

Лабораторен формуляр за проследяване TruSight™ Oncology Comprehensive (EC)

ЗА ИНВИТРО ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА
САМО ЗА ИЗНОС

Инструкции за употреба

Общ преглед на работния поток на TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) е показан на [Фигура 1](#) и [Фигура 2](#).

Преди да започнете протокола, прегледайте предупрежденията и предпазните мерки в *листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC)* (документ № 200007789).

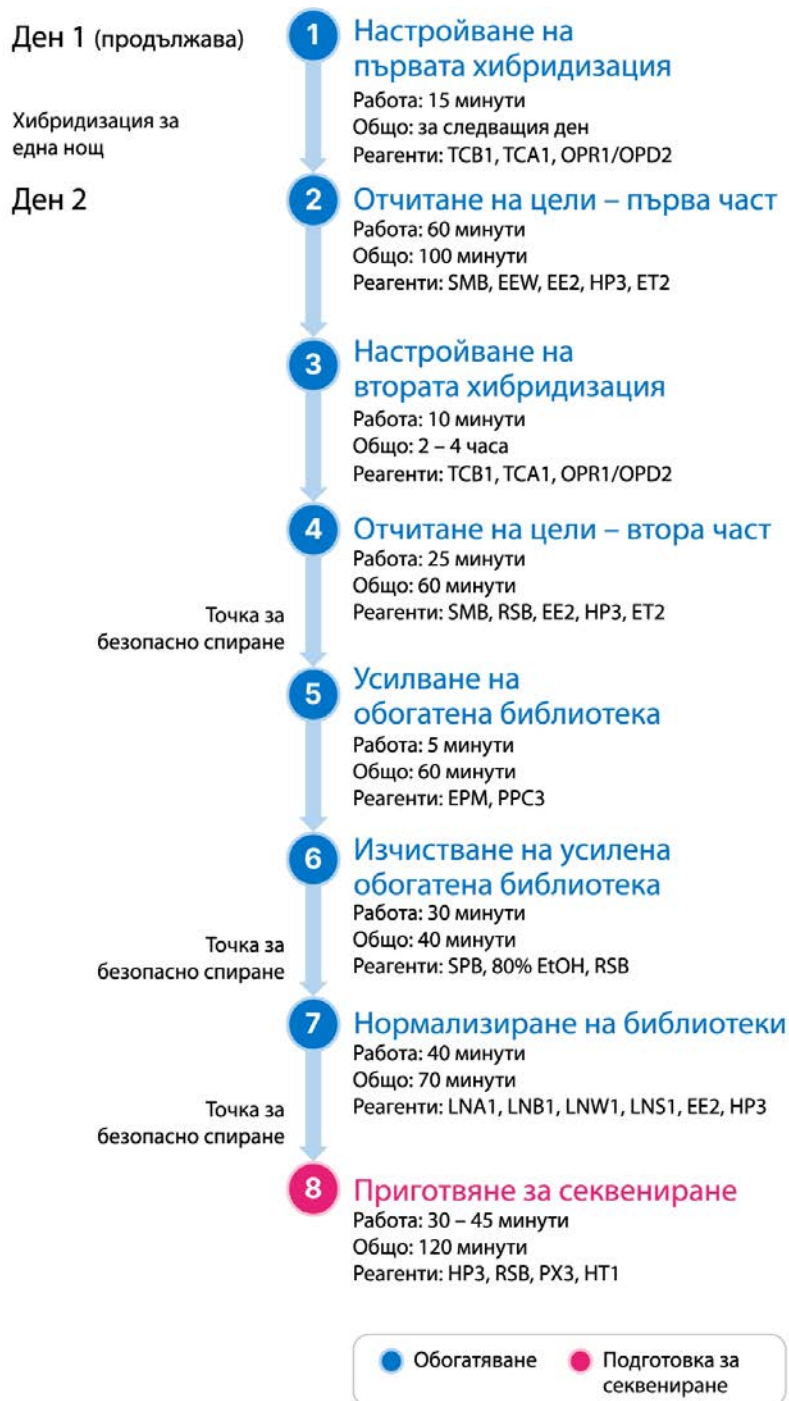
Работен процес за приготвяне на библиотеки

Фигура 1 Работен поток на TSO Comprehensive (Част 1)



Enrichment Workflow (Обогатяване на работния поток)

Фигура 2 Работен поток на TSO Comprehensive (Част 2)



Програмни термоциклери

- 1 Преди да започнете анализа, запазете следните програми на термоциклери преди и след амплификация.

Таблица 1 Програми за термоциклери преди амплификация

Процедурна стъпка	Име на програмата	Температура на капака	Обем на реакция	Параметри на термоциклер
Денатуриране и отгряване на РНК	LQ-RNA	100°C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65°C в продължение на 5 минути • 4°C в продължение на 1 минута • 4°C Задържане
Синтезиране на първата нишка cDNA	Първа SS	100°C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25°C в продължение на 10 минути • 42°C в продължение на 15 минути • 70°C в продължение на 15 минути • 4°C в продължение на 1 минута • 4°C Задържане
Синтезиране на втората нишка cDNA	Втора SS	30°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16°C в продължение на 25 минути • 4°C в продължение на 1 минута • 4°C Задържане

Ако температурата на капака за втора SS не може да бъде зададена на 30°C, изключете опцията за нагряване на предварително загрят капак.

Таблица 2 Програми за термоциклери след амплификация

Процедурна стъпка	Име на програмата	Температура на капака	Обем на реакция	Параметри на термоциклер
PCR индексирание	I-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C в продължение на 30 секунди • 15 цикъла от: <ul style="list-style-type: none"> • 98°C в продължение на 10 секунди • 60°C в продължение на 30 секунди • 72°C в продължение на 30 секунди • 72°C в продължение на 5 минути • 10°C Задържане
Извършване на първа хибридизация	HYB1	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C в продължение на 10 минути • 85°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 75°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 65°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 57°C Задържане за 8 до 24 часа

Процедурна стъпка	Име на програмата	Температура на капака	Обем на реакция	Параметри на термоциклер
Извършване на втора хибридизация	HYB2	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C в продължение на 10 минути • 85°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 75°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 65°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 57°C Задържане за 1,5 до 4 часа
Усилване на обогатена библиотека	EL-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C в продължение на 30 сек • 18 цикъла от: <ul style="list-style-type: none"> • 98°C в продължение на 10 сек • 60°C в продължение на 30 сек • 72°C в продължение на 30 сек • 72°C в продължение на 5 мин • 10°C Задържане

Въведете информация за изпълняването

Local Run Manager е софтуерът на инструмента NextSeq 550Dx, използван за конфигурация на изпълняване на TSO Comprehensive. За повече информация вижте *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (Ръководство за работен поток на TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module в Local Run Manager) (документ № 200008661)*.

Въведете информация за настройка на изпълняването и пробите директно в модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive.

Задаване на параметри за изпълнение.

- 1 Влезте в Local Run Manager на инструмента или от компютъра, свързан с мрежата.
- 2 Изберете **Create Run** (Създаване на изпълняване), а след това **TSO Comp (EU)**.
- 3 Въведете име на изпълнението, което идентифицира изпълнението от секвенирането чрез анализ, със следните критерии.
 - ▶ 1–40 знака.
 - ▶ Само буквено-цифрови знаци, тирета или долни черти.
 - ▶ Долни черти и тирета трябва да бъдат предхождани и последвани от буквено-цифров знак.
 - ▶ Уникални сред всички изпълнявания на инструмента.
- 4 **[Optional]** [По избор] Въведете описание на изпълнението, за да може то по-лесно да бъде идентифицирано по следните критерии.
 - ▶ 1–150 символа.
 - ▶ Позволен са само буквено-цифрени знаци или интервали.
 - ▶ Интервалите трябва да бъдат предхождани и последвани от буквено-цифров знак.

Посочване на проби за изпълнението.

Посочете пробите за изпълнение чрез една от опциите по-долу.

- ▶ **Enter samples manually** (Ръчно въвеждане на пробите) – Използвайте празната таблица на екрана Create Run (Създаване на изпълняване).
- ▶ **Import samples** (Импортиране на проби) – Посочете път до външен файл във формат със стойности, разделени със запетая (*.csv). На екрана Create Run (Създаване на изпълняване) се предлага шаблон за изтегляне.

**ВНИМАНИЕ**

Различията между пробите и индексните праймери водят до неправилно отчитане на резултатите поради загуба на положителна идентификация на пробата. Въведете ИД на пробите и задайте индекси в Local Run Manager, преди да започнете да приготвяте библиотеката. Запишете ИД на пробите, индексите и ориентацията на ямките на плаките за референция, когато подготвяте библиотеката.

**ВНИМАНИЕ**

За да избегнете загуба на данни, уверете се, че инсталацията на КВ не е в ход, преди да запишете изпълняване.

Въведете ръчно пробите

- 1 Въведете уникален ИД на пробата в полето Sample ID (ИД на пробата) със следните критерии. **Първо трябва да въведете всички контролни проби.** Вижте *Контролни проби на страница 7* за повече информация.
 - ▶ 1–25 символа.
 - ▶ Само буквено-цифрови знаци, тирета или долни черти.
 - ▶ Долни черти и тирета трябва да бъдат предхождани и последвани от буквено-цифров знак.
- 2 **[Optional]** (По избор) Въведете описание на пробата в полето Sample Description (Описание на пробата) при следните критерии.
 - ▶ 1–50 символа.
 - ▶ Използвайте само буквено-цифрови знаци, интервали, долни черти или тирета.
 - ▶ Интервали, долни черти и тирета трябва да бъдат предхождани и последвани от буквено-цифров знак.
- 3 Изберете индекс за ДНК библиотека и/за РНК библиотека, приготвена от пробата. Уверете се, че РНК и ДНК пробите са в отделни колонии. ДНК полето i7+i5 се попълва автоматично, след като изберете DNA Index ID (ИД на ДНК индекса). РНК полето i7+i5 се попълва автоматично, след като изберете RNA Index ID (ИД на РНК индекса). Освен обобщението тук вижте *листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200007789)* за избор на ИД на индекс.
 - ▶ За ДНК библиотека с проби, изберете уникален ИД на индекс (UPxx или CPxx индекси) от падащия списък с ИД на индекс ДНК.
 - ▶ За РНК библиотека с проби, изберете уникален ИД на индекс (само UPxx) от падащия списък с ИД на индекс на РНК.
 - ▶ Ако в изпълняването има общ брой на библиотеки, следвайте насоките за избор на индекс в *Листовка за TruSight Oncology Comprehensive (EU) (документ № 200007789)*.
- 4 Използвайте полето Тип тумор, за да определите вида тумор за всяка проба, избирайки най-специфичния тип тумор на разположение. Вижте *Избор на тип тумор на страница 7*.
- 5 Използвайте полето Тип тумор, за определите един от следните контролни типа за всяка контрола. Вижте *Контролни проби на страница 7*.
 - ДНК външна контрола
 - РНК външна контрола
 - ДНК контрола без шаблон
 - РНК контрола без шаблон

Ако използвате ДНК контрола с префикс на консуматив, типът контрола е DNA External Control (Външна ДНК контрола). Ако използвате РНК контрола с префикс на консуматив, типът контрола е RNA External Control (Външна РНК контрола).
- 6 Задайте пола.
- 7 **[Optional]** (По избор) Изберете **Export to CSV** (Експортиране в CSV), за да експортирате информация на проба към външен файл.
- 8 Прегледайте информацията на екрана Create Run (Създаване на изпълняване).

