

TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK

Katalognr 20005718: 1–4 användningar, upp till 96 bibliotek

Avsedd användning

Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx är en uppsättning reagenser och förbrukningsmaterial som används för att förbereda provbibliotek från DNA som extraherats från perifert helblod och formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad (FFPE). Analytspecifika reagenser som användaren tillhandahåller behövs för biblioteksberedning som riktar in sig på specifika genomiska områden av intresse. De genererade provbiblioteken är avsedda för användning på Illuminas DNA-sekvensanalytatorer med hög genomströmning.

Grundläggande principer

Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx är avsett för manuell beredning av bibliotek som används för sekvensering av DNA från perifera helblodsprover och formalinfixerad, paraffinbäddad (FFPE) vävnad. Med hjälp av de reagenser som medföljer i TruSeq Custom Amplicon Kit Dx bearbetas genomiskt DNA genom biblioteksberedningsstegen, som specifikt amplifierar utvalda genomiska områden i varje prov med hjälp av analytspecifika oligonukleotider, samtidigt som index och sekvenser för infångning av flödesceller tillsätts till de amplifierade produkterna. DNA från helblodsprover följer arbetsflödet Germline, medan DNA från FFPE-vävnad följer det somatiska arbetsflödet. Resulterande provbibliotek är redo för sekvensering på en Illumina DNA-sekvensanalytator med hög genomströmning och analys av instrumentprogrammets moduler som motsvarar arbetsflödena Germline eller Somatic.

Alla reagenser tillhandahålls, förutom de analytspecifika oligonukleotider, som utformas av användaren.

Biblioteksberedning består av fyra nyckelsteg: hybridisering, förlängningsligerigering, PCR-amplifiering samt normalisering av bibliotek.

Biblioteksberedning

- **Hybridisering** – Hybridiserar en pool av uppströms och nedströms oligonukleotider som är specifika för undersökningsområden för det genomiska DNA-provet. I slutet av denna process avlägsnar en tre steg lång tvättprocedur med ett storleksavskiljande filter obundna oligonukleotider från det genomiska DNA:t.
- **Förlängningsligerigering** – Ansluter hybridiserade uppströms och nedströms oligonukleotider. Ett DNA-polymeras sträcker sig från oligonukleotiderna uppströms genom målområdet, följt av ligerigering till ände 5' av oligonukleotiden nedströms med hjälp av ett DNA-ligas. Resultatet är att det bildas produkter som innehåller de oligonukleotider som är specifika för områdena av intresse, omgivna av sekvenser som behövs för amplifiering.
- **PCR-amplifiering** – Amplifierar förlängningsligeringsprodukterna med hjälp av primrar som tillför indexsekvenser för provmultiplexning och sekvenser för infångning av flödesceller som krävs för klustergenerering på en Illumina-sekvenserare. I slutet av denna process renar en PCR-rengöringsprocedur PCR-produkterna (som kallas för ett bibliotek).
- **Normalisering av bibliotek** – Normaliserar kvantiteten i varje bibliotek för att säkerställa en mer likställd biblioteksrepresentation i det slutliga poolade biblioteket. I slutet av denna process laddas det poolade biblioteket i en Illumina-sekvenserare för sekvensering som använder sig av SBS-kemi (sekvensering genom syntes).

Begränsningar

- 1 För *in vitro*-diagnostiskt bruk.
- 2 Indels (insertioner, deletioner och kombinationer av sådana) som är längre än 25 bp riktas inte in av analysprogrammet. Det innebär att indels med en längd som är större än 25 bp inte detekteras av analysprogrammet.
- 3 Systemet har validerats för detektion av enkla nukleotida varianter (SNV:er) och upp till 25 bp-deletioner och 24 bp-insertioner när det används med variantmodulerna Germline och Somatic. För somatisk bestämning med en variantfrekvens på 0,05 testades 25 bp-deletioner och 18 bp-infogningar.
- 4 Amplikonläsningar med extremt variantinnehåll passas eventuellt inte in av analysprogrammet, vilket medför att området rapporteras som vildtyp. Exempel på sådant extremt innehåll är:
 - Läsnings som innehåller fler än tre indels
 - Läsnings av längder på minst 30 bp med SNV-innehåll som är större än 4 % av den totala amplikonmåslängden (exklusive sondområden)
 - Läsnings av längder som är mindre än 30 bp med SNV-innehåll som är större än 10 % av den totala amplikonlängden (inklusive sondområden)
- 5 Stora varianter (inkluderar multi-nukleotidvarianter, stora insertioner, deletioner eller kombinationer av sådana) kan rapporteras som separata mindre varianter i VCF-utdatafilen.
- 6 Deletionsvarianter kan filtreras eller missas när de sträcker sig över två överlappande amplikoner om deletionens längd är större än eller lika med överlappningen mellan amplikonerna.
- 7 Systemet kan inte detektera insertioner och deletioner om de angränsar direkt till en primer och det inte finns någon överlappande amplikon. För områden med överlappande amplikoner kan analysen inte detektera deletioner när området med överlappningen är mindre än den deletion som ska detekteras. Om exempelvis det överlappande området mellan två intilliggande amplikoner är två (2) baser kan analysen inte detektera några deletioner som inkluderar båda baserna. En enbas-deletion vid endera av baserna kan detekteras.
- 8 Liksom med alla hybridiseringsbaserade arbetsflöden för beredning av bibliotek kan underliggande polymorfismer, mutationer, insertioner eller deletioner i oligonukleotidbindande regioner påverka de alleler som undersöks och följaktligen de bestämningar som görs under sekvensering. Här följer några exempel:
 - En variant i fas med en variant i primerområdet amplifieras eventuellt inte, vilket ger ett falskt negativt resultat.
 - Varianter i primerregionen kan förhindra amplifiering av referensallelen, vilket medför en felaktig homozygot variantbestämning.
 - Indelvarianter i primerområdet kan eventuellt orsaka en falsk positiv bestämning i slutet av läsningen intill primern.
- 9 Indels kan eventuellt filtreras på grund av strängbias om de finns nära slutet av en läsning och mjukklippas under inpassning.
- 10 Små MNV:er har inte validerats.
- 11 Kopietalsvarianter eller strukturella varianter, till exempel fusioner eller translokationer, har inte validerats.
- 12 Germline-specifika begränsningar
 - Modulen Germline Variant (Könscecellsvariant) är utformad för att ge kvalitativa resultat för bestämning av könscecellsvanter (t.ex., homozygot, heterozygot, vildtyp).
 - Vid användning med modulen Germline Variant (Könscecellsvariant) krävs en minsta täckning per amplikon på 150x för korrekt variantbestämning. Antalet prover och det totala antalet målbaser påverkar täckningen. GC-innehåll och annat genomiskt innehåll kan påverka täckningen.
 - Variation i antalet kopior kan påverka huruvida en variant identifieras som homozygot eller heterozygot.
 - Varianter i vissa repetitiva sammanhang filtreras bort i VCF-filerna. RMxN-upprepningsfiltret används för att filtrera varianter om hela eller en del av variantsekvensen upprepas i referensgenomet som angränsar till variantens position. För bestämning av könscecellsvanter krävs minst 9 upprepningar i referensen för att en variant ska filtreras, och endast upprepningar med en längd på upp till 5 bp beaktas (R5x9).

13 Somatic-specifika begränsningar

- Modulen Somatic Variant (Somatisk variant) är utformad för att ge kvalitativa resultat vid bestämning av somatiska varianter (dvs. närvaro av en somatisk variant med en variantfrekvens på 0,026 och en detekteringsgräns på 0,05).
- Vid användning med modulen Somatic Variant (Somatisk variant) krävs en minsta täckning per amplicon på 450x per oligonukleotidpool för korrekt variantbestämning. Antalet prover och det totala antalet målbasen påverkar täckningen. GC-innehåll och annat genomiskt innehåll kan påverka täckningen.
- Varianter i vissa repetitiva sammanhang filtreras bort i VCF-filerna. RMxN-upprepningsfiltret används för att filtrera varianter om hela eller en del av variantsekvensen upprepas i referensgenomet som angränsar till variantens position. För bestämning av somatiska varianter krävs minst 6 upprepningar i referensen för att en variant ska filtreras, och endast upprepningar med en längd på upp till 3 bp beaktas (R3x6).
- Modulen Somatic Variant (Somatisk variant) kan inte skilja mellan könsellsvarianter och somatiska varianter. Modulen är utformad för att detektera varianter med ett antal olika variantfrekvenser, men variantfrekvens kan inte användas för att skilja mellan somatiska varianter och könsellsvarianter.
- Normal vävnad i provet påverkar detekteringen av varianter. Den rapporterade detekteringsgränsen baseras på en variantfrekvens som förhåller sig till det totala DNA som extraheras från både tumörvävnad och normal vävnad.

Produktkomponenter

Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx består av följande:

- TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (katalognr 20005718)

Reagenser

Reagenser som tillhandahålls

Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx har konfigurerats till att bearbeta upp till 96 bibliotek under en enda användning (96 prover för arbetsflödet Germline och 40 prover för arbetsflödet Somatic [det krävs 2 bibliotek per prov]). Produktpaketet möjliggör också fyra användningar av biblioteksberedningar med 24 bibliotek per användning för arbetsflödet Germline och 20 bibliotek per användning för arbetsflödet Somatic.

I följande tabeller finns en fullständig lista över reagenser som medföljer i produktpaketet.

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, låda 1

Tabell 1 Pre-amplifieringsreagenser i låda 1A

Komponent	Antal	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser	Förvaring
Hybridiseringsbuffert	1 rör	4,32 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter och formamid	-25 °C till -15 °C
Förlängningsligeringsblandning	1 rör	4,8 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller patentskyddad blandning av DNA polymeraser, DNA-ligas och dNTPs	-25 °C till -15 °C
Indexprimrar A (A501)–H (A508)	1 rör per primer	192 µl	PCR-primrar med indexsekvenser och sekvenseringsadaptar	-25 °C till -15 °C
Indexprimrar 1 (A701)–12 (A712)	1 rör per primer	128 µl	PCR-primrar med indexsekvenser och sekvenseringsadaptar	-25 °C till -15 °C
PCR-polymeras	1 rör	56 µl	Patentskyddat DNA-polymeras	-25 °C till -15 °C
PCR-masterblandning	1 rör	2,8 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter och dNTPs	-25 °C till -15 °C

Tabell 2 Post-amplifieringsreagenser i låda 1B

Komponent	Antal	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser	Förvaring
Spädningsvätska för normalisering av bibliotek	1 rör	4,6 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter, 2-merkaptoletanol och formamid	-25 °C till -15 °C
Biblioteksspädningsbuffert	1 rör	4,5 ml	Buffrad vattenbaserad lösning	-25 °C till -15 °C
PhiX intern kontroll	1 rör	10 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller PhiX genomiskt DNA	-25 °C till -15 °C

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, låda 2

Tabell 3 Pre-amplifieringsreagenser

Komponent	Antal	Fyllnadsvolym	Innehåll	Förvaring
Filterplatta	4 plattor	Ej tillämpligt	Mikrotiterplatta i polypropylen med ett modifierat polyetersulfonmembran	15 °C till 30 °C

Tabell 4 Post-amplifieringsreagenser

Komponent	Antal	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser	Förvaring
Elueringsbuffert	1 rör	4,8 ml	Buffrad vattenbaserad lösning	15 °C till 30 °C
Lagringsbuffert för bibliotek	1 rör	3,5 ml	Buffrad vattenbaserad lösning	15 °C till 30 °C



OBS!

Låda 2 innehåller pre- och post-amplifieringsreagenser i samma förpackning.

