

MiSeqDx[®] Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose Referenzhandbuch

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Einleitung	6
Erste Schritte	10
Geräte- und Softwarehandbücher	19
Assay-Workflow	21
Eingeben von Laufinformationen	22
Hybridisierung des Oligonukleotid-Pools	27
Entfernen von ungebundenen Oligonukleotiden	30
Extension-Ligation von gebundenen Oligonukleotiden	33
PCR-Amplifikation	34
PCR-Reinigung	38
Bibliotheksnormalisierung	41
Bibliotheks-Pooling	45
Weitere Schritte	49
Technische Unterstützung	



Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. und deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit dem Gebrauch des hier beschriebenen Produkts (der hier beschriebenen Produkte) und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Handbuch und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina nicht verwendet und zu keinem anderen Zweck verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichen Recht bzw. ähnlichen Rechten an Dritte.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Anwendung der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTE ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

© 2020 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Illumina, MiSeqDx, die kurbisorange Farbe und das Streaming-Basen-Design sind Marken von Illumina, Inc. und/oder ihren Tochtergesellschaften in den USA und/oder anderen Ländern. Alle anderen Namen, Logos und Marken sind Eigentum der jeweiligen Eigentümer.

AMPure, Beckman und Beckman Coulter sind Marken oder eingetragene Marken der Beckman Coulter, Inc.

Versionshistorie

Dokument-Nr.	Überarbeitete Fassung	Datum	Beschreibung der Änderung
15038346	03	April 2020	<ul style="list-style-type: none">• Adresse der autorisierten europäischen Vertretung aktualisiert.• Adresse der australischen Niederlassung aktualisiert.

Dokument-Nr.	Überarbeitete Fassung	Datum	Beschreibung der Änderung
15038346	02	August 2017	<ul style="list-style-type: none"> • Die EC/REP-Kennzeichnung wurde aktualisiert und von „Emergo Europe“ in „Illumina Cambridge Limited“ geändert. • Informationen für Benutzer der Software „Local Run Manager“ im Handbuch durchgehend hinzugefügt. • Der Titel des Abschnitts „Erstellen eines Probenblatts“ wurde in „Vorbereiten von Probeninformationen“ geändert und kleinere Formulierungsänderungen wurden im Abschnitt vorgenommen, damit der Abschnitt sowohl für Benutzer von MiSeq Reporter als auch für Benutzer von Local Run Manager gilt. • Im Abschnitt „Automatisierte Sequenzierung und Datenanalyse“: Informationen zu Real Time Analysis (RTA) und zur Rolle von RTA bei der Primäranalyse wurden hinzugefügt. • Ein neuer Abschnitt mit dem Titel „Verbindungsmethoden für das MiSeqDx-Gerät“ wurde hinzugefügt, um die Softwarefunktionsunterschiede zwischen MiSeq Reporter und Local Run Manager sowie die Vorgehensweise zum Bestimmen, welche Software auf Ihrem MiSeqDx-Gerät installiert ist, zu erklären. • Ein neuer Abschnitt mit dem Titel „Geräte- und Softwarehandbücher“ wurde hinzugefügt. Der Abschnitt enthält Informationen dazu, welche Geräte- und Softwarehandbücher basierend auf der Gerätekonfiguration Ihres MiSeqDx-Geräts und der darauf installierten Analysesoftware verwendet werden sollen. • Ein Abschnitt mit dem Titel „Eingeben von Laufinformationen“ für das MiSeqDx-Gerät wurde hinzugefügt. Dieser Abschnitt bietet eine Einführung zu den Unterschieden bei der Verwendung von IWM und dem Modul für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay von Local Run Manager bei der Eingabe von Lauf- und Probeninformationen. • Hybridisierung des Oligonukleotid-Pools – Verfahren: Um die Inklusion der NTC-Probe sicherzustellen, wurde die vorherige Formulierung „alle Wells, die genomische DNA enthalten“ durch „alle Proben-Wells“ ersetzt. • PCR-Amplifikation – Vorbereitung: Ein Schritt zum Zentrifugieren des PCR-Polymerase-Röhrchens wurde hinzugefügt, um die Verwendung von ordnungsgemäßen Volumina an PCR-Polymerase sicherzustellen. • Die Liste der Akronyme wurde korrigiert: <ul style="list-style-type: none"> • Die Definition von NTC wurde von „Negative Template Control“ (Negative Matrizenkontrolle) in „No Template Control“ (Keine Matrizenkontrolle) geändert. • POS (Positive Control, Positive Kontrolle) wurde gelöscht.