Неправилната информация може да повлияе на резултатите.

- 9 Изберете **Save Run** (Записване на изпълняване).

Импортиране на проби

- 1 Изберете **Import CSV** (Импортиране на CSV) и преминете към местоположението на файла с информация за пробата. Има два типа файлове, които може да импортирате.
 - Изберете **Download CSV** (Изтегляне на CSV) върху екрана Create Run (Създаване на изпълняване), за да изтеглите нов шаблон за информация за пробата. Файлът CSV съдържа нужните заглавия и формат на колоните за импортиране. Добавете информация за пробата във всяка колона за всяка проба в изпълняването. За колоната Tumor Type (Тип тумор), въведете типа тумор или съответния код (вижте *Изтегляне на типове тумори на страница 1*). Полето Тип Тумор се използва и за задаване на проби като контролни (вижте *Контролни проби на страница 7*).s
 - Използвайте файл с информация за проба, който е бил експортиран от модула за анализ на TSO Comprehensive чрез функцията Export to CSV (Експортиране в CSV).
- 2 На екрана Create Run (Създаване на изпълняване) прегледайте импортираната информация. Неправилната информация може да повлияе на резултатите.
- 3 **[Optional]** (По избор) Изберете **Export to CSV** (Експортиране в CSV), за да експортирате информация на проба към външен файл.
- 4 Изберете **Save Run** (Записване на изпълняване).

Контролни проби

TSO Comprehensive изисква използването на контрол на панела. Задаването на проба като контролна автоматично настройва Sex (Пола) на пробата на Unknown (Неизвестен). За да зададете дадена проба като контролна, изберете един от четирите типа контроли в полето Tumor Type (Тип Тумор): DNA External Control (ДНК външна контрола) (позитивна ДНК контрола), DNA No-Template Control (ДНК контрола без шаблон), RNA External Control (РНК външна контрола) (позитивна РНК контрола) или RNA No-Template Control (РНК контрола без шаблон). Вижте *Избор на тип тумор на страница 7* за повече информация относно настройката на типовете тумор за всички видове проби по време на конфигурирането.

Само един от всеки тип контрола може да бъде посочен в рамките на изпълняване на дейност. Само ДНК библиотека може да бъде посочена за ДНК външна контрола или ДНК контрола без шаблон. Само РНК библиотека може да бъде посочена за РНК външна контрола или РНК контрола без шаблон. Библиотеки, посочени като ДНК или РНК контроли без шаблон, не се отчитат срещу максималния брой на библиотеки в дадено изпълняване.

Избор на тип тумор

За всяка проба трябва да се посочи тип тумор. С изключение на типовете контроли, наличните типове тумори са получени от инсталираната база знания (KB) и може да се променят с актуализирани версии на KB.



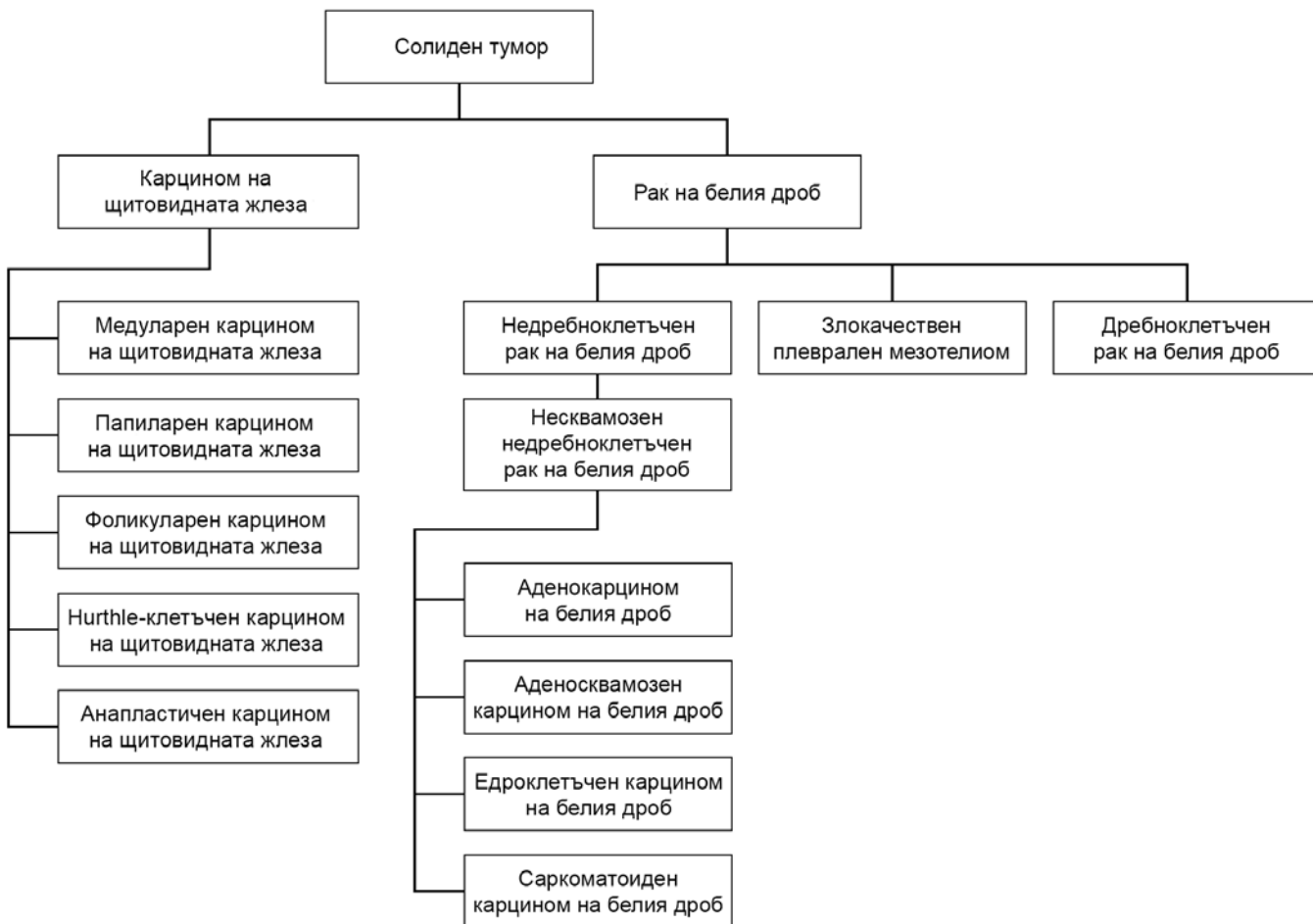
ВНИМАНИЕ

Неправилният избор на тип тумор може да доведе до неправилни резултати. Разрешете всички предупреждения, които се появяват при определяне на видове тумори, за да избегнете неуспех на анализа.

Термините за тип тумор са част от йерархична онтология на заболяването в БЗ, която е изградена като набор от връзки родител-дъщерен елемент. Например терминът *недребноклетъчен рак на белия дроб* е дъщерен елемент на *рак на белия дроб*, тъй като *недребноклетъчният рак на белия дроб* е тип *рак на белия дроб*. *Фигура 3* изобразява подгрупа от примерна онтология на заболяването, показваща солиден тумор като основен термин и термините, свързани с *рак на белия дроб* и *рак на щитовидната жлеза* (други типове тумори не са показани). Термин, който е свързан чрез връзки родител-дъщерен елемент с термини от по-ниско ниво, се нарича предшественик. Свързаните термини от по-ниско ниво са потомци на термина

предшественик. Например ракът на белия дроб е предшественик на аденокарцинома на белия дроб и дребноклетъчния рак на белия дроб, а медуларният карцином на щитовидната жлеза е потомък както на карцинома на щитовидната жлеза, така и на солидния тумор.

Фигура 3 Подмножество на примерна онтология на заболяването



Избраният тип тумор за проба от пациент оказва влияние върху:

- ▶ това кои предназначения за съвместна диагностика се оценяват за пробата. За това твърдение ще се оценяват само проби от пациенти с тип тумор, който съвпада точно или е потомък на типа тумор за предназначение за съвместна диагностика.
- ▶ това кои варианти за профилиране на тумори са включени в доклада на TSO Comprehensive.

Следните инструкции описват процеса за избор на тип тумор чрез екрана Create Run (Създаване на изпълняване). Типът на тумора може също да бъде зададен чрез импортиране на CSV файл, съдържащ тип тумор (вж. [Импортиране на проби на страница 7](#)).

- 1 Визуализирайте наличните типове тумори, като щракнете двукратно в клетката Tumor Type (Тип тумор) в реда за пробата. Наличните типове тумори се показват в йерархичен списък, организиран по азбучен ред. Полето Tumor Type (Тип тумор) се използва също така за обозначаване на тип контрола за контролните проби (вж. [Контролни проби на страница 7](#)).
- 2 Намерете и изберете желаните типове тумор, като взаимодействате със списъка или като използвате лентата за търсене в горната част на прозореца Tumor Type (Тип тумор).