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, låda 3

Tabell 5 Pre-amplifieringsreagenser i låda 3A

Komponent	Antal	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser	Förvaring
Stringent tvättbuffert	1 flaska	24 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter, 2-merkaptoletanol och formamid	2°C till 8°C
Universal tvättbuffert	1 rör	4,8 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter	2°C till 8°C

Tabell 6 Post-amplifieringsreagenser i låda 3B

Komponent	Antal	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser	Förvaring
PCR-rengöringspärlor	1 rör	5 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller paramagnetiska pärlor i fast fas och polyetylenglykol	2°C till 8°C
Normaliseringstvätt för bibliotek	2 rör	4,8 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salter, 2-merkaptoletanol och formamid	2°C till 8°C
Bibliotekspärlor	1 rör	1,2 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller paramagnetiska pärlor i fast fas	2°C till 8°C

Nödvändiga reagenser – tillhandahålls inte

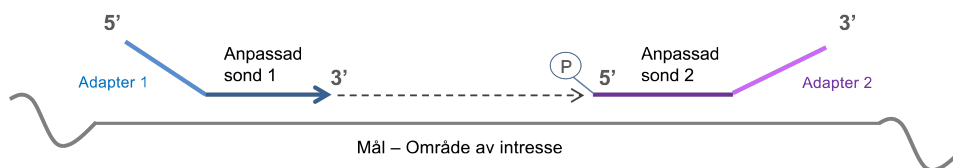
Anpassad oligonukleotidpool

Analytspecifika oligonukleotider är avsedda att tas fram av användaren och ingår inte i produktpaketet för beredning av bibliotek. Bild 1 visar principen för anpassad oligoutformning. Oligoutformningen ska uppfylla följande krav:

- För arbetsflödet Germline bör ett par anpassade oligonukleotider utformas för varje amplicon: en Anpassad sond 1 (uppströms locuspecifik oligonukleotid [ULSO]) och en Anpassad sond 2 (nedströms locuspecifik oligonukleotid [DLSO]).

- För arbetsflödet Somatic bör två par anpassade oligonukleotider utformas för varje amplicon. Varje par består av en Anpassad sond 1 (uppströms locusspecifik oligonukleotid [ULSO]) och en Anpassad sond 2 (nedströms locusspecifik oligonukleotid [DLSO]). Ett par ska rikta in sig på plussträngen och det andra på minussträngen.
- Anpassade oligonukleotider ska omge undersökningsområdet. Undersökningsområdet kan vara mellan 150 och 250 bp för att möjliggöra en fullständig sekvensering av fragmentet med en 2 x 150 cykelsekvenseringskörning.
- Båda oligonukleotiderna ska hybridiseras till samma DNA-sträng.
- Anpassade oligonukleotider ska innehålla Illumina-specifika adapterar för att göra det möjligt att tillsätta index och sekvenseringsadapterar genom PCR.
 - Adapter 1 (5'-CAACGATCGTCGAAATTCGC-3') bör vara placerad vid ände 5' av Anpassad sond 1 (ULSO).
 - Adapter 2 (5'-AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA-3') bör vara placerad vid ände 3' av Anpassad sond 2 (DLSO).
- Anpassad sond 2 (DLSO) fosforyleras vid ände 5' för att stödja ligeringssteget efter förlängning av Anpassad sond 1 (ULSO).

Bild 1 Oligoutformning för TruSeq Custom Amplicon Kit Dx



- Följande designparametrar för oligonukleotider rekommenderas:
 - Längdintervall från 22–30 nukleotider (genspecifikt område).
 - Den totala storleken på ampliconet från 190 till 290 baspar, inklusive adapterar för arbetsflödet Germline eller 160 till 250 baspar, inklusive adapterar för arbetsflödet Somatic.
 - Rekommenderat GC-innehåll för primern kan variera från 25 % till 70 %.
 - Rekommenderat T_m-intervall från 55 °C till 70 °C.
 - Oligonukleotidkoncentrationen ska vara 15 nM per oligo i den anpassade poolen.
 - Ingen ytterligare oligonukleotidrening krävs efter syntes. Avsaltning rekommenderas.
 - Oligonukleotiderna kan spädas i TE-buffert.
 - Antalet PCR-fragment per prov kan variera från 16 till 384.
 - Utforma oligonukleotiderna så att extra baser lämnas mellan primerändan och undersökningsområdet för att göra det möjligt att detektera insertioner och deletioner i ändarna av undersökningsområdet (se punkt 7 i Begränsningar på sidan 2).
 - Om sammanfogning krävs för att täcka ett helt undersökningsområde ska det överlappande området i målområdet mellan bindningsplatser för de närliggande sonduppsättningarna vara 1 bp större än storleken på den deletion som ska detekteras. För att göra det möjligt att detektera deletion av 3 bp måste exempelvis det överlappande området mellan närliggande sonduppsättningar vara > 4 bp. Närliggande sonduppsättningar ska utformas för alternerande strängar för att undvika interferens.

Se [Begränsningar](#) för den minsta täckningen per amplicon som behövs för variantbestämning. Antalet prover per körning ska beräknas baserat på den minsta täckning som krävs av sekvenseringsinstrumentet och beror på den totala längden och enhetliga täckningen för de anpassade oligonukleotidpoolerna.

En manifestfil bör skapas för varje anpassad oligonukleotidpool. Manifestet är en textfil som innehåller information om riktade genomiska områden och krävs för att sekvenseraren ska kunna köra analysen. Besök Illuminas webbplats för att hämta en mall för manifestfilen.

Pre-amplifieringsreagenser

- 10 N NaOH (bered från tabletter eller använd en standardlösning)
- TE-buffert
- Vatten, fritt från RNAs/DNAs

Post-amplifieringsreagenser

- 10 N NaOH (bered från tabletter eller använd en standardlösning)
- Etanol, 200 proof för molekylärbiologi
- TE-buffert
- Vatten, fritt från RNAs/DNAs

Förvaring och hantering

- 1 Rumstemperatur definieras som 15 °C till 30 °C.
- 2 Följande reagenser levereras frysta och är stabila när de förvaras vid -25 °C till -15 °C fram till angivet utgångsdatum.
 - Hybridiseringsbuffert
 - Förlängningsligeringsblandning
 - Indexprimrar A (A501)–H (A508)
 - Indexprimrar 1 (A701)–12 (A712)
 - PCR-polymeras
 - PCR-masterblandning
 - Spädningsvätska för normalisering av bibliotek
 - Bibliotekspädningsbuffert
 - PhiX intern kontrollReagenserna är stabila i högst sex cykler av frysning/tining som utförs före angivet utgångsdatum.
- 3 Följande reagenser levereras kyllda och är stabila när de förvaras vid 2 °C till 8 °C fram till angivet utgångsdatum.
 - Stringent tvättbuffert
 - Universal tvättbuffert
 - PCR-rengöringspärlor
 - Bibliotekspärlor
 - Normaliseringstvätt för bibliotek
- 4 Följande reagenser levereras i omgivande temperatur och är stabila när de förvaras i rumstemperatur till angivet utgångsdatum:
 - Elueringsbuffert
 - Filterplatta
 - Lagringsbuffert för bibliotek
- 5 Förändringar av reagensernas utseende kan indikera en försämring av materialens kvalitet. Använd inte reagenserna om förändringar av deras utseende observeras (t.ex. tydliga förändringar av reagensens färg eller grumlighet med uppenbar mikrobiell kontamination).
- 6 Hybridiseringsbuffert, stringent tvättbuffert och spädningsreagens för normalisering av bibliotek kan bilda synliga fällningar eller kristaller. Vortexblanda kraftigt före användning och kontrollera sedan visuellt för att säkerställa att inga fällningar förekommer.
- 7 Följ följande bästa tillvägagångssätt vid hantering av PCR-rengöringspärlor och bibliotekspärlor:
 - Pärlorna får aldrig frysas.
 - Låt pärlorna nå rumstemperatur.
 - Vortexblanda pärlorna direkt före användning tills de är välsuspenderade och färgen verkar homogen.

- Blanda provet ordentligt sedan pärlor har tillsatts genom att pipettera upp och ned tio gånger. En skakapparat kan användas för att blanda prover noggrant.
 - Inkubera pärl-/provblandningen vid rumstemperatur under hela den angivna tiden.
 - Följ anvisningarna när du använder det magnetiska stativet. Vänta på att lösningen ska klarna innan du aspirerar. Håll kvar plattan på det magnetiska stativet medan du långsamt aspirerar supernatanten. Var noga med att inte störa de separerade pärlorna.
- 8 PCR-amplifieringsplattan kan stå kvar i termocykeln över natten, eller så kan den förvaras under något av de förhållanden som anges nedan. Försegla plattan ordentligt innan du ställer undan den.
 - 2 °C till 8 °C i upp till två dagar
 - -25 °C till -15 °C i upp till en vecka
 - 9 Bibliotekspärlorna får inte frysas eller blandas med spädningsreagensen för normalisering av bibliotek blandningen inte används direkt.
 - 10 Den färdiga plattan för normalisering av bibliotek (LNP) kan förvaras vid 2 °C till 8 °C i upp till tre timmar eller -25 °C till -15 °C i upp till en vecka.
 - 11 Lagringsplattan (SGP) kan förvaras vid -25 °C till -15 °C i upp till 48 timmar.
 - 12 Det utspädda amplikonbiblioteket (DAL) kan förvaras vid -25 °C till -15 °C i upp till 84 dagar.
 - 13 Ladda den utspädda amplikonpoolen i reagenshållaren omedelbart efter denaturering.

Utrustning och material

Utrustning och material som tillhandahålls och säljs separat

- 1 En DNA-sekvensanalysator för hög genomströmning och tillhörande förbrukningsmaterial för sekvensering från Illumina
- 2 **TruSeq fixtursats för indexplatta**, katalognr FC-130-1005
- 3 **TruSeq fixtur- och flänssats för indexplatta**, katalognr FC-130-1007
- 4 **Ersättningslock för indexadapter**, katalognr DX-502-1003
- 5 TruSeq Custom Amplicon Kit Dx för FFPE QC, katalognr 20006259 (för arbetsflödet Somatic)

Nödvändig utrustning och material – tillhandahålls inte

Utrustning och material för pre-amplifiering

- 1 **Värmeblock** – Ett värmeblock för en 96-brunnarsplatta krävs. Värmeblocket måste motsvara följande specifikationer.
 - Uppvärt lock
 - Temperaturintervall: rumstemp 5 °C till 99 °C
 - Temperaturreglering: ± 0,1 °C vid 37 °C; ± 0,4 °C vid 60 °C
- 2 **Provinkubator** – En inkubator (hybridiseringsugn) krävs. Inkubatorn måste motsvara följande specifikationer.
 - Temperaturintervall: 10 °C till 100 °C
 - Temperaturreglering: ± 0,2 °C
- 3 **Bordscentrifug** – En bordscentrifug (en separat centrifug krävs i labbområdet för post-amplifiering). Centrifugen måste motsvara följande specifikationer.
 - Kan bibehålla 20 °C
 - Passar en 96-brunnarsplatta med filterenhet
 - Accepterar 5 ml rör
 - Uppnår hastigheter på 280 till 2 400 × g
- 4 **Värmeförseglare** – Rekommenderas för hybridisering över natten för att förhindra avdunstning vid 40 °C inkubation.
- 5 **Precisionspipetter** – En uppsättning precisionspipetter krävs. (En separat uppsättning krävs i labbområdet för post-amplifiering.) Användning av precisionspipetter säkerställer exakt tillförsel av reagens och prov.

En- eller flerkanaliga pipetter kan användas om de kalibreras regelbundet och har en exakthet på inom 5 % av angiven volym.