Dokument-Nr.	Überarbeitete Fassung	Datum	Beschreibung der Änderung
15038346	01	März 2017	<ul style="list-style-type: none"> • Geräte und Materialien für die Voramplifikation – Anforderungen für die Tischzentrifuge wurden aktualisiert. • Eingeben von Probeninformationen: Ein Hinweis wurde hinzugefügt, dass Probenblätter nur im Illumina Worklist Manager zu bearbeiten sind. • Entfernen von ungebundenen Oligonukleotiden – Vorbereitung: Es wurde eine Empfehlung bezüglich der Kontrolle der Zentrifugentemperatur hinzugefügt. • Durchgehend: Es wurden Informationen zur australischen Niederlassung auf der Rückseite hinzugefügt.
15038346	B	März 2015	<ul style="list-style-type: none"> • Durchgehend: Markeninformationen wurden aktualisiert. • Durchgehend: Regulierungsetiketten wurden aktualisiert. • Eingeben von Probeninformationen: Zu Schritt 5 wurde ein zweiter Satz hinzugefügt. • Denaturieren und Verdünnen von interner PhiX-Kontrolle: Das PhiX-Verdünnungsverfahren wurde aktualisiert.
15038346	A	April 2014	<ul style="list-style-type: none"> • Erste Version

Einleitung

Verwendungszweck

Der Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose (Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Assay) ist ein *In-vitro*-Diagnostiksystem für die gezielte Sequenzierung, das die proteincodierenden Regionen und Intron-Exon-Grenzen des CFTR-Gens (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) in genomischer DNA, die aus in K₂EDTA gesammelten menschlichen peripheren Vollblutproben isoliert wurde, neu sequenziert. Der Test erkennt einzelne Nukleotidvarianten und kleine Indels innerhalb der sequenzierten Region und meldet zudem zwei tiefe intronische Mutationen und zwei große Deletionen. Er ist zur Durchführung auf einem MiSeqDx-Gerät von Illumina bestimmt.

Der Test dient zur Unterstützung der Diagnose von Personen mit Verdacht auf zystische Fibrose (CF). Dieser Assay ist am besten geeignet, wenn der Patient eine atypische oder nicht klassische Form von CF aufweist oder wenn andere Mutationspanels die beiden verursachenden Mutationen nicht nachweisen konnten. Die Ergebnisse des Tests sollten von einem zertifizierten klinischen Molekulargenetiker oder einem gleichwertig qualifizierten Kollegen interpretiert werden und in Verbindung mit anderen verfügbaren Informationen, wie z. B. klinischen Symptomen, anderen Diagnostiktests und der Krankheitsgeschichte der Familie, verwendet werden.

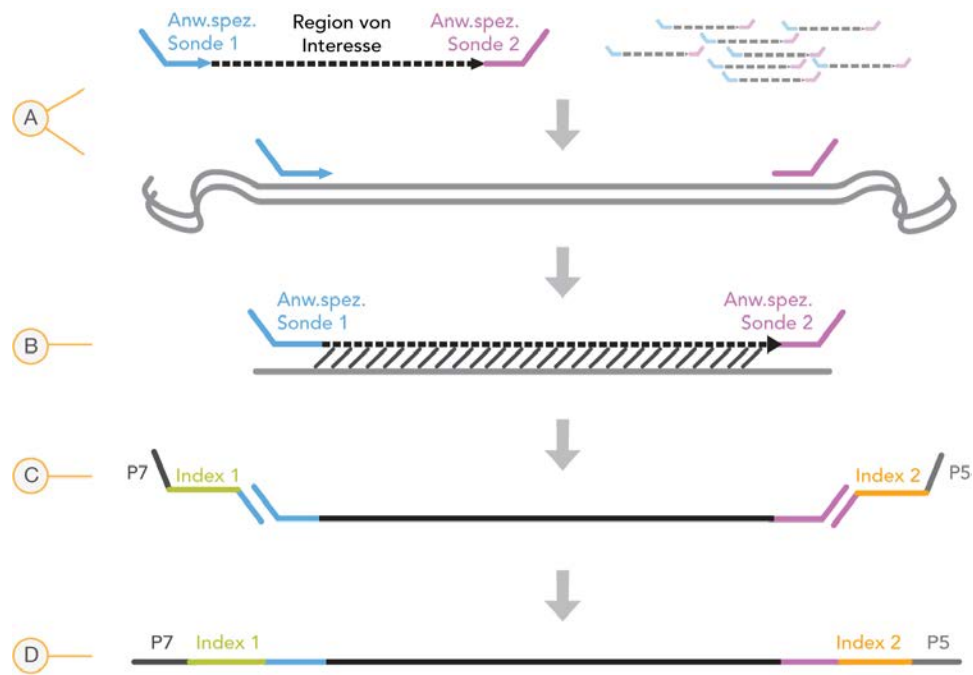
Dieser Test ist nicht für unabhängige Diagnosezwecke, die pränatale Diagnostik, Präimplantationstests, Träger-Screenings, Neugeborenen-Screenings oder Bevölkerungs-Screenings vorgesehen.