Подготовка за стъпките на протокола

- 1 Старателно отстранете замърсяването от работните зони с почистващ препарат, инхибиращ RNase/DNase.



ВНИМАНИЕ

Всички процедури в работния процес изискват среда без RNase/DNase.

- 2 Задайте програми за термоциклери преди амплификация. Вижте *Програмни термоциклери на страница 4*.
- 3 Следвайте инструкциите на производителя, за да настроите ултразвуковия апарат.
- 4 Ако обработвате само ДНК проби, преминете директно към *Фрагментиране на gDNA на страница 13*.
- 5 Извадете РНК контролите от съхранение.
- 6 Извадете епруветките с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 3 Подготовка на РНК библиотека TruSight Oncology Comp (PN 20031127)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
EPH3	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Денатуриране и отгряване на РНК
FSM	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Синтезиране на първата нишка cDNA
RVT	-25°C до -15°C	Задръжте върху лед.	Синтезиране на първата нишка cDNA
SSM	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Синтезиране на втората нишка cDNA

Таблица 4 Подготовка на библиотека TruSight Oncology Comp (Охлаждане) (PN 20031119)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
SPB (светлозелен етикет)	2°C до 8°C	Доведете до стайна температура в продължение на 30 минути.	Почистване на cDNA
RSB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Почистване на cDNA

Денатуриране и отгряване на РНК

Подготовка

- 1 Подгответе посочените по-долу реагенти.
- ▶ EPH3 — Оставете настрана.
 - ▶ FSM — Вortexируйте, за да се смеси. Центрофугируйте за кратко, после пипетируйте, за да смесите. Проверете за утайки. Ако са налични, пипетируйте, докато утайките се разтворят.
 - ▶ RVT — Центрофугируйте за кратко, после пипетируйте, за да смесите. Задръжте върху лед.

ЗАБЕЛЕЖКА RVT е вискозен разтвор. Винаги пипетируйте бавно, за да избегнете образуването на мехурчета.

- 2 В микроцентрифужна епруветка комбинирайте следните обеми, за да пригответе основна смес FSM+RVT.

Таблица 5 Основна смес FSM+RVT

Компонент на основна смес	3 РНК проби (µl)	8 РНК проби (µl)	16 РНК проби (µl)	24 РНК проби (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте раздела „Работа с реагентите“ в листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200007789) за изчисления.

- 3 Пипетируйте десет пъти, за да се смеси.
- 4 Поставете основната смес FSM+RVT върху лед до *Синтезиране на първата нишка cDNA на страница 10*.

Процедура

- 1 Размразете извлечените РНК проби и РНК контролите върху лед. Обработете РНК контролите като проби за останалата част от протокола. Вижте *листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200007789)* за количествено определяне на пробите.
- 2 Пипетирайте всяка РНК проба 10 пъти, за да се смеси.
- 3 Използвайте вода без RNase/DNase, за да пригответе 40 ng от всяка РНК проба в краен обем от 8,5 µl (4,7 ng/µl).
За РНК контроли използвайте концентрацията, предоставена на етикета на епруветката.
- 4 Етикетирайте нова 96-ямкова PCR плака като CF (сDNA фрагменти).
- 5 Добавете 8,5 µl от всяка РНК проба към уникална ямка на CF PCR плаката.
- 6 Уверете се, че оформлението и индексите на пробната плака за всяка проба съвпадат с планираното изпълняване в Local Run Manager по време на настройката на изпълняването.
- 7 Вортексирайте EPH3, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
- 8 Добавете 8,5 µl EPH3 към всяка ямка за проба.
- 9 Добавете залепващо уплътнение към CF PCR плаката.



ВНИМАНИЕ

Уверете се, че сте запечатали добре ръбовете, за да предотвратите изпаряване.

- 10 Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 1 минута.
- 11 Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
- 12 Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата за LQ-RNA.
Вижте *Програмни термоциклери на страница 4*.
- 13 Когато пробите достигнат 4°C, задръжте за една минута и след това преминете незабавно към следващата стъпка.

Синтезиране на първата нишка сDNA

Процедура

Начална дата и час _____

- 1 Отстранете CF PCR плаката от термоциклера.
- 2 Пипетирайте 5 пъти, за да смесите основната смес FSM+RVT.
- 3 Добавете 8 µl основна смес FSM+RVT към всяко кладенче за проба.
- 4 Пипетирайте, за да смесите 5 пъти.
- 5 Изхвърлете останалата основна смес FSM+RVT.
- 6 Добавете залепващо уплътнение към CF PCR плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- 7 Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 1 минута.
- 8 Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
- 9 Поставете върху термоциклера и стартирайте първата програма за SS.
Вижте *Програмни термоциклери на страница 4*.
- 10 Когато пробите достигнат 4°C, преминете незабавно към следващата стъпка.
Пробите от първата нишка могат да се държат при 4°C за до 5 минути.

Синтезиране на втората нишка сDNA

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Подгответе посочения по-долу реагент.

- ▶ SSM — Обърнете 10 пъти, за да се смеси. Центрофугирайте за кратко.

Процедура

- 1 Отстранете CF PCR плаката от термоциклера.
- 2 Добавете 25 µl SSM към всяка ямка за проба.
- 3 Добавете залепващо уплътнение към CF PCR плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- 4 Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 1 минута.
- 5 Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
- 6 Поставете върху термоциклера и стартирайте втората програма за SS.
Вижте *Програмни термоциклери на страница 4*.
- 7 Когато пробите достигнат 4°C, задръжте за една минута и след това преминете незабавно към следващата стъпка.

Почистване на cDNA

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ▶ SPB – Уверете се, че топчетата са на стайна температура за 30 минути.
 - ▶ RSB — Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
- 2 Пригответе пресен 80% EtOH в конична епруветка от 15 ml или 50 ml.

Реагент	3 проби	8 проби	16 проби	24 проби
100% етилов алкохол, чист	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Вода без RNase/DNase	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Вортексирайте пресен 80% EtOH за смесване.
- 4 Етикетирайте нова 96-ямкова MIDI плака BIND1 (cDNA свързване).
- 5 Покрийте и оставете настрана.
- 6 Поставете магнита.

Процедура

Свързване

- 1 Отстранете CF PCR плаката от термоциклера.
- 2 Вортексирайте SPB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
- 3 Незабавно добавете 90 µl SPB към ямката на всяка проба от BIND1 MIDI платка.
Ако използвате ваничка за дозиране на SPB, включете коефициент на излишък от 1,05, когато аликвотираме достатъчно материал за проба. Изхвърлете останалия материал, след като SPB бъде добавен към всяка ямка за проба.
- 4 Прехвърлете целия обем (50 µl) на всяка проба от CF PCR плаката в съответната ямка на BIND1 MIDI плаката.
- 5 Изхвърлете празната CF PCR плака.
- 6 Добавете залепващ уплътнител към BIND1 MIDI плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 7 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- 8 Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
- 9 Поставете BIND1 MIDI плаката на магнитна стойка за 5 минути.

- 10 Използвайте пипета P200, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.

Измиване

- 1 Измийте топчетата по описания по-долу начин.
- a Оставете на магнитната стойка и добавете 200 µl пресен 80% EtOH във всяка ямка.
 - b Изчакайте 30 секунди.
 - c Извадете и изхвърлете всички супернатант от всяка ямка.
- 2 Измийте топчетата **втори** път.
- 3 Премахнете остатъка от EtOH от всяка ямка. Използвайте пипета P20 с фини крайници.
- 4 Изхвърлете неизползвания 80% EtOH.

Елуиране

- 1 Отстранете плаката BIND1 MIDI от магнитната стойка.
- 2 Обърнете или вортексирайте RSB, за да се смеси.
- 3 Добавете 22 µl RSB към всяка ямка за проба
- 4 Добавете залепващ уплътнител към BIND1 MIDI плаката. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 5 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- 6 Инкубирайте на стайна температура в продължение на 2 минути.
- 7 Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
- 8 Етикетирайте нова 96-ямкова MIDI плака PCF (Пречистени cDNA фрагменти). Ако спирате на **БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ** на страница 12, използвайте PCR плака.
- 9 Прехвърлете 20 µl елуат от всяка ямка за проба на BIND1 MIDI плаката в съответната ямка на PCF плаката.
- 10 Отстранете празната BIND1 MIDI плака.
- 11 Добавете 30 µl RSB към всяка ямка за проба на PCF плаката.
- 12 Пипетирайте, за да разбъркате 10 пъти.
- 13 Нанесете залепващо уплътнение върху PCF плаката и я задръжте върху лед.
- 14 Върнете EPH3, FSM, RVT, и SSM за съхранение.
- 15 Ако обработвате проби, получени само от РНК (сDNA), и не спирате на безопасната точка на спиране, продължете към **Извършване на крайна поправка и A-Tailing** на страница 15.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, центрофугирайте PCF PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 7 дни.

Крайна дата и час _____

Подготовка за стъпките на протокола

- 1 Извадете ДНК контролите от съхранение.
- 2 Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 6 Подготовка на библиотека TruSight Oncology Comp (Охлаждане) (PN 20031119)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
TEB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Фрагментиране на gDNA

Фрагментиране на gDNA

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Уверете се, че следват препоръките в *листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200007789)* за количествено определяне на пробите.
- 2 Подгответе посочения по-долу реагент.
 - ▶ ТЕВ — Обърнете или вортексирайте, за да се смеси.