- 6 **Förbrukningsmaterial** – Följande förbrukningsmaterial krävs.
 - 96-brunnars PCR-plattor med krage, 0,2 ml, i polypropylen eller motsvarande
 - Förvaringsplattor för 96-brunnar, 0,8 ml (MIDI-plattor)
 - Lösningkärl, PVC, DNase, fritt från RNase (tråg)
 - Självhäftande aluminiumfolieförsegling (som motstår temperaturer på 95 °C) eller förseglingar som är kompatibla med värmeförseglare
 - Försegling som är kompatibel med PCR-termocykler
 - Aerosolresistenta pipettspetsar

Utrustning och material för post-amplifiering

- 1 **Termocykel** – En termocykel krävs. Termocyklern måste ha ett uppvärmt lock och uppfylla följande specifikationer:
 - Temperaturkontrollintervall: 4 °C till 99 °C
 - Kontrollexakthet: $\pm 0,25$ °C från 35 °C till 99 °C
- 2 **Skakapparat för mikroplattor** – En skakapparat för mikroplattor krävs i labbområdet för post-amplifiering. Plattskakaren måste uppfylla följande specifikationer:
 - Max blandningshastighet: 3 000 varv/min
 - Hastighetsintervall vid blandning: 200–3 000 varv/min
- 3 **Bordscentrifug** – En bordscentrifug krävs (en separat centrifug krävs i labbområdet för pre-amplifiering). Centrifugen måste motsvara följande specifikationer.
 - Kan bibehålla 20 °C
 - Passar en 96-brunnars MIDI-platta
 - Accepterar 5 ml rör
 - Uppnår hastigheter på 280 till 2 400 $\times g$
- 4 **Värmeblock** – Ett värmeblock för provrör på 1,5 ml till 2 ml krävs. Värmeblocket måste motsvara följande specifikationer.
 - Temperaturintervall: rumstemp 5 °C till 99 °C
 - Temperaturreglering: $\pm 0,1$ °C vid 37 °C; $\pm 0,4$ °C vid 60 °C
- 5 **Magnetiskt stativ** – Ett magnetiskt stativ för en 96-brunnarsplatta krävs. Bättre resultat uppnås när magneterna sitter på sidan av stativet och inte på botten.
- 6 **Precisionspipetter** – En uppsättning precisionspipetter krävs. (En separat uppsättning krävs i labbområdet för pre-amplifiering.) Användning av precisionspipetter krävs för att säkerställa exakt tillförsel av reagens och prov. En- eller flerkanaliga pipetter kan användas om de kalibreras regelbundet och har en exakthet på inom 5 % av angiven volym.
- 7 **Tillbehör till gel-elektrofores** – Tillbehör och apparatur till gel-elektrofores krävs, samt lämplig infärgningsmetod för att visualisera PCR-produkter i gelen.
- 8 **Förbrukningsmaterial** – Följande förbrukningsmaterial krävs.
 - 96-brunnars PCR-plattor med krage, 0,2 ml, i polypropylen eller motsvarande
 - Förvaringsplattor för 96-brunnar, 0,8 ml (MIDI-plattor)



OBS!

Se till att 96-brunnarsplattan är kompatibel med det magnetiska stativet.

- 2–4 % TBE-agarosegel
- 100 bp DNA molekylviktsmarkör
- DNA-laddningsfärg
- Koniska rör, 15 ml
- Eppendorf mikrocentrifugrör (skruvlock rekommenderas)
- PCR-remsor för åtta rör

- Lösningsskär, PVC, DNase, fritt från RNase (tråg)
- Självhäftande aluminiumfolieförseglingar
- Microseal® "B" (Bio-Rad) eller motsvarande
- Aerosolresistenta pipettspetsar

Insamling, transport och förvaring av prov

Arbetsflödet Germline

Följande villkor måste uppfyllas vid hantering av blod och DNA extraherat från blodet.



FÖRSIKTIGHET!

Hantera alla blodprover som om de konstaterats bära på HIV, HBV och annan blodsmitta.

- 1 Helblodsprover som samlats in i K₂EDTA-rör kan användas.
- 2 Förvara helblodsprover i högst sju dagar vid rumstemperatur, upp till 30 dagar vid 2 °C till 8 °C eller upp till 30 dagar i fryst tillstånd vid -25 °C till -15 °C.
- 3 Transportera helblod i högst sju dagar vid rumstemperatur, 30 dagar vid 2 °C till 8 °C eller 30 dagar i fryst tillstånd vid -25 °C till -15 °C. Transport av helblod måste följa nationella, federala, delstatliga och lokala föreskrifter för transport av etiologiska agens.
- 4 Frysta prover av genomiskt DNA är hållbara under sex cykler av frysning/tining.



OBS!

Ingen negativ effekt på kittets resultat observerades med helblodsprov vid förekomst av förhöjda värden av bilirubin, kolesterol, hemoglobin, triglycerid eller EDTA.

DNA-extrahering (arbetsflödet Germline)

Alla validerade DNA-extraheringsmetoder kan användas.

Arbetsflödet Somatic

Följande villkor måste uppfyllas vid hantering av tumörvävnad och DNA som extraherats från vävnaden.

- 1 Tumörvävnad ska vara formalinfixerad och paraffinbäddad.
- 2 Extraherat genomiskt DNA ska förvaras mellan 2 °C och 8 °C i högst 28 dagar eller förvaras fryst mellan -25°C och -15 °C i högst 161 dagar.
- 3 Frysta prover av genomiskt DNA är hållbara under två cykler av frysning/tining.



OBS!

Ingen negativ effekt på produktpaketets resultat observerades på FFPE-vävnad när avparaffiniseringslösning, paraffinax, xylol, etanol, proteinas K, tvättlösningar, hemoglobin eller nekrotisk vävnad förekom.

DNA-extraktion (arbetsflödet Somatic)

Illumina rekommenderar kolumnbaserade DNA-extraktionspaket, med dubbla mängden proteinas K, proteinas K-inkuberingar över natten med omrörning och slutlig eluering i en volym på minst 30 µl. Pärlbaserade extraheringsmetoder och metoder som endast använder lysering av råa celleextrakt rekommenderas ej för användning med dessa reagenser.

Varningar och försiktighetsåtgärder



FÖRSIKTIGHET!

Enligt federal lag i USA får denna produkt endast säljas av eller på ordination av läkare eller övrig vårdpersonal som har licens i den delstat där han/hon är verksam och får använda eller ordinera användning av produkten.

**VARNING!**

Den här uppsättningen med reagenser innehåller potentiellt farliga kemikalier. Personskador kan uppstå vid inandning, intagande, hudkontakt och ögonkontakt. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och en laboratorierock som lämpar sig för den här graden av exponering. Hantera använda reagenser som kemiskt avfall och kassera dem i enlighet med nationella och lokala bestämmelser. Ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet finns i säkerhetsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

- 1 Hantera alla blodprover som om de vore känt smittsamma med humant immunbristvirus (HIV), humant hepatit B-virus (HBV) och annan blodburen smitta (allmänna försiktighetsåtgärder).
- 2 Om procedurerna inte följs enligt givna anvisningar kan det leda till felaktiga resultat eller avsevärt försämrad provkvalitet.
- 3 Arbeta enligt vedertagna laboratorierutiner. Använd inte pipetten med munnen. Ät inte, drick inte och rök inte på angivna arbetsområden. Använd engångshandskar och laboratorierockar vid hantering av prover och reagenser i kit. Tvätta händerna noga efter hantering av prover och reagenser i kittet.
- 4 Använd inte några kitkomponenter efter det utgångsdatum som anges på kittets kartergetikett. Byt inte ut kitkomponenter mot komponenter från olika partier. Observera att kitpartierna anges på kittets kartergetikett.
- 5 Förvara kitkomponenterna vid den angivna temperaturen i avsedda områden för pre-amplifiering och post-amplifiering.
- 6 Undvik att frysa/tina reagenserna i upprepade cykler. I *Metodanmärkingar* anges antalet användningar för kittet.
- 7 För att förhindra att prov eller reagens bryts ner ska du säkerställa att alla natriumhypokloritångor har avdunstat helt innan du påbörjar protokollet.
- 8 God laboratoriesed och laboratoriehygien krävs för att förhindra att PCR-produkter kontaminerar reagenser, instrument och prover med genomiskt DNA. PCR-kontamination kan ge upphov till felaktiga och otillförlitliga resultat.
- 9 För att undvika kontamination ska områdena före och efter amplifiering ha sin egen utrustning (t.ex. pipetter, pipettspetsar, vortexblandare och centrifug).
- 10 Undvik korskontaminering. Använd nya pipettspetsar mellan prover och mellan dispensering av reagenser. Blanda prover med en pipett och centrifugera plattan när så anges. Vortexblanda inte plattorna. Genom att använda aerosolresistenta spetsar minskar risken för överföring mellan amplikoner och korskontaminering från prov till prov.
- 11 Länkning av index och prov måste matcha den tryckta plattlayouten exakt. Lokal Run Manager fyller automatiskt i de indexprimrar som associerats med provnamnet när de anges i modulen. Användaren rekommenderas att verifiera de indexprimrar som associerats med proverna innan sekvenseringskörningen startas. Bristande överensstämmelse mellan provark och plattlayout leder till förlust av positiv providentifikation och felaktigt rapportering av resultat.
- 12 Förbered alltid färsk 80 % etanol för tvättsteg. Etanol kan absorbera vatten från luften, vilket påverkar resultaten.
- 13 Se till att all etanol avlägsnas från botten av brunnarna under tvättsteg. Etanolrester kan påverka resultaten.
- 14 Följ den angivna torktiden efter steget i det magnetiska stativet för att säkerställa fullständig avdunstning. Etanolrester kan påverka resultatet i efterföljande reaktioner.
- 15 Blanda inte den anpassade oligonukleotidpoolen och hybridiseringsbufferten för förvaring. När de kombineras blir den anpassade oligopoolen instabil, även vid förvaring i fryst tillstånd.
- 16 Användning av termocykler med aktiv kylning (t.ex. Peltier, termoelektriskt kyld) rekommenderas ej för hybridiseringssteget. Det passiva nedkylningssteget är avgörande för korrekt hybridisering.
- 17 Tillsätt alltid PCR-polymeras till PCR-masterblandning precis före användning. Spara aldrig den blandade arbetslösningen.
- 18 Under steget för normalisering av biblioteket är det av yttersta vikt att helt återsuspendera bibliotekspärlepelleten. Det är en förutsättning för att uppnå konsekvent klusterdensitet på flödescellen för sekvensering.
- 19 Följ de angivna inkubationstiderna i steget för normalisering av biblioteket. Felaktig inkubation kan påverka biblioteksrepresentation och klusterdensitet.

- 20 Med tanke på antalet plattöverföringar och efterföljande risk för kontaminering, bör extrem försiktighet iaktas för att säkerställa att brunnsinnehållet hålls kvar ordentligt i brunnen. Var uppmärksam på att innehållet inte skvätter.

Akronymer

Tabell 7 Akronymer för Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx

Akronym	Benämning
AMP	AMplification Plate (amplifieringsplatta) (bibliotek)
CLP	CLean-up Plate (rengöringsplatta)
COP	Custom Oligonucleotide Pool (anpassad oligonukleotidpool)
DAL	Diluted Amplicon Library (utspätt amplikonbibliotek)
FPU	Filter Plate Unit (filterplattenhets)
HYB	HYBridization Plate (hybridiseringsplatta)
LNP	Library Normalization Plate (platta för normalisering av bibliotek)
NTC	Negative Template Control (negativ mallkontroll)
PAL	Pooled Amplicon Library (poolat amplikonbibliotek)
POS	POsitive Control (positiv kontroll)
SGP	StoraGe Plate (lagringsplatta)

Metodanmärkingar

- Kittet kan användas upp till fyra gånger om färre än 96 bibliotek ska bearbetas. Vid fyra användningar stöder arbetsflödet Germline 24 bibliotek per användning och det somatiska arbetsflödet stöder 20 bibliotek per användning om pipetteringstekniken som beskrivs i [Bruksanvisningen](#) följs.
- Illumina kräver att ett DNA-prov för positiv kontroll och ett prov för negativ kontroll (NTC eller No Template Control) ingår i varje användning, vilket definieras som en uppsättning prover som bearbetas parallellt. DNA-provet för positiv kontroll ska vara ett väl kartlagt prov med en känd variation i intresseområdet.
- Innan du börjar med protokollet för TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ska du extrahera och kvantifiera DNA:t.
- För arbetsflödet Germline ska du kvantifiera DNA:t med en spektrofotometer. Kontrollera att A260/A280 av DNA-provet är > 1,5. Normalisera DNA-provet till 5 ng/μl. Varje prov kräver 10 μl av genomiskt DNA (totalt 50 ng).
- Den rekommenderade DNA-inmatningen på 50 ng för arbetsflödet Germline ger en DNA-kvantitetsvariation; biblioteksavkastningen och sekvenseringsresultaten beror på denna inmatningsnivå.
- För arbetsflödet Somatic ska du kvalificera DNA:t med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx för FFPE QC. Biblioteksavkastningen och sekvenseringsresultaten beror på provkvaliteten som mäts av FFPE QC-metoden.

Provgenomströmning

För Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kan biblioteksgenomströmningen under en sekvensering vara från 1 till 96 bibliotek på MiSeqDx och från 8 till 96 bibliotek på NextSeq 550Dx. Det somatiska arbetsflödet kräver två bibliotek för varje prov.

