -15 °C y -25 °C

Caja 4: oligonucleótidos

Esta caja se envía en hielo seco. En cuanto reciba el kit, almacene los componentes a una temperatura de entre -15 y -25 °C.

Cantidad	Nombre del reactivo	Temperatura de almacenamiento
1 tubo	Contenido de TruSight One	Entre -15 °C y -25 °C

Consumibles y equipos

Asegúrese de que dispone de todo el equipo y los consumibles suministrados por el usuario antes de proceder a preparar la biblioteca y los procedimientos de enriquecimiento.



NOTA

Se ha optimizado el protocolo de TruSight One y se ha validado usando los elementos indicados. No se garantiza un rendimiento similar en caso de emplear consumibles y equipos distintos.

Tabla 4 Consumibles que debe proporcionar el usuario

Consumible	Proveedor
Tubos de microcentrífuga, 1,7 ml	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta de barrera de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas multicanal de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas monocanal de 20 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta de barrera de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas multicanal de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas monocanal de 200 µl	Proveedor de laboratorio general
Puntas de pipeta de barrera de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas multicanal de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general
Pipetas monocanal de 1000 µl	Proveedor de laboratorio general

Consumible	Proveedor
Rodillo de sello adhesivo	Proveedor de laboratorio general
Placas de almacenamiento de 96 pocillos, 0,8 ml, pocillo redondo (placa MIDI)	Fisher Scientific, n.º de referencia AB-0859
Placas de PCR de 96 pocillos de carcasa dura (placa "HSP")	Bio-Rad, n.º de referencia HSP-9601
[Opcional] Unidad de filtro de centrifuga Amicon Ultra-0.5 (0,5 ml, 30 kDa) Nota: Se usa para concentrar una biblioteca agrupada. Otra opción es emplear un concentrador de vacío.	Millipore, n.º de referencia UFC503008
Etanol, 200 probado (absoluto) para biología molecular (500 ml)	Sigma-Aldrich, n.º de referencia E7023
Película Microseal "A"	Bio-Rad, n.º de referencia MSA-5001
Sellos adhesivos Microseal "B"	Bio-Rad, n.º de referencia MSB-1001
Tapas y gradillas de ocho tubos sin ARNasa/ADNasa	Proveedor de laboratorio general
Depósitos de reactivos multicanal, desechables, sin ARNasa/ADNasa	VWR, n.º de referencia 89094-658
Tris-HCl 10 mM, pH 8,5	Proveedor de laboratorio general
[Opcional] Kit de fijación de placa de índices TruSeq Nota: Recomendado para configurar cebadores de PCR de índice. Es reutilizable.	Illumina, n.º de catálogo FC-130-1005
Agua apta para PCR	Proveedor de laboratorio general

Tabla 5 Equipo proporcionado por el usuario

Equipo	Proveedor
[Opcional] Sistema bioanalizador 2100 de escritorio	Agilent, n.º de referencia G2940CA
[Opcional] Chip de ADN 1000	Agilent, n.º de referencia 5067-1504
[Opcional] Chip de ADN de alta sensibilidad	Agilent, n.º de referencia 4067-4626
Ciclador térmico DNA Engine Multi-Bay Consulte <i>Cicladores térmicos</i> en la página 74.	Bio-Rad, n.º de referencia PTC-0240G o PTC-0220G, con Alpha Unit, n.º de referencia ALS-1296GC
Agitador de microplacas de alta velocidad	VWR, n.º de catálogo • 13500-890 (110 V/120 V) o • 14216-214 (230 V)
Soporte magnético para 96 pocillos	Life Technologies, n.º de referencia AM10027
Microcentrífuga	Proveedor de laboratorio general
Sistema de microcalentamiento: sistema de calentamiento SciGene TruTemp	Illumina, n.º de catálogo • SC-60-503 (115 V) o • SC-60-504 (220 V)
Centrífuga para microplacas	Proveedor de laboratorio general