Процедура

Подгответе плаката

- 1 Изберете една от следните три опции, за да подгответе плаката.
 - ▶ **Опция №1:** Обработвайте gDNA проби едновременно със cDNA проби в PCF MIDI плаката.
 - a Етикетирайте PCF MIDI плаката като LP (Library Preparation, Подготовка на библиотека).
 - b Поставете върху лед и оставете настрана, за да се използва в *Прехвърляне на фрагментирана ДНК на страница 14*.
 - ▶ **Опция №2:** Обработвайте gDNA проби едновременно със cDNA проби и PCF PCR плаката е замразена.
 - a Размразете PCF PCR плаката до стайна температура.
 - b Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
 - c Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси.
 - d Етикетирайте 96-ямова MIDI плака като LP (Library Preparation, Подготовка на библиотека).
 - e Прехвърлете всички 50 µl от всяка проба от PCF PCR плаката в съответната ямка на LP MIDI плаката.
 - f Изхвърлете PCF PCR плаката.
 - g Нанесете адхезивно уплътнение на плаката и поставете върху лед, до *Прехвърляне на фрагментирана ДНК на страница 14*.
 - ▶ **Опция №3:** Обработвайте само gDNA проби.
 - a Етикетирайте 96-ямова MIDI плака като LP (Library Preparation, Подготовка на библиотека).
 - b Ако спирате на *БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ на страница 14*, използвайте PCR плака.
 - c Покрийте и оставете настрана за употреба в *Прехвърляне на фрагментирана ДНК на страница 14*.

Разреждане на gDNA

- 1 Размразете пробите от gDNA и ДНК контролите при стайна температура. Обработете ДНК контролите като проби за останалата част от протокола.
- 2 Пипетирайте всяка gDNA проба 10 пъти, за да се смеси.
- 3 Центрофугирайте епруветката за кратко, за да съберете капчиците.
- 4 Обърнете или вортексирайте ТЕВ, за да се смеси.
- 5 Използвайте ТЕВ, за да пригответе 40 ng от всяка gDNA проба в краен обем от 52 µl (0,77 ng/µl). Анализът изисква минимална концентрация на екстракция от 3,33 ng/µl, за да се даде възможност на най-малко 40 µl ТЕВ от обема от 52 µl. За ДНК контроли използвайте концентрацията, предоставена на етикета на епруветката. За да предотвратите загуба на проби, не пипетирайте по-малко от 2 µl от пробата в това разреждане.

Фрагмент

- 1 Добавете 52 µl от всяка gDNA проба в отделна ямка на епруветката за ултразвук.

- 2 Запишете ориентацията на лентата.
- 3 Разделете gDNA на фрагменти с ултразвуков апарат.

Прехвърляне на фрагментирана ДНК

- 1 Уверете се, че оформлението и индексите на пробната плака за всяка проба съвпадат с планираното изпълняване в Local Run Manager по време на настройката на изпълняването.
- 2 Следвайте инструкциите на производителя на ултразвуковия апарат, за да възстановите пробата. За някои видове ултразвукови епруветки може да е необходимо центрофугиране, за да се консолидира пробата в епруветката.
- 3 За всяка фрагментирана gDNA проба използвайте р20 пипета с фини връхчета, за да извършите 3 прехвърляния на 16,7 µl в празна ямка на LP MIDI плака.
- 4 Добавете залепващо уплътнение за плака към LP MIDI плаката.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, нанесете залепващо уплътнение на LP PCR плаката и центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута. Съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 7 дни.

Крайна дата и час _____

Подготовка за стъпките на протокола

- 1 Пригответе кофа с лед.
- 2 Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 7 Кутия за подготовка на библиотека TruSight Oncology Comp (Замразяване) (PN 20031118)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
ERA1-A	-25°C до -15°C	Задръжте върху лед.	Извършване на крайна поправка и A-Tailing
ERA1-B	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Извършване на крайна поправка и A-Tailing
ALB1	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери
LIG3	-25°C до -15°C	Задръжте върху лед.	Лигиране на адаптери
SUA1 (синя капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери
UMI (бяла капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери
STL	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери
EPM	-25°C до -15°C	Задръжте върху лед.	PCR индексирание

Таблица 8 Кутия за подготовка на библиотека TruSight Oncology Comp (Охлаждане) (PN 20031119)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
SPB (светлозелен етикет)	2°C до 8°C	Доведете до стайна температура в продължение на 30 минути.	Почистване на лигиране
RSB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Почистване на лигиране

Таблица 9 Кутия с индексни праймери TruSight Oncology Comp UP (PN 20031120)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
UPxx	-25°C до -15°C	Размразете съответните епруветки с индексни праймери до стайна температура.	PCR индексирание

Таблица 10 Кутия с индексни праймери TruSight Oncology Comp CP (PN 20031126)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
CPxx	-25°C до -15°C	Размразете съответните епруветки с индексни праймери до стайна температура.	PCR индексирани

Извършване на крайна поправка и A-Tailing

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Предварително загрейте 2 инкубатора за микропроби с MIDI термоблокови вложки, както следва.
 - ▶ Загрейте инкубатор за микропроби до 30°C.
 - ▶ Загрейте инкубатор за микропроби до 72°C.
- 2 Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ▶ ERA1-A – центрофугируйте за кратко, после пипетирайте за да смесите. Задръжте върху лед.
 - ▶ ERA1-B — Вортексирайте, за да се смесят, и после центрофугируйте за кратко. Проверете за утайки. Ако има, загрейте епруветката до 37°C и след това смесете с пипета, докато утайките се разтворят.
- 3 Пригответе основната смес ERA1 в епруветка за микроцентрофуга.

Таблица 11 Основна смес ERA1

Компонент на основна смес	3 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте раздела „Работа с реагентите“ в листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200007789) за изчисления.

- 4 Пипетирайте бавно 10 пъти, за да се смесят, центрофугируйте за кратко и след това поставете основната смес ERA1 върху лед.
- 5 Изберете подходящата опция от следните две опции, за да подгответе плаката.
 - ▶ **Опция №1:** Ако пробите са в MIDI плака.
 - a Етикетирайте отново MIDI плаката като LP2 (Library Preparation 2, Подготовка на библиотека 2). Ако някои проби са в отделни MIDI плаки, преместете всички проби в отделни ямки на една и съща MIDI плака в съответствие с оформлението на плаката.
 - ▶ **Опция №2:** Ако плаката е замразена.
 - a Размразете PCF PCR плаката или LP PCR плаката до стайна температура.
 - b Центрофугируйте плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
 - c Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси.
 - d Етикетирайте нова 96-ямкова MIDI плака като LP2 (Library Preparation 2, Подготовка на библиотека 2).
 - e Прехвърлете всички 50 µl от всяка проба от PCF PCR плаката или LP PCR плаката в съответната ямка на LP2 MIDI плаката.
 - f Изхвърлете PCF PCR или LP PCR плаката.

Процедура

- 1 Добавете 10 µl ERA1 основна смес към всяка ямка за проба в LP2 MIDI плаката.
- 2 Изхвърлете останалата част от основна смес ERA1.
- 3 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI. Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.

- 4 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- 5 Инкубирайте в предварително загрят инкубатор за микропроби при 30°C за 30 минути.
- 6 Незабавно прехвърлете във втори, предварително загрят инкубатор за микропроби и инкубирайте при 72°C за 20 минути.
- 7 Поставете LP2 MIDI плаката върху лед за 5 минути.

Лигиране на адаптери

Този процес лигира адаптерите до края на cDNA и/или gDNA фрагментите.

TSO Comprehensive анализът включва адаптери SUA1 и UMI.

- ▶ Използвайте SUA1 адаптери с РНК проби.
- ▶ Използвайте адаптери UMI с ДНК проби.

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ▶ ALB1 — Вортексирайте, за да разбъркате за минимум 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ LIG3 — Центрофугирайте за кратко и след това пипетирайте, за да се смесят. Задръжте върху лед.
 - ▶ SUA1 — Вортексирайте, за да разбъркате за минимум 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ UMI — Вортексирайте, за да разбъркате за минимум 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ STL — Оставете настрана, за да се използва в процедурата.

Процедура

- 1 Отстранете LP2 MIDI плаката от леда.
- 2 Добавете 60 µl ALB1 към всяка ямка за проба на LP2 MIDI плаката, като се уверите, че пипетирате бавно.
- 3 Добавете 5 µl LIG3 към всяка ямка за проба.
- 4 Добавете адаптери.

Не **комбинирайте** различни видове адаптери.

 - РНК ямки за проба — 10 µl SUA1 (синя капачка) към всяка проба, взета от РНК.
 - ДНК ямки за проба — 10 µl UMI (бяла капачка) към всяка проба, взета от ДНК.
- 5 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 6 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- 7 Инкубирайте на стайна температура в продължение на 30 минути.
- 8 Вортексирайте STL, за да се смеси, и после центрофугирайте за кратко.
- 9 Добавете 5 µl STL към всяка ямка за проба на LP2 MIDI плаката.
- 10 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- 11 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.

Почистване на лигиране

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ▶ SPB – Уверете се, че топчетата са оставени на стайна температура за 30 минути.
 - ▶ RSB — Оставете настрана, за да се използва в процедурата.

- 2 Пригответе пресен 80% EtOH в конична епруветка от 15 ml или 50 ml.

Реагент	3 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
100% етилов алкохол, чист	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Вода без RNase/DNase	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Вортексирайте пресен 80% EtOH за смесване.
 4 Поставете магнита.

Процедура

Свързване

- 1 Вортексирайте SPB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
 2 Незабавно добавете 112 µl SPB към ямката на всяка проба от LP2 MIDI плаката.
 Ако използвате ваничка за дозиране на SPB, включете коефициент на излишък от 1,05, когато аликвотирате достатъчно материал за проба. Изхвърлете останалия материал, след като SPB бъде добавен към всяка ямка за проба.
 3 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI.
 Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
 4 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
 5 Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
 6 Поставете LP2 MIDI плаката на магнитна стойка за 10 минути.
 7 Използвайте пипета P200, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.

Измиване

- 1 Измийте топчетата по описания по-долу начин.
- a Оставете на магнитната стойка и добавете 200 µl пресен 80% EtOH във всяка ямка за проба.
 - b Изчакайте 30 секунди.
 - c Отстранете и изхвърлете целия супернатант от всяка ямка, без да се нарушава гранулата.
- 2 Измийте топчетата **втори** път.
 3 Премахнете остатъка от EtOH от всяка ямка.
 Използвайте пипета P20 с фини крайници.
 4 Изхвърлете неизползвания 80% EtOH.