De indexprimrar som används vid PCR-amplifiering måste väljas baserat på önskad slutliga provhanteringskapacitet för att säkerställa att varje bibliotek använder en unik indexkombination.

Indexprimersekvenser

Tabell 8 Sekvenser för indexprimrar A (A501)–H (A508)

Indexprimer	Sekvens
Indexprimer A (A501)	TGAACCTT
Indexprimer B (A502)	TGCTAAGT
Indexprimer C (A503)	TGTTCTCT
Indexprimer D (A504)	TAAGACAC
Indexprimer E (A505)	CTAATCGA
Indexprimer F (A506)	CTAGAACA
Indexprimer G (A507)	TAAGTCC
Indexprimer H (A508)	TAGACCTA



OBS!

På NextSeq™ 550Dx anges indexprimrar A501–A508 som omvända komplement. Sekvenser med omvända komplement ska användas vid övervägande av indexets krav på mångfald för tvåkanalig sekvenseringskemi.

Tabell 9 Sekvenser för indexprimrar 1 (A701)–12 (A712)

Indexprimer	Sekvens
Indexprimer 1 (A701)	ATCACGAC
Indexprimer 2 (A702)	ACAGTGGT
Indexprimer 3 (A703)	CAGATCCA
Indexprimer 4 (A704)	ACAAACGG
Indexprimer 5 (A705)	ACCCAGCA
Indexprimer 6 (A706)	AACCCCTC
Indexprimer 7 (A707)	CCCAACCT
Indexprimer 8 (A708)	CACCACAC
Indexprimer 9 (A709)	GAAACCCA
Indexprimer 10 (A710)	TGTGACCA
Indexprimer 11 (A711)	AGGGTCAA
Indexprimer 12 (A712)	AGGAGTGG

Bruksanvisning

Provlayout

Innan du utför biblioteksberedningen skapas en sekvenseringskörning med Local Run Manager, programvaran på sekvenseringsinstrumentet. Körningen fylls i med prover och manifestfilen markeras. Den exempellayout som skapas skrivs ut eller exporteras till en fil som ska användas som referens när du bereder bibliotek från proverna. För detaljerade instruktioner, se den modulspecifika referenshandboken för det avsedda arbetsflödet och sekvenseringsinstrumentet. Prover kan matas in manuellt eller importeras enligt anvisningarna i referensguiden.

Anvisningar för arbetsflödet Germline jämfört med Somatic

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx är avsett för att manuellt förbereda bibliotek för sekvensering av DNA från perifera helblodsprover och formalinfixerad och paraffinbäddad (FFPE) vävnad. Med hjälp av de reagenser som medföljer i TruSeq Custom Amplicon Kit Dx bearbetas genomiskt DNA genom biblioteksberedningsstegen, som specifikt amplifierar utvalda genomiska områden i varje prov med hjälp av analytspecifika oligonukleotider, samtidigt som index och sekvenser för infångning av flödesceller tillsätts till de amplifierade produkterna. DNA från helblod följer arbetsflödet Germline, medan DNA från FFPE-vävnad följer arbetsflödet Somatic.

Resulterande provbibliotek är redo för sekvensering på en Illumina DNA-sekvensanalysator med hög genomströmning och analys av instrumentprogrammets moduler (Germline eller Somatic) för respektive arbetsflöde.



OBS!

På de platser i [Bruksanvisningen](#) där det förekommer skillnader i anvisningarna mellan arbetsflödet Germline och arbetsflödet Somatic anges detta i steget. Dessa skillnader sammanfattas i [Tabell 10](#).

Tabell 10 Skillnader mellan arbetsflödena Germline och Somatic

Steg	Parameter	Arbetsflödet Germline	Arbetsflödet Somatic
Preanalytisk	Provtyp	DNA från helblod	DNA från FFPE-vävnad
Preanalytisk	DNA-inmatning	50 ng	Baserat på ΔCq
Preanalytisk	Metod för kvalitetskontroll av prov	A260	TSCA Dx – FFPE QC
Hybridisering av oligonukleotidpool	Hybridiseringsmetod	Enkelsträngad	Dubbelsträngad
Hybridisering av oligonukleotidpool	Antal oligonukleotidpooler	1	2
PCR-amplifiering	Volym av indexprimrar	4 μ l	9 μ l
PCR-amplifiering	Volym av indexerande PCR-reaktion [HM4]	50 μ l	60 μ l
PCR-amplifiering	PCR-cykler	28	32
Kontrollera biblioteksberedning	Biblioteksavkastning	Valfri utvärdering efter gel (CLP-produkter)	Utvärdering efter gel (AMP-produkter)
PCR-rengöring	Volym av PCR-rengöringspärlor	45 μ l	55 μ l

Hybridisering av oligonukleotidpool (Pre-amplifiering)

Förberedelser

- 1 Se till att de analytspecifika oligonukleotidpoolerna, hybridiseringsbufferten, proverna med genomiskt DNA och det positiva kontrollprovet når rumstemperatur.

- 2 Vortexblanda de anpassade oligopoolerna och hybridiseringsbufferten kraftigt så att alla fällningar löses upp helt, centrifugera sedan oligonukleotidpoolrören en kort stund för att samla upp vätska. Säkerställ att ingen fällning syns i hybridiseringsbufferten.
- 3 Ställ in ett värmeblock för 96-brunnar på 95 °C.
- 4 Förvärm en inkubator till 37 °C.
- 5 Skapa provplattan enligt den tryckta plattlayouten från Local Run Manager.

Förfarande

- 1 Ställ ut en ny 96-brunnars PCR-platta (kallas hädanefter **HYB**-platta).
- 2 Välj ett av följande arbetsflöden (Germline eller Somatic) baserat på vilka varianttyper du riktat in dig på.
 - **Arbetsflödet Germline:**
 - Tillsätt 10 µl prov eller kontroll vid 5 ng/µl (50 ng totalt) i relevanta brunnar i **HYB**-plattan enligt plattans layout.
 - **Arbetsflödet Somatic:**
 - Tillsätt 10 µl prov eller kontroll spätt i enlighet med TruSeq Custom Amplicon Dx för FFPE QC. Prover eller kontroller tillsätts på plattan i två brunnar för hybridisering av båda oligonukleotidpoolerna enligt plattans layout.
- 3 Välj ett av följande arbetsflöden (Germline eller Somatic) baserat på vilka varianttyper du riktat in dig på.
 - **Arbetsflödet Germline:**
 - Tillsätt 10 µl av 1X TE-buffert till NTC-brunnen (no template control, kontroll utan mall).
Följ den genererade plattlayouten för korrekt val av brunn.
 - **Arbetsflödet Somatic:**
 - Tillsätt 10 µl av 1X TE-buffert till NTC-brunnarna (2) (no template control, kontroll utan mall).
Följ den genererade plattlayouten för korrekt val av brunn.
- 4 Välj ett av följande arbetsflöden (Germline eller Somatic) baserat på vilka varianttyper du riktat in dig på.
 - **Arbetsflödet Germline:**
 - Tillsätt 5 µl av den anpassade oligonukleotidpoolen till alla brunnar som innehåller genomiskt DNA och NTC enligt plattans layout.
 - **Arbetsflödet Somatic:**
 - Tillsätt 5 µl av den anpassade oligonukleotidpoolen A till de brunnar som innehåller genomiskt DNA och NTC enligt plattans layout.
 - Tillsätt 5 µl av den anpassade oligonukleotidpoolen B till de brunnar som innehåller genomiskt DNA och NTC enligt plattans layout.

Brunnarna som mottar respektive pool är ömsesidigt uteslutande.
- 5 Tillsätt 40 µl av hybridiseringsbuffert till varje prov och NTC till **HYB**-plattan. Pipettera försiktigt upp och ner 3–5 gånger för att blanda.
- 6 Försegla **HYB**-plattan och centrifugera 1 000 × g vid 20 °C i 1 minut.



FÖRSIKTIGHET!

För att begränsa eventuell avdunstning under hybridiseringsreaktionen rekommenderar vi starkt att använda en värmeförseglare för att försegla **HYB**-plattan för hybridisering över natten. Om ingen värmeförseglare finns ska du försegla **HYB**-plattan med en självhäftande aluminiumfolie och fästa noggrant med en förseglingsrulle eller kil och gå vidare till nästa steg när temperaturen når 40 °C.

- 7 Placera **HYB**-plattan i det förvärmda värmeblocket med 96 brunnar i 95 °C, stäng locket och inkubera i 1 minut.
- 8 Sänk värmeblockets inställning till 40 °C och fortsätt att inkubera tills värmeblocket når 40 °C (cirka 80 minuter).
Gradvis kylning är avgörande för korrekt hybridisering, därför rekommenderas inte PCR-termocykler med aktiv kylning (t.ex. Peltier, termoelektriskt kyl) för denna process.

**SÄKER STOPPUNKT**

När värmeblocket har nått 40 °C är **HYB**-plattan stabil vid 40 °C i upp till 18 timmar.
Innan du tar bort från värmeblocket ska du förstärka folieförseglingen med förseglingssulle eller kil.

Borttagning av obundna oligonukleotider**Förberedelser**

- 1 Se till att förlängningsligeringsblandning, stringent tvättbuffert och universal tvättbuffert når rumstemperatur och vortexblanda sedan en kort stund.
- 2 Montera filterplatteneheten (kallas härnäst **FPU**) i den ordning de visas, uppifrån och ner: lock, filterplatta, adapterkrage och MIDI-platta.
- 3 Fördiska filterplattans membran enligt följande:
 - a Tillsätt 50 µl av stringent tvättbuffert till varje prov och NTC-brunn.
 - b Täck filterplattan med locket och centrifugera vid 2 400 × g vid 20 °C i 5 minuter.

**OBS!**

Kontrollera att alla brunnar på filterplattan töms helt. Om tvättbufferten inte töms ut helt ska du centrifugera igen vid 2 400 × g vid 20 °C tills all vätska har försvunnit (5–10 minuter extra).

**FÖRSIKTIGHET!**

Det är viktigt att styra centrifugtemperaturen under diskstegen. Om temperaturen når 25 °C eller högre kan den höga temperaturen leda till högre stringens i primerbindningarna. Om prover har SNV:er i primerbindningsområdena kan den högre stringensen i sällsynta fall leda till allelbortfall.

Förfarande

- 1 Ta loss **HYB**-plattan från värmeblocket och centrifugera vid 1 000×g vid 20 °C i 1 minut.
- 2 För över hela volymen (ca 55 µl) för varje prov till motsvarande brunnar på filterplattan.
- 3 Täck filterplattan med locket och centrifugera vid 2 400 × g vid 20 °C i 5 minuter.
- 4 Tvätta filterplattan på följande vis:
 - a Tillsätt 50 µl av stringent tvättbuffert till varje prov och NTC-brunn.
 - b Täck filterplattan med locket och centrifugera vid 2 400 × g vid 20 °C i 5 minuter.

**OBS!**

Kontrollera att alla brunnar på filterplattan töms helt. Om tvättbufferten inte töms ut helt ska du centrifugera igen vid 2 400 × g vid 20 °C tills all vätska har försvunnit (5–10 minuter extra).

- 5 Upprepa tvättningen enligt beskrivningen i föregående steg.
- 6 Kassera allt filtrat (som innehåller formamid) och sätt sedan ihop **FPU** igen.
- 7 Tillsätt 45 µl universal tvättbuffert till varje prov och NTC-brunn på **FPU**.
- 8 Täck filterplattan med locket och centrifugera vid 2 400 × g vid 20 °C i 5 minuter.

**OBS!**

Kontrollera att alla brunnar på filterplattan töms helt. Om tvättbufferten inte töms ut helt ska du centrifugera igen vid 2 400 × g vid 20 °C tills all vätska har försvunnit (5–10 minuter extra).

Förlängningsligerings av bundna oligonukleotider**Förfarande**

- 1 Tillsätt 45 µl förlängningsligeringsblandning till varje prov och NTC-brunn på filterplattan.
- 2 Försegla filterplattan med självhäftande aluminiumfolie och täck sedan med locket.
- 3 Inkubera **FPU** i den förvärmade 37 °C varma inkubatorugnen i 45 minuter utan rotation.
- 4 Medan **FPU** inkuberas ska du förbereda **AMP** (amplifieringsplattan) enligt beskrivningen i följande avsnitt.