Equipo	Proveedor
Inserción de placa MIDI para sistema de microcalentamiento	Illumina, n.º de catálogo BD-60-601
Cuantificación fluorimétrica con reactivos de colorantes de unión de ADNds	Proveedor de laboratorio general
[Opcional] Concentrador de vacío Nota: Se usa para concentrar una biblioteca agrupada. Otra opción es emplear unidades de filtro de centrifuga Amicon Ultra-0.5.	Proveedor de laboratorio general
Mezclador vorticial	Proveedor de laboratorio general

Cicladores térmicos

En la tabla siguiente se indican las configuraciones recomendadas para el ciclador térmico recomendado por Illumina, así como para otros modelos comparables. Si su laboratorio dispone de un ciclador térmico que no aparece en la lista, válidelo antes de llevar a cabo el protocolo de TruSight One.

Ciclador térmico	Modo temperatura	Temperatura de la tapa	Tipo de recipiente
Bio-Rad DNA Engine Tetrad 2	Estimado	Caliente, constante a 100 °C	Placas y tubos de polipropileno
MJ Research DNA Engine Tetrad	Estimado	Caliente	Placa
Eppendorf Mastercycler Pro S	Gradiente S, tubo simulado	Caliente	Placa

Secuencias de índice

La lista siguiente de secuencias de índice se proporciona para generar hojas de muestras para demultiplexar las muestras. Una estrategia de indexación doble utiliza dos índices de base 8, el índice 1 (i7), junto a la secuencia P7 y el índice 2 (i5), junto a la secuencia P5. La indexación doble se habilita añadiendo un índice 1 (i7) único y un índice 2 (i5) a cada muestra.

- ▶ N se corresponde con Nextera
- ▶ E se corresponde con enriquecimiento
- ▶ 7 se corresponde con índice 1 (i7)
- ▶ 5 se corresponde con índice 2 (i5)
- ▶ 01-12 se corresponde con el número del índice

Tabla 6 Secuencias del adaptador del índice de TruSight One

Índice 1 (i7)	Secuencia	Índice 2 (i5)	Secuencia
N701	TAAGGCCGA	E502*	CTCTCTAT
N702*	CGTACTAG	E503	TATCCTCT
N703*	AGGCAGAA	E504	AGAGTAGA
N704*	TCCTGAGC	E505*	GTAAGGAG
N705	GGACTCCT		
N706*	TAGGCATG		
N707*	CTCTCTAC		
N708*	CAGAGAGG		
N709	GCTACGCT		
N710*	CGAGGCTG		
N711*	AAGAGGCA		
N712*	GTAGAGGA		

* Solo están disponibles en el kit de Panel de secuenciación TruSight One (36 muestras).



NOTA

Las secuencias de índice 2 (i5) de la serie E500 en los kits de TruSight One son idénticos a las secuencias de índice 2 (i5) de la serie S500 de otros kits. Sin embargo, los adaptadores del índice 2 (i5) no son intercambiables entre kits.

Asistencia técnica

Si necesita asistencia técnica, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Tabla 7 Información de contacto general de Illumina

Sitio web de Illumina	www.illumina.com
Correo electrónico	techsupport@illumina.com

Tabla 8 Números de teléfono del servicio de asistencia al cliente de Illumina

Zona	Número de contacto	Zona	Número de contacto
Norteamérica	1.800.809.4566	Irlanda	1.800.812949
Alemania	0800.180.8994	Italia	800.874909
Austria	0800.296575	Noruega	800.16836
Bélgica	0800.81102	Países Bajos	0800.0223859
Dinamarca	80882346	Reino Unido	0800.917.0041
España	900.812168	Suecia	020790181
Finlandia	0800.918363	Suiza	0800.563118
Francia	0800.911850	Otros países	+44.1799.534000

MSDS

Las hojas de datos de seguridad de materiales (MSDS) están disponibles en el sitio web de Illumina en www.illumina.com/msds.

Documentación del producto

La documentación del producto en PDF está disponible para su descarga en el sitio web de Illumina. Vaya a www.illumina.com/support, seleccione un producto y, a continuación, haga clic en **Documentation & Literature** (Documentación).