Елуиране

- 1 Отстранете LP2 MIDI плаката от магнитната стойка.
 2 Обърнете или вортексирайте RSB, за да се смеси.
 3 Добавете 27,5 µl RSB към всяка ямка за проба.
 4 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI.
 Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
 5 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
 6 Инкубирайте на стайна температура в продължение на 2 минути.
 7 Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
 8 Поставете етикет LS на нова 96-ямкова LS плака (Проби на библиотеката).
 9 Прехвърлете 25 µl от всеки елуат от LP2 MIDI плака в съответната ямка на LS PCR плака.
 10 Изхвърлете празната LP2 MIDI плака.
 11 Добавете залепващо уплътнение за плака към плаката LS PCR.

PCR индексирание

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ▶ EPM — Задръжете върху лед.
 - ▶ UPxx — Вортиксайрайте, за да се смесиат, и след това центрофугирайте за кратко. UPxx е индексният праймер, избран на екрана Create Run (Създаване на изпълняване) в софтуера Local Run Manager по време на настройката на изпълняване.
 - ▶ CPxx — Вортиксайрайте, за да се смесиат, и след това центрофугирайте за кратко. CPxx е индексният праймер, избран на екрана Create Run (Създаване на изпълняване) в софтуера Local Run Manager по време на настройката на изпълняване.
- 2 Уверете се, че индексите за всяка проба съвпадат с планираното изпълняване в Local Run Manager по време на настройката на изпълняване. Уверете се, че следват инструкциите за избор на индекс в *листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200007789)*.



ВНИМАНИЕ

Несъответствията между пробите и индексните праймери причиняват неправилно отчитане на резултатите поради загуба на положителна идентификация на пробата.

Процедура

- 1 Добавете 5 µl от подходящия индексен праймер (UPxx или CPxx) към съответната ямка за проба в LS PCR плаката в съответствие с индексите, избрани на екрана Create Run (Създаване на изпълняване) в софтуера Local Run Manager по време на настройката на изпълняване.



ВНИМАНИЕ

Работете с една и отваряйте само една индексна праймерна епруветка в даден момент. Затворете отново всяка индексна епруветка веднага след употреба. Не комбинирайте индексни праймери заедно.

- 2 Вортиксайрайте EPM за 5 секунди, за да се смесиат, и след това центрофугирайте за кратко.
- 3 Добавете 20 µl EPM към всяка ямка за проба.
- 4 Добавете залепващо уплътнение към LS PCR плаката. Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- 5 Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 1 минута.
- 6 Върнете преамплификационните реагенти за съхранение.



ВНИМАНИЕ

Изпълнете всички следващи стъпки в зона след амплификация, за да предотвратите пренасяне на продукта от амплификация.

- 7 Центрофугирайте LS PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
- 8 Поставете върху предварително програмирания термоциклер след амплификация и стартирайте програмата I-PCR.

Вижте *Програмни термоциклери на страница 4*.

ЗАБЕЛЕЖКА Ако продължавате с *Настройване на първата хибридизация на страница 19*, следвайте инструкциите за размразяване на реагентите в Стъпките за подготовка на протокола.

- 9 След като програмата I-PCR завърши, центрофугирайте LS PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.

- 10 Поставете отново етикета ALS (амплифицирани библиотечни проби) на плаката.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, съхранявайте ALS PCR плаката при температура от -25°C до -15°C за период до 30 дни.

Крайна дата и час _____

Подготовка за стъпките на протокола

- 1 Уверете се, че са зададени програми за термоциклери след амплификация. Вижте *Програмни термоциклери на страница 4*.
- 2 Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 12 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
TCB1	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Настройване на първата хибридизация

Таблица 13 Кутия за обогатяване TruSight Oncology Comp (Замразяване) (PN 20031121)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
TCA1	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на първата хибридизация

Таблица 14 Кутия комплект съдържание TruSight Oncology Comp (PN 20031122)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
OPR1 (червена капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на първата хибридизация
OPD2 (бяла капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на първата хибридизация

Настройване на първата хибридизация

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Подгответе посочените по-долу реагенти.
- ▶ TCB1 – Загрейте епруветката при 37°C в продължение на 5 минути. Вортексирайте за 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ TCA1 — Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ OPR1 — Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ OPD2 — Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
- 2 Ако ALS PCR плаката е била съхранявана, размразете до стайна температура и центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута. След това пипетирайте за смесване.
- 3 Поставете етикет HYB1 на нова 96-ямкова PCR плака (Хибридизация 1).

Процедура

- 1 Прехвърлете 20 µl от всяка cDNA и/или gDNA библиотека от ALS PCR плаката в съответната ямка в HYB1 PCR плаката.
- 2 Нанесете залепващо уплътнение върху ALS PCR плаката и оставете настрана. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 3 Проверете TCB1 за утайки. Ако има, загрейте епруветката отново и разбъркайте епруветката, докато кристалите се разтворят.
- 4 Добавете 15 µl TCB1 към всяка библиотечна ямка в HYB1 PCR плаката.

- 5 Добавете 10 µl TCA1 към всяка библиотечна ямка в HYB1 PCR плаката.
- 6 Добавете сонди.
Не **комбинируйте** различни видове сонди.
 - ▶ Ямки с РНК библиотеки — 5 µl OPR1 към всяка библиотека, получена от РНК.
 - ▶ Ямки с ДНК библиотеки — 5 µl OPD2 към всяка библиотека, получена от ДНК.
- 7 Нанесете залепващо уплътнение върху HYB1 PCR плаката.



ВНИМАНИЕ

Уверете се, че сте запечатали добре ръбовете, за да предотвратите изпаряване.

- 8 Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
- 9 Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата за HYB1.
Вижте *Програмни термоциклери на страница 4*.
- 10 Хибридизирайте при 57°C в продължение на поне 8 часа до най-много 24 часа.
- 11 Върнете хибридационните реагенти за съхранение.
- 12 Съхранявайте ALS PCR плаката при -25°C до -15°C в продължение на до 30 дни.

Подготовка за стъпките на протокола

- 1 В началото на ден 2 извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
SMB (тъмносин етикет)	2°C до 8°C	Доведете до стайна температура в продължение на 30 минути.	Целево улавяне – първа част Целево улавяне – втора част
ET2	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Целево улавяне – първа част Целево улавяне – втора част
HP3	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Целево улавяне – първа част Целево улавяне – втора част Нормализиране на библиотеките
TCB1	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Настройване на втората хибридазация
RSB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Целево улавяне – втора част Изчистване на усилена обогатена библиотека

Таблица 16 Кутия за обогатяване TruSight Oncology Comp (Замразяване) (PN 20031121)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
EE2	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Целево улавяне – първа част Целево улавяне – втора част Нормализиране на библиотеките
EEW	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Целево улавяне – първа част
TCA1	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на втората хибридазация

Таблица 17 Кутия комплект съдържание TruSight Oncology Comp (PN 20031122)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
OPR1 (червена капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на втората хибридазация
OPD2 (бяла капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на втората хибридазация

Целево улавяне – първа част

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Предварително загрейте инкубатор за микропроби с MIDI термоблокова вложка до 57°C.
- 2 Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ▶ EEW – Вортексирайте, за да се смесят, в продължение на 1 минута.
 - ▶ EE2 — Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ HP3 — Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ SMB – Уверете се, че мънистата са на стайна температура за 30 минути.
 - ▶ Не забравяйте да използвате **SMB**, а не SPB при тази процедура.
 - ▶ ET2 – Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
- 3 Подгответе прясна смес за елуиране EE2+HP3 в епруветка за микроцентрофуга.

Таблица 18 Смес за елуиране EE2+HP3 за Целево улавяне – първа част

Компонент за елуиране на смес	3 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте раздела „Работа с реагентите“ в листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200007789) за изчисления.

- 4 Вортексирайте сместа за елуиране EE2+HP3 и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана за стъпката *Елуиране*.
- 5 Поставете етикет CAP1 (улавяне 1) на нова 96-ямкова MIDI плака.
- 6 Поставете магнита.

Процедура

Свързване

- 1 Отстранете HYB1 PCR плаката от термоциклера.
- 2 Центрофугирайте HYB1 PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
- 3 Вортексирайте SMB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
- 4 Незабавно добавете 150 µl SMB към всяка ямка с библиотека на плаката CAP1 MIDI.
Ако използвате ваничка за дозиране на SMB, включете коефициент на излишък от 1,15, когато аликвотираете достатъчно материал за проба. Изхвърлете останалия материал, след като SMB бъде добавен към всяка ямка за проба.
- 5 Настройте пипетата на 50 µl и прехвърлете целия обем на всяка библиотека от плаката HYB1 PCR в съответната ямка на плаката CAP1 MIDI.
- 6 Отстранете празната HYB1 PCR плака.
- 7 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP1 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- 8 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- 9 Инкубирайте в предварително загрят инкубатор за микропроби при 57°C за 25 минути.
- 10 Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
- 11 Като държите плаката CAP1 MIDI върху магнитната стойка, използвайте пипета P200 µl с настройка за 200 µl, за да премахнете и отстраните всички супернатант, без да размествате гранулата.

**ВНИМАНИЕ**

Пристъпете незабавно към следващата стъпка (*Измиване*). Не оставяйте гранулата да престоива продължително време без наличие на течност.

Измиване

- 1 Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a Премахнете плаката CAP1 MIDI от магнитната стойка.
 - b Добавете 200 µl EEW към всяка ямка.
 - c Настройте обема на пипетата на 150 µl и пипетирайте, за да разбъркате минимум 10 пъти. Уверете се, че всички топчета са повторно суспендирани.

**ВНИМАНИЕ**

Уверете се, че няма гранули, като внимателно аспирирате общия разтвор на топчетата от ямката в крайника. След това потърсете гранула на дъното на всяка ямка. Наклонете крайника на пипетата към гранулата по време на стъпките за измиване, за да изтласкате гранулата. Уверете се, че гранулата е напълно покрита в разтвор. Разтворът трябва да изглежда тъмнокафяв и да има хомогенна консистенция.

- d Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP1 MIDI.
 - e Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
 - f Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 4 минути.
 - g Инкубирайте в инкубатор за микропроби при 57°C за 5 минути.
 - h Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
 - i Задръжте върху магнитната стойка и премахнете и отстранете всички супернатант от всяка ямка, без да размествате гранулата.
- 2 Измийте топчетата *втори* път.
 - 3 Измийте топчетата *трети* път.
 - 4 Премахнете остатъчния супернатант от всяка ямка. Използвайте пипета P20 с фини крайници.