PCR-amplifiering

Förberedelser

- 1 Bered färsk 0,05 N NaOH.
- 2 Fastställ vilka indexprimrar som ska användas enligt den tryckta plattlayouten från Local Run Manager.
- 3 Låt PCR-masterblandningen och lämpliga indexprimrar nå rumstemperatur. Vortexblanda varje tinat rör som ska blandas och centrifugera sedan rören en kort stund för att samla upp vätskan.
- 4 Ställ ut en ny 96-brunnars PCR-platta (kallas hädanefter **AMP**-platta).
- 5 Tillsätt indexprimrar till **AMP**-plattan enligt ditt arbetsflöde:
 - **Arbetsflödet Germline:**
 - Tillsätt 4 µl av utvalda indexprimrar [A (A501)–H (A508)] till aktuell brunn i en kolumn på **AMP**-plattan.
 - Kassera de ursprungliga vita locken och sätt fast nya vita lock.
 - Tillsätt 4 µl av utvalda indexprimrar [1 (A701)–12 (A712)] till aktuell rad på **AMP**-plattan. *Spetsarna måste bytas efter varje rad för att undvika korskontaminering mellan index.*
 - Kassera de ursprungliga orange locken och sätt fast nya orange lock.
 - **Arbetsflödet Somatic:**
 - Tillsätt 9 µl av utvalda indexprimrar [A (A501)–H (A508)] till aktuell brunn i en kolumn på **AMP**-plattan.
 - Kassera de ursprungliga vita locken och sätt fast nya vita lock.
 - Tillsätt 9 µl av utvalda indexprimrar [1 (A701)–12 (A712)] till aktuell rad på **AMP**-plattan. *Spetsarna måste bytas efter varje rad för att undvika korskontaminering mellan index.*
 - Kassera de ursprungliga orange locken och sätt fast nya orange lock.
- 6 Förbered PCR-arbetslösningen bestående av PCR-masterblandning/PCR-polymeras enligt följande:
 - a För 96 bibliotek, tillsätt 56 µl av PCR-polymeras till 2,8 ml PCR-masterblandning. I kvoten mellan PCR-masterblandning och PCR-polymeras ingår redan dödvolymer.
 - b Vänd den förberedda PCR-arbetslösningen upp och ner 20 gånger för att blanda den.
 - c PCR-arbetslösningen är stabil vid rumstemperatur i 10 minuter.

Förfarande

- 1 Ta ut **FPU** ur inkubatorn.
- 2 Ta loss aluminiumfolieförseglingen. Täck filterplattan med locket och centrifugera vid 2 400 × g vid 20 °C i 2 minuter.
- 3 Tillsätt 25 µl av 0,05 N NaOH till varje prov och NTC-brunn på filterplattan. Pipettera NaOH upp och ned 5–6 gånger.
- 4 Täck och inkubera filterplattan i rumstemperatur i 5 minuter för att eluera biblioteken.
- 5 När filterplattan inkuberas ska du föra över 22 µl av PCR-arbetslösningen till varje brunn på **AMP**-plattan som innehåller indexprimrar.
- 6 För över prover som eluerats från filtret till **AMP**-plattan så här:
 - a Var noga med att inte sticka hål på filtermembranet och pipettera försiktigt proverna upp och ned 5–6 gånger med en P20-pipett inställd på 20 µl.
 - b För över 20 µl från filterplattan till motsvarande brunnar på **AMP**-plattan.
 - c Pipettera försiktigt upp och ned 5–6 gånger för att blanda DNA med PCR arbetslösningen ordentligt.
 - d För över återstående reaktionsbrunnar från filterplattan till **AMP**-plattan på liknande sätt. *Spetsarna måste bytas efter varje överföring för att undvika korskontaminering mellan index och prover.*
- 7 Försegla **AMP**-plattan och fixera med en förseglingsrulle eller kil.
- 8 Centrifugera vid 1 000 × g vid 20 °C i 1 minut.
- 9 Flytta **AMP**-plattan till området för post-amplifiering.

- 10 Utför PCR baserat på ditt arbetsflöde med hjälp av följande termocyklerprogram med det uppvärmda locket på:
- **Arbetsflödet Germline:**
 - 95 °C i 3 minuter
 - Sedan 28 cykler av:
 - 95 °C i 30 sekunder
 - 66 °C i 30 sekunder
 - 72 °C i 60 sekunder
 - 72 °C i 5 minuter
 - Håll vid 10 °C
 - **Arbetsflödet Somatic:**
 - 95 °C i 3 minuter
 - Sedan 32 cykler av:
 - 95 °C i 30 sekunder
 - 66 °C i 30 sekunder
 - 72 °C i 60 sekunder
 - 72 °C i 5 minuter
 - Håll vid 10 °C



SÄKER STOPPUNKT

Om du inte fortsätter med PCR-rengöring direkt kan **AMP**-plattan stå kvar i termocykeln över natten, förvaras vid 2 °C till 8 °C upp till 48 timmar eller förvaras vid -25 ° till -15 °C i upp till en vecka.

Kontrollera biblioteksberedning

Förfarande

Kontrollera din biblioteksberedning genom att utföra följande steg.

Arbetsflödet Germline:

Det finns ingen verifiering av biblioteksberedningen i arbetsflödet Germline.

Arbetsflödet Somatic:

- 1 Kombinera 5 µl av amplifierad produkt med 15 µl vatten och DNA-laddningsfärg, vid behov.
- 2 Kör på en 2–4 % TBE-agarosgel med en stege med 50–100 baspar för att bekräfta närvaro av och ljusstyrkan hos biblioteksprodukten (produktstorleken är panelberoende).
 - Prover som visar amplifiering i en eller båda oligopoolerna betraktas som giltiga och kan bearbetas under resten av arbetsflödet.
 - Prover som visar liten eller ingen amplifiering i en eller båda oligopoolerna betraktas som ogiltiga och bör inte bearbetas under resten av arbetsflödet.
 - Om ett ogiltigt gelresultat observeras måste biblioteksberedningen för det eller de proverna upprepas från [Hybridisering av oligonukleotidpool \(Pre-amplifiering\)](#).
 - Om inga band observeras på gelen under den upprepade körningen ska du kontrollera provkvaliteten eller oligopanelens utformning.
 - Om det tomma NTC-provet visar amplifiering i oligopool A och/eller B tyder det på kontaminering.

PCR-rengöring

Förberedelser

- 1 Se till att PCR-rengöringspärlorna når rumstemperatur.
- 2 Bered ny 80-procentig etanol från absolut etanol.

Förfarande

- 1 Centrifugera **AMP**-plattan vid 1 000 × g vid 20 °C i 1 minut.
- 2 Ställ ut en ny MIDI-platta (kallas hädanefter **CLP**-platta).
- 3 Vänd PCR-rengöringspärlorna upp och ned tio gånger. Vortexblanda kraftfullt och vänd sedan upp och ned tio gånger till. Kontrollera lösningen visuellt för att säkerställa att pärlorna är återsuspenderade.



OBS!

PCR-rengöringspärlor är mycket viskösa och kräver extra försiktighet vid pipettering. För att undvika alltför stor reagensförlust ska du långsamt aspirera och långsamt dispensera pärlvolymen och visuellt kontrollera att alla pärlor har dispenserats från pipettspetsarna innan spetsarna tas loss. Aspirera rätt volym och dispensera utan att blanda pipetten eller förfukta pipettspetsarna.

- 4 Tillsätt PCR-rengöringspärlor till **CLP**-plattan i följande steg, beroende på arbetsflöde:
 - **Arbetsflödet Germline:**
 - Tillsätt långsamt 45 µl PCR-rengöringspärlor till varje brunn på **CLP**-plattan.
 - För över hela PCR-produkten från **AMP**-plattan till **CLP**-plattan (ca 50 µl).
 - **Arbetsflödet Somatic:**
 - Tillsätt långsamt 55 µl PCR-rengöringspärlor till varje brunn på **CLP**-plattan.
 - För över hela PCR-produkten från **AMP**-plattan till **CLP**-plattan (ca 60 µl).
- 5 Försegla **CLP**-plattan och skaka den i en skakapparat för mikroplattor vid 1 800 varv/min i 2 minuter.
- 6 Inkubera vid rumstemperatur utan att skaka i 10 minuter.
- 7 Placera plattan på ett magnetiskt stativ i minst 2 minuter eller tills supernatanten är klar.
- 8 Låt **CLP**-plattan stå på det magnetiska stativet och avlägsna och kassera försiktigt supernatanten.
- 9 Låt **CLP**-plattan stå på det magnetiska stativet och tvätta pärlorna på följande sätt:
 - a Tillsätt 200 µl av nyberedd 80 % etanol till varje provbrunn.
 - b Inkubera plattan på det magnetiska stativet i minst 30 sekunder eller tills supernatanten är klar.
 - c Avlägsna och kassera försiktigt supernatanten.
- 10 Upprepa tvättningen enligt beskrivningen i föregående steg.
- 11 Använd en flerkanalig P20-pipett inställd på 20 µl för att avlägsna etanolöverskott.
- 12 Ta bort **CLP**-plattan från det magnetiska stativet och lufttorka pärlorna i 5 minuter.
- 13 Tillsätt försiktigt 30 µl av elueringsbuffert till pärlorna och vortexblanda sedan en kort stund.



OBS!

Elueringsbufferten är trögflytande och kräver långsam aspirering och dispensering av volymer.

- 14 Försegla **CLP**-plattan med Microseal "B" och en förseglingrulle eller kil och skaka sedan på en skakapparat för mikroplattor vid 1 800 varv/min i 5 minuter. Skaka och kontrollera om proverna har återsuspenderats. Om en strängpellet fortfarande syns i vissa brunnar ska du använda en P200-pipett inställd på 30 µl för att återsuspendera varje enskild pärlpellet. Kontrollera spetsarna visuellt för att se att pärlorna har dispenserats tillbaka i brunnarna innan du matar ut spetsarna. Försegla **CLP**-plattan igen och skaka den i en skakapparat för mikroplattor vid 1 800 varv/min i ytterligare 5 minuter.
- 15 Inkubera vid rumstemperatur under 2 minuter.
- 16 Ställ **CLP**-plattan på det magnetiska stativet i minst 2 minuter eller tills supernatanten är klar.
- 17 Ställ ut en ny MIDI-platta (kallas hädanefter **LNP**-platta).
- 18 För över 20 µl av supernatanten från **CLP**-plattan till **LNP**-plattan.
- 19 För försiktigt över 20 µl supernatant från **CLP**-plattan till **LNP**-plattan.
- 20 Försegla **LNP**-plattan med en självhäftande plattförsegling och centrifugera sedan vid 1 000 × g vid 20 °C i 1 minut för att säkerställa att all supernatant ligger längst nere i brunnen.
- 21 [Valfritt] För över återstående 10 µl supernatant från **CLP**-plattan till en ny platta och märk plattan med körningsnamn och datum. Förvara denna platta vid -25 °C till -15 °C till sekvenseringskörningen och dataanalysen har slutförts.
De rengjorda PCR-produkterna kan användas för felsökning vid eventuella provfel.

**SÄKERSTOPPUNKT**

Om du avslutar vid denna punkt ska du försegla LNP-plattan och centrifugera vid 1 000 × g vid 20 °C i 1 minut. Plattan är stabil i upp till 3 timmar vid 2 °C till 8 °C eller -25 °C till -15 °C i upp till en vecka.

Normalisering av bibliotek**Förberedelser**

- 1 Bered färsk 0,1 N NaOH.
- 2 Se till att spädningsvätskan för normalisering av bibliotek, bibliotekspärlorna och normaliseringstvätten för bibliotek når rumstemperatur.
- 3 Avlägsna lagringsbufferten för bibliotek från förvaring i rumstemperatur och ställ den åt sidan.
- 4 Vortexblanda spädningsvätskan för normalisering av bibliotek kraftigt och kontrollera att alla fällningar har lösts upp.
- 5 Vortexblanda bibliotekspärlorna kraftigt i 1 minut och vänd upp och ner tills pärlorna är återsuspenderade och inga pellets finns kvar längst ned i röret när röret vänds upp och ner.

Förfarande

- 1 Blanda spädningsvätskan för normalisering av bibliotek och bibliotekspärlorna i ett nytt 15 ml koniskt rör (använd ett nytt 1,5 ml rör om du bearbetar < 24 prover) enligt följande:
 - a För 96 prover, tillsätt 4,4 ml spädningsvätska för normalisering av bibliotek.
 - b Återsuspendera bibliotekspärlorna: vortexblanda bibliotekspärlorna kraftigt i 1 minut och vänd röret upp och ned då och då. Använd en P1000 inställd på 1 000 µl för att helt återsuspendera bibliotekspärlorna genom att långsamt pipettera upp och ned minst tio gånger, tills ingen pellet syns i botten av röret när röret vänds upp och ned.

**FÖRSIKTIGHET!**

Återsuspendera bibliotekspärlornas pellet i botten av röret helt. Genom att använda en P1000 säkerställer du att pärlorna återsuspenderas på ett homogent sätt och att det inte förekommer någon pärlmassa i botten av röret. Det är viktigt att återsuspendera pärlorna för att uppnå en konsekvent klusterdensitet i flödescellen.

**FÖRSIKTIGHET!**

Bibliotekspärlor är mycket viskösa och kräver extra försiktighet vid pipettering. För att undvika alltför stor reagensförlust ska du långsamt aspirera och långsamt dispensera pärlvolymen och visuellt kontrollera att alla pärlor har dispenserats från pipettspetsarna innan spetsarna tas loss.

- c För 96 bibliotek ska du pipettera 800 µl bibliotekspärlor till röret som innehåller spädningsvätska för normalisering av bibliotek. För färre bibliotek är förhållandet 7,2 µl bibliotekspärlor till 37,8 µl spädningsvätska för normalisering av bibliotek per bibliotek. Inkludera dödvolum för pipetteringsfel.
 - d Blanda genom att vända röret 15–20 gånger.
- 2 Tillsätt 45 µl av den kombinerade arbetslösningen med spädningsvätska för normalisering av bibliotek/bibliotekspärlor till varje brunn på LNP-plattan som innehåller bibliotek.
- 3 Försegla LNP-plattan med Microseal "B" och en förseglingsrulle eller kil och skaka sedan på en skakapparat för mikroplattor vid 1 800 varv/min i 30 minuter.

**OBS!**

Om du fortsätter med sekvensering på samma dag är det dags att börja tina upp reagenspatronen. Följ anvisningarna i tillämpligt instruments bipacksedel för att tina upp reagenspatronen.

- 4 Placera plattan på ett magnetiskt stativ i minst 2 minuter eller tills supernatanten är klar.
- 5 Medan LNP-plattan står på det magnetiska stativet ska du avlägsna förseglingen och sedan försiktigt ta bort och kassera supernatanten.
- 6 Ta bort LNP-plattan från det magnetiska stativet och tvätta pärlorna med normaliseringstvätt för bibliotek enligt följande:
 - a Tillsätt 45 µl normaliseringstvätt för bibliotek till pärlorna på LNP-plattan.
 - b Försegla LNP-plattan med Microseal "B" och en förseglingsrulle eller kil och skaka sedan på en skakapparat för mikroplattor vid 1 800 varv/min i 5 minuter.

- c Ställ LNP-plattan på det magnetiska stativet i minst 2 minuter eller tills supernatanten är klar.
- d Avlägsna och kassera all supernatant.
- 7 Upprepa proceduren för normaliseringstvätt för bibliotek enligt beskrivningen i föregående steg.
- 8 Försegla LNP-plattan med en självhäftande plattförsegling.
- 9 Centrifugera LNP-plattan vid $1\ 000 \times g$ vid $20\ ^\circ\text{C}$ i 30 sekunder för att samla in resterande tvättbuffert.
- 10 Ställ LNP-plattan på det magnetiska stativet i 2 minuter.
- 11 Använd en flerkanalig P20-pipett inställd på $20\ \mu\text{l}$ för att försiktigt ta bort överflödigt normaliseringstvätt för bibliotek. Rubba inte pärlorna.
- 12 Ta bort LNP-plattan från det magnetiska stativet och tillsätt $30\ \mu\text{l}$ $0,1\ \text{N}$ NaOH i varje brunn.
- 13 Försegla LNP-plattan med Microseal "B" och en förseglingrulle eller kil och skaka sedan på en skakapparat för mikropettor vid $1\ 800$ varv/min i 5 minuter.
- 14 Under den 5 minuter långa elueringen ska du ställa fram en ny 96-brunnars PCR-platta (kallas härnäst **SGP-platta**).
- 15 Tillsätt $30\ \mu\text{l}$ lagringsbuffert för bibliotek till varje brunn som ska användas på **SGP-plattan**.
- 16 Säkerställ att alla pärlor på LNP-plattan är återsuspenderade efter den 5 minuter långa elueringen. Om pärlorna inte är helt återsuspenderade ska du försiktigt pipettera de brunnarna upp och ned eller knacka plattan lätt mot bänken för att återsuspendera pärlorna och därefter skaka i ytterligare 5 minuter.
- 17 Ställ LNP-plattan på det magnetiska stativet i minst 2 minuter.
- 18 För långsamt över supernatant (cirka $30\ \mu\text{l}$) från LNP-plattan till **SGP-plattan**. Pipettera försiktigt upp och ned fem gånger för att blanda. Använd nya spetsar vid varje överföring.
- 19 Försegla **SGP-plattan** och centrifugera sedan vid $1\ 000 \times g$ vid $20\ ^\circ\text{C}$ i 1 minut. Fortsätt omedelbart till *Bibliotekspoolning*. Kassera LNP-plattan.

Förberedelser för bibliotekssekvensering

Förberedelser

- 1 Ställ in ett värmeblock som passar för $1,5\ \text{ml}$ centrifugeringsrör på $96\ ^\circ\text{C}$.
- 2 Förbered ett isvattenbad i en ishink.
- 3 Ta ut biblioteksspädningsbufferten och PhiX intern kontroll från $-25\ ^\circ\text{C}$ till $-15\ ^\circ\text{C}$ för att de ska tinas.
- 4 När de har tinats upp ska du kyla biblioteksspädningsbufferten och PhiX intern kontroll i isvattenbadet.
- 5 Vortexblanda biblioteksspädningsbufferten, centrifugera en kort stund och se till att alla fällningar har lösts upp helt.

Denaturera och späd PhiX intern kontroll

PhiX intern kontroll levereras i $10\ \text{nM}$ och måste denatureras till enkelsträngat DNA och spädas till $20\ \text{pM}$ före användning. Följande anvisningar ger $1\ \text{ml}$ av denaturerad $20\ \text{pM}$ PhiX intern kontroll, vilket räcker till flera DAL:er (> 20).

- 1 Förbered $0,1\ \text{N}$ NaOH.
- 2 Vänd röret flera gånger för att blanda.



FÖRSIKTIGHET!

Det är viktigt att använda nyligen utspädd NaOH för att helt denaturera prover för klustergenerering på sekvenseraren.



TIPS

Om PhiX förbereds samma dag som normaliseringen av biblioteket kan samma sats av $0,1\ \text{N}$ NaOH användas.

- 3 Kombinera följande volymer för att späda ut PhiX intern kontroll-biblioteket till $2\ \text{nM}$:
 - $2\ \mu\text{l}$ av $10\ \text{nM}$ PhiX intern kontroll-bibliotek
 - $8\ \mu\text{l}$ av 1X TE-buffert
- 4 Kombinera följande volymer för att få ett $1\ \text{nM}$ PhiX intern kontroll-bibliotek:
 - $10\ \mu\text{l}$ av $2\ \text{nM}$ PhiX intern kontroll-bibliotek
 - $10\ \mu\text{l}$ av $0,1\ \text{N}$ NaOH

- 5 Vortexblanda en kort stund för att blanda 1 nM PhiX intern kontroll-bibliotekslösningen.
- 6 Centrifugera 1 nM PhiX intern kontroll-bibliotekslösningen en kort stund för att samla in innehåll.
- 7 Inkubera i 5 minuter vid rumstemperatur för att denaturera PhiX intern kontroll-bibliotekslösningen till enkelsträngat DNA.
- 8 Tillsätt 980 µl förkyld biblioteksspädningsbuffert till röret som innehåller det denaturerade PhiX intern kontroll-biblioteket. Den slutliga koncentrationen är 20 pM denaturerat PhiX intern kontroll-bibliotek.

**TIPS**

Det denaturerade 20pM PhiX intern kontroll-biblioteket kan lagras i upp till tre veckor vid -25 °C till -15 °C som alikvoter för engångsbruk.

Bibliotekspooling

- 1 Vortexblanda biblioteksspädningsbufferten och se till att alla fällningar har lösts upp helt.
- 2 Centrifugera en kort stund för att samla in innehåll.
- 3 Ställ fram ett nytt rör med skruvlock (kallas hädanefter **PAL**-rör [poolat amplikonbibliotek]).
- 4 Bestäm vilka prover som ska poolas för sekvensering. Högst 96 bibliotek kan poolas för sekvensering.
- 5 Ta bort förseglingen från **SGP**-plattan. För över 10 µl av varje bibliotek som ska sekvenseras från **SGP**-plattan till en PCR 8-rörremsa och byt spets varje gång.
- 6 Försegla **SGP**-plattan med en självhäftande plattförsegling och förvara vid -25 °C till -15 °C i upp till 48 timmar.

**TIPS**

SGP-plattan kan användas för att poola färre prover när den initiala sekvenseringens täckning är otillräcklig.

- 7 Kombiner och för över innehållet i PCR 8-rörremsan till **PAL**-röret. Blanda **PAL**-röret nogga.
- 8 Ställ fram tre nya rör med skruvlock (kallas hädanefter **DAL**-rör [utspätt amplikonbibliotek]).
- 9 Tillsätt 585 µl av biblioteksspädningsbuffert till **DAL**-rören.
- 10 För över 5 µl av denaturerat PhiX (20 pM) till varje **DAL**-rör som innehåller biblioteksspädningsbuffert. Pipettera upp och ner 3–5 gånger för att skölja spetsen och säkerställa att överföringen har slutförts.
- 11 För över 10 µl av **PAL** till varje **DAL**-rör. Pipettera upp och ner 3–5 gånger för att skölja spetsen och säkerställa att överföringen har slutförts.
- 12 Vortexblanda **DAL**-rören och centrifugera **DAL**-rören en kort stund för att samla in vätska.

**TIPS**

Beroende på vilket kit som används kan ytterligare biblioteksspädningsbuffert behövas från ett sekvenseringskit med förbrukningsmaterial från Illumina till respektive sekvenseringsinstrument.

**SÄKER STOPPUNKT**

Om du inte fortsätter med sekvensering direkt kan **DAL**-rören förvaras vid -25 °C till -15 °C i upp till 84 dagar.

Förbered för sekvensering med MiSeqDx

- 1 Fortsätt med ett **DAL**-rör för sekvensering.
- 2 Om **DAL**-röret lagrades fryst ska det tinas upp helt.
- 3 Blanda **DAL**-röret genom att vortexblanda det på maximal hastighet.
- 4 Centrifugera **DAL**-röret en kort stund.
- 5 Inkubera **DAL**-röret på ett värmeblock vid 96 °C i 2 minuter.
- 6 Efter inkubationen ska du vända på **DAL**-röret 1–2 gånger för att blanda det och sedan omedelbart sänka ner det i isvattenbadet.
- 7 Håll **DAL**-röret i isvattenbadet i 5 minuter.

**FÖRSIKTIGHET!**

Utför värmedenatureringssteget direkt innan du laddar **DAL**-röret i en reagenspatron för att säkerställa effektiv laddning av mall på flödescellen för sekvensering.

Läs i bipacksedeln till *MiSeqDx-instrumentet* om hur du bereder reagenspatronen, laddar provbibliotek i reagenskassetten och konfigurerar sekvenseringskörningen.