Елуиране

- 1 Премахнете плаката CAP1 MIDI от магнитната стойка.
- 2 Вортиксирайте прясна смес за елуиране EE2+HP3 и след това центрофугирайте за кратко.
- 3 Внимателно добавете 17 µl смес за елуиране EE2+HP3 към всяка ямка с библиотека на плаката CAP1 MIDI.
- 4 Изхвърлете останалата смес за елуиране EE2+HP3.
- 5 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP1 MIDI. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 6 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- 7 Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
- 8 Поставете етикет ELU1 (елуиране 1) на нова 96-ямкова PCR плака.
- 9 Вортиксирайте ET2, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
- 10 Добавете 5 µl ET2 във всяка съответна ямка с библиотека в новата плака ELU1 PCR.
- 11 Внимателно прехвърлете 15 µl елуат от всяка ямка с библиотека на плаката CAP1 MIDI в съответната ямка на плаката ELU1 PCR.
- 12 Изхвърлете празната плака CAP1 MIDI.
- 13 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката ELU1 PCR.
- 14 Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- 15 Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
- 16 Върнете EEW за съхранение.

Настройване на втората хибридизация

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ▶ TCB1 – Загрейте епруветката при 37°C в продължение на 5 минути. Вортексирайте за 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ TCA1 — Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ OPR1 — Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ OPD2 — Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.

Процедура

- 1 Проверете TCB1 за утайки. Ако има, загрейте епруветката отново и разбъркайте, докато кристалите се разтворят.
- 2 Добавете 15 µl TCB1 към всяка ямка на библиотека на плаката ELU1 PCR.
- 3 Добавете 10 µl TCA1 към всяка ямка на библиотека.
- 4 Добавете сонди.

Не **комбинируйте** различни видове сонди.

 - ▶ Ямки с РНК библиотеки — 5 µl OPR1 към всяка библиотека, получена от РНК.
 - ▶ Ямки с ДНК библиотеки — 5 µl OPD2 към всяка библиотека, получена от ДНК.
- 5 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката ELU1 PCR. Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- 6 Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
- 7 Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата HYB2. Вижте *Програмни термоциклери на страница 4*.
- 8 Хибридизирайте при 57°C в продължение на поне 1,5 часа до най-много 4 часа.
- 9 Върнете TCA1, TCB1, OPR1, и OPD2 на съхранение.

Целево улавяне – втора част

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Предварително загрейте инкубатор за микропроби с MIDI термоблокова вложка до 57°C.
- 2 Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ▶ EE2 — Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ HP3 — Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ SMB – Уверете се, че мънистата са на стайна температура за 30 минути.
 - ▶ Не забравяйте да използвате **SMB**, а не SPB при тази процедура.
 - ▶ RSB — Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
 - ▶ ET2 – Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
- 3 Подгответе прясна смес за елуиране EE2+HP3 в епруветка за микроцентрифуга.

Таблица 19 Смес за елуиране EE2+HP3 за Целево улавяне – втора част

Компонент за елуиране на смес	3 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте раздела „Работа с реагентите“ в листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200007789) за изчисления.

- 4 Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана за стъпката *Елуиране*.
- 5 Поставете етикет CAP2 (улавяне 2) на нова 96-ямкова MIDI плака.
- 6 Поставете магнита.

Процедура

Свързване

- 1 Отстранете ELU1 PCR плаката от термоциклера.
- 2 Центрофугирайте ELU1 PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
- 3 Вортексирайте SMB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
- 4 Незабавно добавете 150 µl SMB към всяка ямка за библиотека на плаката CAP2 MIDI.
Ако използвате ваничка за дозиране на SMB, включете коефициент на излишък от 1,15, когато аликвотирате достатъчно материал за проба. Изхвърлете останалия материал, след като SMB бъде добавен към всяка ямка за проба.
- 5 Настройте пипетата на 50 µl и прехвърлете целия обем на всяка библиотека от плаката ELU1 PCR в съответната ямка на плаката CAP2 MIDI.
- 6 Изхвърлете празната ELU1 PCR плака.
- 7 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- 8 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- 9 Инкубирайте в инкубатор за микропроби при 57°C за 25 минути.

ЗАБЕЛЕЖКА Ако продължите с *Усилване на обогатена библиотека на страница 25*, следвайте инструкциите за размразяване на реагентите в Стъпките за подготовка на протокола.

- 10 Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
- 11 Задръжте плаката CAP2 MIDI върху магнитната стойка и използвайте пипета P200 с настройка за 200 µl, за да премахнете и отстраните всички супернатант от всяка ямка с библиотека, без да размествате гранулата.



ВНИМАНИЕ

Пристъпете незабавно към следващата стъпка (*Измиване*). Не оставяйте гранулата да престоява продължително време без наличие на течност.

Измиване

- 1 Премахнете плаката CAP2 MIDI от магнитната стойка.
- 2 Обърнете или вортексирайте RSB, за да се смеси.
- 3 Добавете 200 µl RSB към всяка ямка.
- 4 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 5 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 4 минути.
- 6 Поставете на магнитната стойка за 2 минути.
- 7 Задръжте плаката CAP2 MIDI върху магнитната стойка и премахнете и отстранете всички супернатант, без да размествате гранулата.
- 8 Премахнете остатъчния супернатант от всяка ямка.
Използвайте пипета P20 с фини крайници.

Елуиране

- 1 Премахнете плаката CAP2 MIDI от магнитната стойка.

- 2 Вортексирайте прясна смес за елуиране EE2+HP3 и след това центрофугирайте за кратко.
- 3 Добавете 22 µl смес за елуиране EE2+HP3 към всяка ямка с библиотека на плаката CAP2 MIDI.
- 4 Изхвърлете останалата смес за елуиране EE2+HP3.
- 5 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 6 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- 7 Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
- 8 Поставете етикет ELU2 (елуиране 2) на нова 96-ямкова PCR плака.
- 9 Вортексирайте ET2, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
- 10 Добавете 5 µl ET2 във всяка съответна ямка с библиотека в новата плака ELU2 PCR.
- 11 Внимателно прехвърлете 20 µl елуат от всяка ямка с библиотека на плаката CAP2 MIDI в съответната ямка на плаката ELU2 PCR.
- 12 Изхвърлете празната плака CAP2 MIDI.
- 13 Добавете залепващо уплътнение за плака към плаката ELU2 PCR.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- 14 Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
- 15 Върнете SMB, EE2, HP3 и ET2 на съхранение.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, центрофугирайте ELU2 PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 7 дни. Върнете RSB за съхранение.

Крайна дата и час _____

Подготовка за стъпките на протокола

- 1 Пригответе кофа с лед.
- 2 Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 20 Кутия за обогатяване TruSight Oncology Comp (Замразяване) (PN 20031121)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
PPC3	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Усилване на обогатена библиотека
EPM	-25°C до -15°C	Задръжте върху лед.	Усилване на обогатена библиотека

Таблица 21 Кутия за обогатяване TruSight Oncology Comp (Охлаждане) (PN 20031123)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
SPB (светлозелен етикет)	2°C до 8°C	Доведете до стайна температура в продължение на 30 минути.	Изчистване на усилена обогатена библиотека
RSB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Изчистване на усилена обогатена библиотека Приготвяне за секвениране

Усилване на обогатена библиотека

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Ако ELU2 плаката е била съхранявана, размразете до стайна температура и след това конфигурирайте на 280 × g за 1 минута.

Процедура

- 1 Вортексирайте PPC3, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.

- 2 Добавете 5 µl PPC3 към всяка библиотека от ELU2 PCR плаката.
- 3 Вортексирайте EPM за 5 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
- 4 Добавете 20 µl EPM към архива на всяка библиотека.
- 5 Добавете залепващо уплътнение за плака към плаката ELU2 PCR. Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- 6 Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
- 7 Поставете термоциклер и стартирайте програмата EL-PCR. Вижте *Програмни термоциклери на страница 4*.

ЗАБЕЛЕЖКА Ако продължавате с *Нормализиране на библиотеките на страница 28*, следвайте инструкциите за размразяване в раздела Подготовка за стъпките на протокола.

- 8 Върнете PPC3 и EPM за съхранение.

Изчистване на усилена обогатена библиотека

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ▶ SPB – Уверете се, че топчетата са на стайна температура за 30 минути.
 - ▶ Уверете се, че използвате **SPB**, а не SMB за тази процедура.
 - ▶ RSB — Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
- 2 Пригответе пресен 80% етанол в конична епруветка от 15 ml или 50 ml.

Реагент	3 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
100% етилов алкохол, чист	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Вода без RNase/DNase	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Вортексирайте пресен 80% EtOH за смесване.
- 4 Етикетирайте нова 96-ямкова MIDI плака BIND2 (свързваща при почистване).
- 5 Поставете магнита.

Процедура

Свързване

- 1 Отстранете ELU2 PCR плаката от термоциклера.
- 2 Центрофугирайте ELU2 PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
- 3 Вортексирайте SPB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
- 4 Незабавно добавете 110 µl SPB към всяка ямка за библиотека на BIND2 MIDI плака.
- 5 Прехвърлете 50 µl от всяка библиотека от ELU2 PCR плака в съответната ямка на BIND2 MIDI плака.
- 6 Изхвърлете празната ELU2 PCR плака.
- 7 Добавете залепващ уплътнител към BIND2 MIDI плаката. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 8 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- 9 Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
- 10 Поставете на магнитна стойка за 5 минути.
- 11 Използвайте P200 пипета, настроена на 200 µl, за да отстраните и изхвърлите **целия** супернатант от всяка ямка за библиотека, без да се нарушават гранулата.

Измиване

- 1 Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a Оставете на магнитната стойка и добавете 200 µl пресен 80% EtOH във всяка ямка.
 - b Изчакайте 30 секунди.
 - c Отстранете и изхвърлете целия супернатант от всяка пробна ямка, без да се нарушава гранулата.
- 2 Измийте топчетата **втори** път.
- 3 Премахнете остатъка от EtOH от всяка ямка. Използвайте пипета P20 с фини крайници.
- 4 Изхвърлете неизползвания 80% EtOH.