Förbered för sekvensering med NextSeq 550Dx

- 1 Fortsätt med ett **DAL**-rör för sekvensering.
- 2 Ställ fram ett nytt rör med skruvlock (kallas hädanefter **FDT** [slutligt spädningsrör]).
- 3 Om **DAL**-röret lagrades fryst ska det tinas upp helt.
- 4 Blanda **DAL**-röret genom att vortexblanda det på maximal hastighet.
- 5 Centrifugera **DAL**-röret en kort stund.
- 6 För över en aliquot från **DAL** till **FDT**. Vilken **DAL**-volym som behövs för att erhålla rätt klusterdensitet beror på vilken oligopool som använts och varierar vanligtvis mellan 130–160 µl.
- 7 Öka **FDT** till en total volym på 1 300 µl med biblioteksspädningsbuffert.
- 8 Blanda **FDT**-röret genom att vortexblanda det på maximal hastighet.
- 9 Centrifugera **FDT**-röret en kort stund.
- 10 Inkubera **FDT**-röret på ett värmeblock vid 96 °C i 2 minuter.
- 11 Efter inkubationen ska du vända på **FDT**-röret 1–2 gånger för att blanda det och sedan omedelbart sänka ner det i isvattenbadet.
- 12 Håll **FDT**-röret i isvattenbadet i 5 minuter.



FÖRSIKTIGHET!

Utför värmedenatureringssteget direkt innan du laddar **FDT**-röret i en reagenspatron för att säkerställa effektiv laddning av mall på flödescellen för sekvensering.

Läs i bipacksedeln till *NextSeq 550Dx-instrumentet* om hur du bereder reagenspatronen, laddar provbibliotek i reagenskassetten och konfigurerar sekvenseringskörningen.

Kvalitetskontrollprocedurer

Enligt god laboratoriepraxis ingår ett DNA-prov för positiv kontroll och negativ kontroll (ingen mall) i varje användning av en biblioteksberedning. DNA-provet för positiv kontroll ska vara ett väl kartlagt prov med kända varianter i intresseområdet.

För arbetsflödet Somatic ska alla bibliotek (inklusive bibliotek för kontroller) granskas med gel-elektrofores enligt tidigare beskrivning.

Prestandaegenskaper

Germline-studier använde antingen MiSeqDx™ Universal Kit 1.0 (DNA-extrahering och interfererande substanser) eller TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (DNA-inmatning) som biblioteksberedning. De två kätten använder identiska reagenser och har endast en skillnad mellan sina arbetsflöden: antalet polymeraskedjereaktionscykler (PCR) (28 respektive 32). Det ökade antalet PCR-cykler ger en lägre DNA-inmatning med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) jämfört med MiSeqDx Universal Kit 1.0 (250 ng), vilket visar sig i DNA-inmatningsstudien som använder TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Varje studie anger vilka biblioteksberedningsreagenser och förbrukningsmaterial för sekvensering som används, men alla studier återspeglar resultaten för TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, eftersom det är likställt med Universal Kit 1.0.

Vid somatiska studier användes TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Bibliotek som beretts med MiSeqDx Universal Kit 1.0 använde Illuminas version 1 av förbrukningsmaterial för sekvensering som resultatavläsning, medan TruSeq Custom Amplicon Kit Dx använde version 3 av förbrukningsmaterial för sekvensering som avläsning. Sekvensering utfördes på MiSeqDx-instrument. Studier med de tvågens- eller engenspaneler som representativa mutationspaneler använde analys-specifika arbetsflöden och analysmoduler.

Definitioner av beräkningar som används för prestandaegenskaper

- 1 Positiv procentuell överensstämmelse (PPA) beräknas som andelen loci som klassificeras som varianter med hjälp av en referensmetod som rapporteras korrekt i analysen.
 - $(\text{antalet variantloci som rapporteras korrekt i analysen}) / (\text{totalt antal variantloci})$
 Variantloci som rapporteras i analysen och som är samstämmiga med referensmetoden är sant positiva resultat

- (TP). Variantloci som rapporteras som referensbestämningar eller som andra variantbestämningar i analysen är falskt negativa resultat (FN).
- 2 Negativ procentuell överensstämmelse (NPA, negative percent agreement) beräknas som andelen loci som klassificeras som vildtyp med hjälp av en referensmetod som rapporteras korrekt i analysen.
 - $(\text{antalet vildtypsloci som rapporteras korrekt i analysen}) / (\text{totalt antal vildtypsloci})$
Vildtypsloci som rapporteras i analysen och som är samstämmiga med referensmetoden är sant negativa resultat (NP). Vildtypsloci som rapporteras som varianter i analysen är falskt positiva resultat (FP).
 - 3 Total procentuell överensstämmelse (OPA) beräknas som andelen loci som rapporteras korrekt i analysen i förhållande till en referensmetod.
 - $((\text{antalet variantloci som rapporteras korrekt i analysen}) + (\text{antalet vildtypsloci som rapporteras korrekt i analysen})) / ((\text{totalt antal variantloci}) + (\text{totalt antal vildtypsloci}))$
 - 4 Beräkningarna av PPA, NPA och OPA innefattar inte saknade bestämningar (variant- eller referensloci som inte uppfyller kriterierna i ett eller flera kvalitetsfilter). Två undersökningar innefattar uttryckligen saknade bestämningar i måttet "% korrekta bestämningar" och denna inkludering av saknade bestämningar antecknas för aktuella tabeller.
 - 5 Bestämningsfrekvensen beräknas som totalt antal loci som passerar filtren, delat med totalt antal positioner som sekvenserats eller rapporterats. Det här värdet tar inte hänsyn till bestämningarnas överensstämmelse med referensmetoden.

Provöverföring

Både arbetsflödet Germline och Somatic omfattar biblioteksberedning och sekvensering av flera prover plus kontroller som alla bearbetas på samma gång. Studien av överföring mellan prover utfördes för att utvärdera om falskt positiva resultat, som orsakats av kontaminering och överföring från brunn till brunn under användning av en biblioteksberedning eller kontaminering mellan på varandra följande sekvenseringskörningar, kunde påverka testresultaten. Somatiska varianter användes eftersom de kan detekteras vid lägre allelfrekvenser än Germline-varianterna.

Proverna bestod av fyra genomiska DNA-prover från cellinjer, där var och en innehöll olika panelmutationer på en tvågenspanel. Proverna var sådana att en mutation på en position i ett prov hade en referenssekvens (vild typ) i den andra.

Överföring mellan brunnar definieras som ett fel som eventuellt uppstått på grund av manuella bearbetningssteg (pipettering, förväxlade prover och så vidare). För att utvärdera överföring från en provbrunn till en annan utfördes två testkörningar:

- Ett schackrutigt mönster för ett genomiskt DNA-prov med hög inmatning som innehöll en mutation i Gen 1, alternerat med ett genomiskt DNA-prov med låg inmatning som innehöll en mutation i Gen 2.
- Ett schackrutigt mönster för ett genomiskt DNA-prov med hög inmatning som innehöll en mutation i Gen 2, alternerat med ett genomiskt DNA-prov med låg inmatning som innehöll en mutation i Gen 1.

Vid varje körning uppvisade totalt 12 replikat falskt positiva resultat (t.ex. att en Gen 1-mutation rapporterades i en brunn som angetts som prov med Gen 2-mutation eller vice versa).

Överföring mellan körningar definieras som ett fel som eventuellt uppstått på grund av kvarvarande rester från en tidigare sekvenseringskörning. För att avgöra om det förekommer överföring mellan sekvenseringskörningar förbereddes två plattor vardera som innehöll elva replikat av ett enda unikt prov av genomiskt DNA med hög inmatning. Dessa plattor sekvenserades därefter i ett MiSeqDx-instrument och kontrollerades med avseende på falskt positiva resultat. Första körningen innehöll elva replikat av ett prov med en Gen 2-mutant plus ett tomt prov. Andra körningen innehöll elva replikat av ett prov med en Gen 1-mutant plus ett tomt prov. Provbiblioteket med Gen 2-mutanten sekvenserades först och följdes av en sekvenseringskörning av provbiblioteket med Gen 1-mutanten, följt av ännu en upprepad sekvenseringskörning av provbiblioteket med Gen 2-mutanten. Om några Gen 2-mutationer observeras i en körning med enbart Gen 1-mutationer, och vice versa, indikerar denna observation överföring mellan körningarna.

Inga falskt positiva resultat (0/24, 0 %) på grund av överföring från brunn till brunn rapporterades. Alla förväntade mutationer upptäcktes. Inga falskt positiva resultat (0/24, 0 %) på grund av överföring från körning till körning

rapporterades. Alla förväntade mutationer upptäcktes. Inga falskt positiva resultat (0/48, 0 %) på grund av *sammanlagd* överföring (från brunn till brunn och från körning till körning) rapporterades.

Prestandaegenskaper för Germline

DNA-inmatningsstudien använde en 23-kromosomspanel som representativ mutationspanel. De andra studierna använde en enkel genpanel som representativ mutationspanel.

DNA-extrahering

Tre olika extraheringsmetoder (magnetisk kuleextrahering, fällning med alkohol och isolering med kiseldioxidfilterkolonn) utvärderades med K₂EDTA antikoagulerat helblod. Biblioteksberedningen slutfördes med hjälp av MiSeqDx Universal Kit 1.0. Fjorton (14) unika blodprover användes i studien och representerar en mängd olika genotyper från en engspanel. De tre metoderna för DNA-extrahering testades oberoende av två olika operatörer som var och en utförde tre sekvenseringskörningar per extraheringsmetod. Varje extrahering utfördes av respektive operatör på olika dagar. DNA-koncentrationen och A260/A280-kvoten för de extraherade gDNA-proverna bestämdes med hjälp av spektrofotometri. Den totala provstorleken för varje extraheringsmetod i denna studie var 168 (14 prover x 2 operatörer/extraheringsmetod x 3 körningar/operatör x 2 replikat/extraherade gDNA-prov). Resultaten för varje metod redovisas i [Tabell 11](#).

Tabell 11 Exakthet, bestämningsfrekvens och godkännandefrekvens i första omgången efter extraheringsmetod

Extraheringsmetod	Antal testade prover	Bestämningsfrekvens	Noggrannhet ¹	Godkännandefrekvens i första omgången ²
Fällning med alkohol	168	100 %	100 %	100 %
Isolering med kiseldioxidfilterkolonn	168	100 %	100 %	100 %
Magnetisk kuleextrahering	168	100 %	100 %	100 %

¹Exakthet – Den procentuella överensstämmelsen med en referenstestmetod (dubbelriktad sekvensering av Sanger) beräknas för de baspositioner som får en basbestämning.

²Godkännandefrekvens i första omgången – Antalet prover som uppfyller den angivna bestämningsfrekvensen första gången de behandlas (dvs. utan att behöva köras igen eller bearbetas ytterligare) uttrycks som procentandel av det totala antalet prov som körts under ett enskilda MiSeqDx-sekvenseringsexperiment.

DNA-inmatning

DNA-inmatningsintervallet för biblioteksberedningen (TruSeq Custom Amplicon Kit Dx) utvärderades genom att utföra en seriespänningsstudie med 13 DNA-prover och en representativ analys som utformats för att undersöka olika gener som täcker 12 588 baser i 23 olika kromosomer. MiSeqDx reagenskit v3 användes som sekvenseringsavläsning.

Varje prov testades i duplikat vid 5 DNA-inmatningsnivåer från 250 ng till 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng och 12 ng). För bestämning av exakthet jämfördes provernas genotyper med Platinum Genome-versionen 2016-01. Resultaten fastställdes för varje inmatningsnivå. PPA för varje varianttyp (deletioner, insertioner och SNV:er) presenteras i [Tabell 12](#). NPA presenteras i [Tabell 13](#). Alla inmatningsnivåer hade liknande noggrannhet. Den rekommenderade DNA-inmatningen är 50 ng, med 25 ng och 100 ng som ger en undre respektive övre gräns för att uppfylla kraven på exakthet.

Tabell 12 PPA-resultat för varje DNA-inmatning, efter varianttyp

DNA-inmatning (ng)	Variant-typ	Förväntade varianter	Total TP	Total FN	Variant Saknade bestämningar	PPA (%)
12	Deletion	552	534	3	15	99,4
25			541	0	11	100
50			542	0	10	100
100			542	0	10	100
250			542	0	10	100
12	Insertion	588	569	0	19	100
25			572	0	16	100
50			572	0	16	100
100			572	0	16	100
250			572	0	16	100
12	SNV	1 752	1 725	2	25	99,9
25			1 739	3	10	99,8
50			1 742	0	10	100
100			1 740	0	12	100
250			1 735	0	17	100

Tabell 13 NPA för varje DNA-inmatning

DNA-inmatning (ng)	Förväntade varianter	TN	FP	Ref Saknade bestämningar	NPA (%)
12	2 892	307 179	0	3 935	100
25	2 892	309 767	0	1 347	100
50	2 892	309 999	0	1 115	100
100	2 892	309 754	0	1 360	100
250	2 892	308 922	0	2 192	100

Interfererande substanser

För att bedöma effekten av interfererande substanser på biblioteksberedningen utvärderades en representativ analys som utformats för att undersöka en enskild gen som täcker 11 529 baser vid närvaro och frånvaro av potentiella interfererande substanser. Biblioteksberedningen slutfördes med hjälp av Universal Kit 1.0. Åtta (8) helblodsprover som representerar åtta unika genotyper användes i studien. Fyra endogena interfererande substanser (bilirubin, kolesterol, hemoglobin och triglycerid) testades genom att man tillsatte dem i blodprover innan DNA extraherades. För att bedöma interferensen från blodtagningen (kort tagning) tillsattes EDTA i blodproverna i två koncentrationer. Koncentrationsgränserna för varje substans visas i [Tabell 14](#). För att bedöma interferensen från provberedningen tillsattes också 15 % tvättbuffert till åtta prover med renat genomiskt DNA. Engenspanelen användes. En 100 % bestämningsfrekvens uppnåddes för alla testade prover utöver 100 % reproducerbarhet i genotypbestämningar i närvaro och frånvaro av interfererande substanser.

Tabell 14 Bestämningsfrekvens varje testsubstans

Testämne	Totalt antal replikat	Koncentration som testats i blod (övre gräns)	Koncentration som testats i blod (nedre gräns)	Bestämningsfrekvens
Bilirubin	16	684 µmol/l	137 µmol/l	100 %
Kolesterol	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100 %
Hemoglobin	16	2 g/l	0,4 g/l	100 %
Triglycerid	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100 %
EDTA	16	7 mg/ml	2,8 mg/ml	100 %

Prestandaegenskaper för Somatic

DNA-inmatningsstudien använde en 26-genspanel som representativ mutationspanel. De andra studierna använde en 2-genspanel som representativ mutationspanel.

DNA-inmatning

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx för FFPE QC användes för att utvärdera en uppsättning DNA-prover som extraherats från FFPE-prover som består av nio olika vävnader. För FFPE QC uppmättes ett Cq-värde för varje prov och jämfördes med en kontroll för att beräkna Δ Cq-värden som varierade från -1,2-6,4. Proverna späddes 1:8, 1:4, 1:2 eller behandlades rena enligt kittets anvisningar. Vissa prover späddes ytterligare (upp till 1:64) för att öka deras Δ Cq-värden. Två prover vilkas Δ Cq-värden krävde spädning på 1:8 behandlades också utan spädning för att testa inmatningar som var högre än det rekommenderade. Alla spädningar bearbetades via biblioteksberedning och sekvenserades. Variantbestämningar från den somatiska variantmodulen jämfördes med dubbelriktad Sanger-sekvensering som utförts på specifika genmål beroende på aktuell vävnadstyp. Spädningar grupperades i ett av fyra Δ Cq-intervall och analyserades för exakthet och saknade bestämningar (Tabell 15). Den övre inmatningsgränsen är ett Δ Cq på 2 som uppnås genom upprepade utspädningar av prover med inmatning på $<\Delta$ Cq på 2 enligt kittets anvisningar. Den undre gränsen för inmatning är Δ Cq på 4. Δ Cq-värden mellan 2 och 4 uppnår samma exakthet. Analyser med Δ Cq för att bedöma FFPE-prover ska fastställa nödvändig cutoff för att uppnå önskad exakthet och precision.

Tabell 15 Noggrannhet och saknade bestämningar efter Δ Cq-grupp

Δ Cq-grupp	Varianter				Vildtypspositioner				
	Förväntad	TP	FN	Saknade bestämningar	PPA	TN	FP	Saknade bestämningar	NPA
Δ Cqs -1,2 och -0,8	1	1	0	0	100	1 387	1	0	99,9
Δ Cqs 1,5-4	19	18	0	1	100	14 358	1	78	99,9
Δ Cqs ~4	19	18	0	1	100	14 333	1	103	99,9
Δ Cqs ~5	22	20	2	0	90,9	15 878	1	439	99,9

Extrahering

En studie av dataextraheringsmetoder utfördes för att bedöma effekten på biblioteksberedningens resultat av tre kommersiellt tillgängliga extraheringskit. Kitten använde kolonner för extrahering och omfattade reagenser för avparaffinering och för att delvis upphäva formalinets tvärbindingar, något som är specifikt för FFPE-vävnad. Metoderna ändrades genom fördubbling av mängden proteinas K och nedbrytning genom inkubation över natten med omrörning. DNA eluerades på lägsta rekommenderade volym för ett specifikt kit eller minst 30 µl. Tio (10) prover testades i duplikat för varje extraheringskit. Alla replikat (20/20) testas och varje kit uppfyllde analysens specifikationer för kvalitetskontroll. En representativ tvågensanalys användes. PPA var 100 % (16/16) och NPA var 100 % (1104/1104) för varje kit. Sanger-sekvensering användes som referensmetod.

Interfererande substanser

En studie om interfererande substanser genomfördes för att bedöma effekten av potentiellt interfererande substanser på biblioteksberedningen. Analysresultaten utvärderades i närvaro av exogena substanser (paraffinvax, xylen, etanol och proteinas K, extraheringslösningar) samt endogena substanser (nekrotisk vävnad och hemoglobin).

Exogena substanser

De exogena substanser som har testats är extraheringslösningar som vanligtvis används under DNA-extraheringsprocessen och anges med testade mängder i [Tabell 16](#). Femton (15) kolorektala FFPE-prover testades per interfererande substans och jämfördes med de obehandlade kontrollerna. Proverna representerade vildtyspsprover som inte innehöll några Gen 1-panelmutationer (5/15 prover), liksom prover som innehöll prevalenta mutationer (10/15 prover). Proverna sekvenserades vid maximal multiplexningsnivå på tio prover plus kontroller för varje körning.

Tabell 16 Substanser som analyserats

Interfererande substans	Faktisk mängd [µl/25 µl eluat]
Avparaffiniseringslösning	$1,69 \times 10^{-04}$
Paraffinvax (i xylen)	$2,50 \times 10^{-05}$
Xylen	$2,50 \times 10^{-05}$
Etanol	$1,69 \times 10^{-04}$
Proteinas K ¹	$3,30 \times 10^{-06}$
Tvättlösning ²	$6,25 \times 10^{-01}$
1 X tvättlösning ³	$6,25 \times 10^{-01}$
Tvättbuffert AW1 ¹	$6,25 \times 10^{-02}$
Tvättbuffert AW2 ¹	$6,25 \times 10^{-01}$

¹⁻³Tre kolonnbase DNA-isoleringskit som finns i handeln.

För alla exogena substanser som testats klarade alla 15 prover kvalificeringskravet (15/15, 100 % godkännandefrekvens i första omgången i kvalitetskontrollen) och visade ett giltigt resultat efter biblioteksberedning och sekvensering (15/15, 100 % godkännandefrekvens i första omgången).

PPA beräknas per prov. OPA och NPA beräknas per mutation på DNA-nivå. Det finns 56 mutationer per prov på DNA-nivå. Alla 15 prover för alla 9 exogena substanser överensstämde med det obehandlade kontrollvillkoret vid alla mutations- (10/10) och ickemutationspositioner (830/830). Ingen av de potentiellt interfererande substanserna som utvärderades vid de maxkoncentrationer som förväntades i processen med extrahering av genomiskt DNA (gDNA) från FFPE-vävnad påverkar resultatet av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Endogena substanser (hemoglobin)

Femton (15) kolorektala FFPE-prover testades vart och ett i närvaro eller frånvaro av 2 mg/ml hemoglobin, en CLSI "hög" mängd hemoglobin. Proverna representerade vildtypsprover som inte innehöll några representativa panelmutationer (5/15 prover) samt prover som innehöll prevalenta representativa panelmutationer (10/15 prover). Proverna sekvenserades vid maximal multiplexningsnivå på tio prover plus kontroller för varje körning. Alla 15 prover klarade kvalificeringskravet (15/15, 100 % godkännandefrekvens i första omgången i kvalitetskontrollen) och visade ett giltigt resultat efter biblioteksberedning och sekvensering (15/15, 100 % godkännandefrekvens i första omgången). Alla 15 prover överensstämde på alla mutations- (10/10) och ickemutationspositioner (830/830) med det obehandlade kontrollvillkoret. Koncentrationen av testat hemoglobin påverkar inte resultatet av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Endogena substanser (nekrotiska)

Femton (15) kolorektala FFPE-vildtypsprover som inte innehöll några panelmutationer (10/15 prover) samt prover som innehöll prevalenta representativa panelmutationer (5/15 prover) och 10–80 % nekrotisk vävnad, vilket fastställdes vid patologisk granskning, användes för utvärdering av endogena nekrotiska prover. Prover sekvenserades vid maximal multiplexningsnivå på tio prover plus kontroller för varje körning. 14/15 prover gav ett giltigt resultat efter biblioteksberedning och sekvensering (93,3 % godkännandefrekvens i första omgången). Den allmänna procentuella överensstämmelsen var 99,9 % (783/784) i förhållande till Sanger-sekvensering. PPA var 100 % (4/4) och NPA var 99,87 % (779/780). Det enda falskt positiva resultatet berodde troligen på en provmutationsfrekvens under detekteringsgränsen för Sanger-sekvensering. Sammantaget uppfyller TruSeq Custom Amplicon Kit Dx prestandaegenskaperna med vävnad som innehåller 10–80 procent nekros.

Patent och varumärken

Dokumentet och dess innehåll tillhör Illumina, Inc. och dess dotterbolag ("Illumina") och är endast avsett för användning enligt avtal i samband med kundens bruk av produkterna som beskrivs häri. Allt annat bruk är förbjudet. Dokumentet och dess innehåll får ej användas eller distribueras i något annat syfte och/eller återges, delges eller reproduceras på något vis utan föregående skriftligt tillstånd från Illumina. I och med detta dokument överlåter Illumina inte någon licens som hör till dess patent, varumärke eller upphovsrätt, eller i enlighet med rättspraxis eller liknande tredjepartsrättigheter.

Instruktionerna i detta dokument ska följas till punkt och pricka av kvalificerad och lämpligt utbildad personal för att säkerställa rätt och säker produktanvändning i enlighet med beskrivning häri. Hela innehållet i dokumentet ska läsas och förstås i sin helhet innan produkten (produkterna) används.

UNDERLÅTENHET ATT LÄSA OCH FÖLJA ALLA INSTRUKTIONER HÄRI I SIN HELHET KAN MEDFÖRA SKADA PÅ PRODUKTEN/PRODUKTERNA, PERSONSKADA, INKLUSIVE SKADA PÅ ANVÄNDAREN/ANVÄNDARNA ELLER ANDRA PERSONER SAMT SKADA PÅ ANNAN EGENDOM, OCH LEDER TILL ATT EVENTUELL GARANTI FÖR PRODUKTEN/PRODUKTERNA BLIR OGILTIG.

ILLUMINA KAN INTE ÅLÄGGAS NÅGOT ANSVAR SOM UPPKOMMER GENOM FELAKTIG ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA SOM BESKRIVS HÄRI (INKLUSIVE DELAR DÄRI ELLER PROGRAM).

© 2021 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

Alla varumärken tillhör Illumina, Inc. eller respektive ägare. Specifik varumärkesinformation finns på www.illumina.com/company/legal.html.

AMPure, Beckman och Beckman Coulter är varumärken eller registrerade varumärken som tillhör Beckman Coulter, Inc.

Kontaktinformation



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800-8094566
+1 858-2024566 (utanför Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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



Australisk sponsor:
Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Australien

Märkning av produkter

Fullständig information om de symboler som visas på förpackning och etiketter finns i symbolförklaringen på support.illumina.com på fliken *Documentation and Literature* (dokumentation och litteratur) för ditt produktpaket.