Елуиране

- 1 Премахнете BIND2 MIDI плаката от стойката за магнити.
- 2 Обърнете или вортексирайте за смесване на RSB.
- 3 Добавете 32 µl RSB към всяка ямката на всяка библиотека.
- 4 Добавете залепващ уплътнител към BIND2 MIDI плаката. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 5 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- 6 Инкубирайте на стайна температура в продължение на 2 минути.
- 7 Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
- 8 Етикетирайте нова 96-ямкова PCR плака PL (Пречистени библиотеки).
- 9 Прехвърлете 30 µl от всеки елуат от BIND2 MIDI плака в съответната ямка на PL PCR плака.
- 10 Изхвърлете празната BIND2 MIDI плака.
- 11 Добавете залепващо уплътнение за плака към PL PCR плаката.
- 12 Върнете SPB за съхранение.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, центрофугирайте PL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 30 дни. Върнете RSB за съхранение.

Крайна дата и час _____

Подготовка за стъпките на протокола

- 1 Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 22 Кутия за обогатяване TruSight Oncology Comp (Замразяване) (PN 20031121)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
LNA1	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Нормализиране на библиотеките
EE2	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Нормализиране на библиотеките

Таблица 23 Кутия за обогатяване TruSight Oncology Comp (Охлаждане) (PN 20031123)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
LNB1	2°C до 8°C	Доведете до стайна температура в продължение на 30 минути.	Нормализиране на библиотеките
HP3	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Нормализиране на библиотеките Приготвяне за секвениране

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
LNW1	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Нормализиране на библиотеките
LNS1	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Нормализиране на библиотеките

- 2 Ако на същия ден продължавате с *Приготвяне за секвениране на страница 30*, следвайте инструкциите за размразяване в Стъпките за подготовка на протокола.

Нормализиране на библиотеките

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Подгответе посочените по-долу реагенти.
- ▶ LNB1 – Уверете се, че топчетата са оставени на стайна температура за 30 минути.
 - ▶ LNA1 – Вортексирайте, за да се смесят.
 - ▶ EE2 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ HP3 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - ▶ LNW1 – Вортексирайте, за да се смесят. Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
 - ▶ LNS1 – Вортексирайте, за да се смесят. Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
- 2 Вортексирайте LNB1 за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата. Обърнете епруветката LNB1, за да сте сигурни, че всички топчета са повторно суспендирани.
- 3 С помощта на P1000, настроен на 800 µl, пипетирайте LNB1 нагоре и надолу 10 пъти, за да осигурите повторно суспендиране.
- 4 Незабавно пригответе прясна основна смес LNA1+LNB1 в конична епруветка.



ВНИМАНИЕ

Напълно ресуспендирайте гранулата LNB1 на дъното на епруветката, за да предотвратите непостоянна плътност на клъстерите.

Таблица 24 Основна смес LNA1+LNB1.

Компонент на основна смес	3 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
LNA1	229 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте раздела „Работа с реагентите“ в листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200007789) за изчисления.

- 5 Вортексирайте основната смес LNA1+LNB1. Оставете настрана за стъпката *Свързване*.
- 6 Подгответе прясна смес за елуиране EE2+HP3 в епруветка за микроцентрифуга.

Таблица 25 Смес за елуиране EE2+HP3 за нормализиране на библиотеки

Компонент за елуиране на смес	3 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте раздела „Работа с реагентите“ в листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200007789) за изчисления.

- 7 Вортексирайте прясна смес за елуиране и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана за стъпката *Елуиране*.
- 8 Ако плаката PL PCR е била съхранявана, размразете до стайна температура, центрофугирайте при 280 × g за 1 минута и след това пипетирайте, за да смесите.

- 9 Етикетирайте нова 96-ямкова MIDI плака BBN (Нормализация, базирана на топчета).
- 10 Поставете магнита.

Процедура

Свързване

- 1 Вортексирайте основната смес LNA1+LNB1.
- 2 Незабавно добавете 45 µl основна смес LNA1+LNB1 към всяка ямка за библиотека на BBN MIDI плака.
- 3 Изхвърлете останалата основна смес LNA1+LNB1.
- 4 Добавете 20 µl към всяка библиотека от PL PCR плаката към съответната ямка от BBN MIDI плаката.
- 5 Нанесете залепващ уплътнител за плака към плаката BBN MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 6 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 30 минути.
- 7 Нанесете залепващ уплътнител за плака към PL PCR плаката и върнете за съхранение.
- 8 Поставете плаката на магнитна стойка за 2 минути.
- 9 Задръжте на магнитна стойка и използвайте P200 пипета, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка, без да се нарушава гранулата.

Измиване

- 1 Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a Отстранете BBN MIDI плаката от магнитната стойка.
 - b Добавете 45 µl LNW1 към всяка ямка на библиотека.
 - c Нанесете залепващ уплътнител за плака към плаката BBN MIDI.
 - d Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
 - e Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 5 минути.
 - f Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
 - g Отстранете и изхвърлете целия супернатант от всяка ямка, без да се нарушава гранулата.
- 2 Измийте топчетата **втори** път.
- 3 Премахнете остатъчния супернатант от всяка ямка.
Използвайте пипета P20 с фини крайници.

Елуиране

- 1 Отстранете BBN MIDI плаката от магнитната стойка.
- 2 Вортексирайте прясна смес за елуиране EE2+HP3 и след това центрофугирайте за кратко.
- 3 Добавете 32 µl EE2+HP3 разтвор към всяка ямка с библиотека на BBN MIDI плаката.
- 4 Изхвърлете останалата смес за елуиране.
- 5 Нанесете залепващ уплътнител за плака към плаката BBN MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 6 Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- 7 Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
- 8 Етикетирайте нова 96-ямкова PCR плака NL (Нормализирани библиотеки).
- 9 Внимателно прехвърлете 30 µl елуат от всяка библиотечна ямка на BBN MIDI плаката в съответната ямка на NL PCR плаката.



ВНИМАНИЕ

Ако топчетата се аспирират във върховете на пипетата, разпределете ги обратно в плаката на магнитната стойка и изчакайте, докато течността се избистри (~2 минути), преди да продължите със следващата стъпка от процедурата.

- 10 Изхвърлете празната BBN MIDI плака.

- 11 Вортексирайте LNS1, за да се смесят.
- 12 Добавете 30 µl LNS1 към всяка библиотечна ямка в новата NL PCR плака.
- 13 Пипетирайте, за да смесите 5 пъти.
- 14 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката NL PCR.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 15 Върнете LNB1, LNA1, EE2, LNW1 и LNS1 за съхранение.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 30 дни.

Крайна дата и час _____

Подготовка за стъпките на протокола

Започнете подготовката на консумативите за секвениране от NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) (PN 20028871) поне един час преди употреба.

- 1 Извадете буфера за разреждане на библиотеки (HT1) от съхранение на температура от -25°C до -15°C, размразете го до стайна температура и след това го поставете върху лед.
- 2 Следвайте инструкциите за приготвяне в *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочното ръководство за инструмента NextSeq 550Dx) (документ № 100000009513)* за другите консумативи в комплекта.
 - ▶ Касета с реагенти NextSeq 550Dx High Output v2 (300 цикъла)
 - ▶ Касета с буфер NextSeq 550Dx v2 (300 цикъла)
 - ▶ Касета с поточни клетки NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 цикъла)
- 3 Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 26 Кутия за обогатяване TruSight Oncology Comp (Замразяване) (PN 20031121)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
Вътрешна контрола PhiX (PhiX)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура. Задръжте върху лед.	Приготвяне за секвениране

Таблица 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
HP3	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Приготвяне за секвениране
RSB (розов етикет)	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Приготвяне за секвениране

Приготвяне за секвениране

Подготовка

Начална дата и час _____

- 1 Прегледайте указанията за брой библиотеки и избор на индекси в *листовката за TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200007789)*.
- 2 Етикетирайте микроцентрофужна епруветка dHP3 (разреден HP3).
- 3 Етикетирайте микроцентрофужна епруветка dPhiX (разреден PhiX).
- 4 Загрейте топлинния блок до 96°C за микроцентрофужните епруветки.
- 5 Пригответе кофа с лед.

Разреждане и денатуриране на контролата PhiX

- 1 Вортексирайте HP3, за да се смеси и след това центрофугирайте за кратко.
- 2 Комбинирайте следните обеми в епруветката за микроцентрофугиране на dHP3.
 - ▶ 10 µl HP3
 - ▶ 190 µl вода без RNase/-DNase
- 3 Вортексирайте dHP3, за да се смеси и след това центрофугирайте за кратко.
- 4 Обърнете или вортексирайте RSB, за да се смеси.
- 5 Вортексирайте PhiX контрола, за да се смеси и след това центрофугирайте за кратко.
- 6 Комбинирайте следните обеми в епруветката за микроцентрофугиране на dPhiX.
 - ▶ 8 µl RSB
 - ▶ 2 µl PhiX контрола
- 7 Добавете 10 µl dHP3 към епруветката на dPhiX.
- 8 Изхвърлете епруветката от dHP3.
- 9 Вортексирайте епруветката dPhiX, за да се смеси и след това центрофугирайте за кратко.
- 10 Инкубирайте dPhiX на стайна температура в продължение на 5 минути за денатуриране.
- 11 Вортексирайте HT1, за да се смеси.
- 12 Незабавно добавете 980 µl предварително охладен HT1 към dPhiX.
- 13 Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
- 14 Поставете dPhiX върху лед до употреба в подготовката за второто разреждане. Крайната концентрация е 20 pM dPhiX.
- 15 Върнете PhiX, HP3 и RSB за съхранение.

Пулиране и денатуриране на библиотеки

- 1 Ако NL PCR плаката е била съхранявана, размразете до стайна температура и след това конфигурирайте плаката на 280 × g за 1 минута.
- 2 Като използвате многоканална пипета, настроена на 30 µl, внимателно смесете с пипета библиотеките в плаката NL PCR 5 пъти.
Използвайте нови крайници за всяка библиотека.



ВНИМАНИЕ

Уверете се, че сте разбъркали добре библиотеките за оптимална производителност.

- 3 Изберете една от следните опции за пулиране, денатуриране и разреждане на библиотеките.
 - ▶ **Опция №1:** Едновременно секвенирайте библиотеки, получени от РНК проби и ДНК проби. Вижте [Опция №1: Съвместно използване на ДНК и РНК библиотеки на страница 31](#).
 - ▶ **Опция №2:** Секвениране на библиотеки, получени само от ДНК проби. Вижте [Опция №2: Използване само на ДНК библиотеки на страница 32](#).
 - ▶ **Опция №3:** Секвениране на библиотеки, получени само от РНК проби. Вижте [Опция №3: Използване само на РНК библиотеки на страница 33](#).

Опция №1: Съвместно използване на ДНК и РНК библиотеки

- 1 Етиктирайте микроцентрофужна епруветка PRL (Пулирани РНК библиотеки).
- 2 Етиктирайте микроцентрофужна епруветка PDL (Пулирани ДНК библиотеки).
- 3 Прехвърлете по 10 µl от всяка нормализирана РНК (сDNA) библиотека от NL плаката в PRL епруветката. Не пулирайте две библиотеки с един и същ индексен праймер.
- 4 Прехвърлете по 10 µl от всяка нормализирана ДНК библиотека от NL плаката в PDL епруветката. Не пулирайте две библиотеки с един и същ индексен праймер.
- 5 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката NL PCR. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 6 Вортексирайте всяка PRL и PDL епруветка, за да се смесят.

- 7 Центрофугирайте PRL и PDL епруветките за кратко.
- 8 Инкубирайте PRL и PDL епруветките с помощта на термоблок на 96°C за 2 минути.
- 9 Поставете PRL и PDL върху лед за 5 минути.
- 10 Вортексирайте PRL и PDL епруветките, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
- 11 Върнете PRL и PDL епруветките върху леда.

Приготвяне на първото разреждане

- 1 Етикетирайте микроцентрифужна епруветка с обем 1,7 ml DIL1 (разреждане 1).
- 2 Прехвърлете 20 µl от PDL в празната епруветка DIL1.
- 3 Добавете 5 µl от PRL в DIL1.
- 4 Изхвърлете епруветките PDL и PRL.
- 5 Добавете 475 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL1 (разреждане 1:20).
- 6 Вортексирайте DIL1 епруветката, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.

Приготвяне на второто разреждане

- 1 Етикетирайте микроцентрифужна епруветка с обем 2,0 ml DIL2 (разреждане 2).
- 2 Прехвърлете 40 µl от DIL1 в празната епруветка DIL2.
- 3 Изхвърлете епруветката DIL1.
- 4 Добавете 1660 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL2 (разреждане 1:850).
- 5 Вортексирайте приготвен 20 pM dPhiX, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
- 6 Добавете 2,5 µl от приготвен 20 pM dPhiX в епруветката DIL2.
- 7 Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
- 8 Заредете 1300 µl от DIL2 в замразената касета с реагенти NextSeq 550Dx High Output v2 (300 цикъла)
За повече информация вижте *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочното ръководство за инструмента NextSeq 550Dx)* (документ № 1000000009513).
- 9 Изхвърлете епруветката DIL2.
- 10 Центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период от до 30 дни.
- 11 Пристъпете към секвенирането.
За повече информация вижте *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочното ръководство за инструмента NextSeq 550Dx)* (документ № 1000000009513).

Опция №2: Използване само на ДНК библиотеки

- 1 Етикетирайте микроцентрифужна епруветка PDL (Пулирани ДНК библиотеки).
- 2 Прехвърлете по 10 µl от всяка нормализирана ДНК библиотека от NL плаката в PDL епруветката.
Не пулирайте две библиотеки с един и същ индексен праймер.
- 3 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката NL PCR.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 4 Разбъркайте чрез завихряне PDL епруветка, за да се смеси.
- 5 Центрофугирайте PDL епруветката за кратко.
- 6 Инкубирайте PDL епруветката с помощта на термоблок на 96°C за 2 минути.
- 7 Поставете PDL върху лед за 5 минути.
- 8 Вортексирайте PDL епруветката, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
- 9 Върнете PDL епруветката върху леда.

Приготвяне на първото разреждане

- 1 Етикетирайте микроцентрифужна епруветка с обем 1,7 ml DIL1 (разреждане 1).
- 2 Прехвърлете 10 µl от PDL в празната епруветка DIL1.
- 3 Изхвърлете епруветката PDL.
- 4 Добавете 190 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL1 (разреждане 1:20).

- 5 Вортексирайте DIL1, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.

Приготвяне на второто разреждане

- 1 Етикетирайте микроцентрифужна епруветка с обем 2,0 ml DIL2 (разреждане 2).
- 2 Прехвърлете 40 µl от DIL1 в празната епруветка DIL2.
- 3 Изхвърлете епруветката DIL1.
- 4 Добавете 1660 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL2 (разреждане 1:850).
- 5 Вортексирайте приготвен 20 pM dPhiX и след това центрофугирайте за кратко.
- 6 Добавете 2,5 µl от приготвен 20 pM dPhiX в епруветката DIL2.
- 7 Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
- 8 Заредете 1300 µl от DIL2 в замразената касета с реагенти NextSeq 550Dx High Output v2 (300 цикъла).
За повече информация вижте *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочното ръководство за инструмента NextSeq 550Dx) (документ № 100000009513)*.
- 9 Изхвърлете епруветката DIL2.
- 10 Центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и след това съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период от до 30 дни.
- 11 Пристъпете към секвенирането.
За повече информация вижте *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочното ръководство за инструмента NextSeq 550Dx) (документ № 100000009513)*.

Опция №3: Използване само на РНК библиотеки

- 1 Етикетирайте микроцентрифужна епруветка PRL (Пулирани РНК библиотеки).
- 2 Прехвърлете по 10 µl от всяка нормализирана РНК (сDNA) библиотека от NL плаката в PRL епруветката.
Не пулирайте две библиотеки с един и същ индексен праймер.
- 3 Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката NL PCR.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- 4 Вортексирайте PRL епруветката, за да се смеси.
- 5 Центрофугирайте PRL епруветката за кратко.
- 6 Инкубирайте PRL епруветката с помощта на термоблок на 96°C за 2 минути.
- 7 Поставете PRL върху лед за 5 минути.
- 8 Вортексирайте PRL епруветката, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
- 9 Върнете PRL епруветката върху леда.

Приготвяне на първото разреждане

- 1 Етикетирайте микроцентрифужна епруветка с обем 1,7 ml DIL1 (разреждане 1).
- 2 Прехвърлете 10 µl от PRL в празната епруветка DIL1.
- 3 Изхвърлете епруветката PRL.
- 4 Добавете 190 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL1 (разреждане 1:20).
- 5 Вортексирайте DIL1, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.

Приготвяне на второто разреждане

- 1 Етикетирайте микроцентрифужна епруветка с обем 2,0 ml DIL2 (разреждане 2).
- 2 Прехвърлете 40 µl от DIL1 в празната епруветка DIL2.
- 3 Изхвърлете епруветката DIL1.
- 4 Добавете 1646 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL2 (разреждане 1:843).
- 5 Вортексирайте приготвен 20 pM dPhiX и след това центрофугирайте за кратко.
- 6 Добавете 16,7 µl от приготвен 20 pM dPhiX в епруветката DIL2.
- 7 Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
- 8 Заредете 1300 µl от DIL2 в замразената касета с реагенти NextSeq 550Dx High Output v2 (300 цикъла).

За повече информация вижте *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочното ръководство за инструмента NextSeq 550Dx) (документ № 100000009513)*.

- 9 Изхвърлете епруветката DIL2.
- 10 Центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период от до 30 дни.
- 11 Пристъпете към секвенирането.

За повече информация вижте *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочното ръководство за инструмента NextSeq 550Dx) (документ № 100000009513)*.

Патенти и търговски марки

Настоящият документ и съдържанието му са собственост на Illumina, Inc. и нейните филиали („Illumina“) и са предназначени само за употреба по силата на договор от страна на клиента и във връзка с използването на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ, и с никаква друга цел. Този документ и съдържанието му не трябва да се използват или разпространяват за никаква друга цел и/или по друг начин да бъдат съобщавани, разкривани или възпроизвеждани по какъвто и да е начин без предварителното писмено съгласие от страна на Illumina. Illumina не предоставя посредством този документ никакъв лиценз за свой патент, търговска марка, авторско право или права по силата на общото право, нито подобни права на която и да е трета страна.

Инструкциите в този документ трябва да се следват строго и изрично от страна на квалифициран и правилно обучен персонал, за да се гарантират правилната и безопасната употреба на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ. Цялото съдържание на този документ трябва да бъде прочетено и разбрано напълно, преди да се използва(т) такъв(такива) продукт(и).

АКО ВСИЧКИ ИНСТРУКЦИИ, СЪДЪРЖАЩИ СЕ В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ, НЕ БЪДАТ НАПЪЛНО ПРОЧЕТИ И ИЗРИЧНО СПАЗВАНИ, ТОВА МОЖЕ ДА ДОВЕДЕ ДО ПОВРЕДА НА ПРОДУКТ(ИТЕ), НАРАНЯВАНЕ НА ЛИЦАТА, ВКЛЮЧИТЕЛНО НА ПОТРЕБИТЕЛИТЕ ИЛИ ДРУГИ ЛИЦА, И УВРЕЖДАНЕ НА ДРУГО ИМУЩЕСТВО, И ЩЕ ОТМЕНИ ВСЯКАКВА ГАРАНЦИЯ, ПРИЛОЖИМА ЗА ПРОДУКТ(ИТЕ).

ILLUMINA НЕ ПОЕМА НИКАКВА ОТГОВОРНОСТ В РЕЗУЛТАТ НА НЕПРАВИЛНАТА УПОТРЕБА НА ПРОДУКТА(ИТЕ), ОПИСАН(И) В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ (ВКЛЮЧИТЕЛНО ТЕХНИ ЧАСТИ ИЛИ СОФТУЕР).

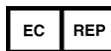
© 2022 Illumina, Inc. Всички права запазени.

Всички търговски марки са собственост на Illumina, Inc. или съответните им притежатели. За специфична информация относно търговските марки посетете www.illumina.com/company/legal.html.

Информация за контакт



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122, САЩ
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (извън Северна Америка)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Етикетиране на продукта

За пълна справка за символите, които може да се появяват на опаковката и етикетите на продукта, направете справка с легендата на символите за вашия комплект на support.illumina.com.