Über dieses Handbuch

Dieses Referenzhandbuch enthält detaillierte Anweisungen, Techniktipps und hilfreiche Hinweise für neu geschulte Benutzer, um sie bei der ordnungsgemäßen Durchführung des Protokolls für den MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose zu unterstützen. Es ist als Ergänzung vorgesehen und nicht dazu gedacht, die Packungsbeilage zu ersetzen.

Wie funktioniert der Assay?

Ein Paar CF-Oligonukleotide ist für jedes CFTR-Amplikon konzipiert. Die Hybridisierung dieser Oligonukleotide in genomische DNA erfolgt in einer 96-Well-Platte, gefolgt von Extension und Ligation, um DNA-Matrizen zu bilden, die aus den Regionen von Interesse, flankiert von universellen Primer-Sequenzen, bestehen. Mithilfe von indizierten Primern, die im Lieferumfang des Kits enthalten sind, werden die DNA-Matrizen durch PCR amplifiziert, in einem einzelnen Röhrchen zusammengefasst und auf dem MiSeqDx-Gerät sequenziert.



- A Hybridisierung von anwendungsspezifischen Oligonukleotidsonden
- B Extension und Ligation
- C Hinzufügen von Indizes und Sequenzierungsadaptern durch PCR
- D Letztes Amplikon bereit für die Sequenzierung auf dem MiSeq

Das Verfahren im Überblick

Die Verfahrensschritte für den Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose können wie folgt zusammengefasst werden:

Vorbereiten von Probeninformationen

Bereiten Sie zuerst Probeninformationen vor, die vom MiSeqDx-Gerät verwendet werden, um die einzelnen Proben und ihre entsprechenden Indizes zu identifizieren. Geben Sie die Proben-ID, Indizes und andere Parameter für die 96-Well-Platte ein. Weitere Informationen finden Sie unter *Eingeben von Laufinformationen* auf Seite 22.

Die von Ihnen für das MiSeqDx-Gerät eingegebenen Probeninformationen können auch als Leitfaden zum Konfigurieren der Platte während des Assay-Workflows verwendet werden.

Vorbereiten der Bibliotheken

Bereiten Sie die Bibliotheken anhand des Protokolls vor, das in diesem Benutzerhandbuch beschrieben ist.

Sequenzieren von Proben auf dem MiSeqDx-Gerät

Der MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose muss unter Verwendung eines Paired-End-Laufs mit 150 Zyklen und doppelter Indizierung auf einem MiSeqDx-Gerät sequenziert werden. Anweisungen zum Durchführen eines Sequenzierungslaufs auf dem MiSeqDx-Gerät finden Sie im Referenzhandbuch zum MiSeqDx-Gerät für Ihre Konfiguration. Informationen finden Sie unter *Geräte- und Softwarehandbücher* auf Seite 19.

Automatisierte Sequenzierung und Datenanalyse

Der erste Schritt bei der Datenanalyse wird als „Primäranalyse“ bezeichnet. Dieser Prozess wird von der RTA-Software (Real Time Analysis) ausgeführt und erzeugt Base-Calls und Qualitätsbewertungen. Im nächsten Schritt, der Sekundäranalyse, werden die bei der Primäranalyse erzeugten Base-Calls verarbeitet, um Informationen zu den einzelnen Proben zu erfassen. Die Sekundäranalyse, die von der Software „MiSeq Reporter“ oder „Local Run Manager“ ausgeführt wird, umfasst die Demultiplexierung, die FASTQ-Dateigenerierung, das Alignment, das Varianten-Calling und das Generieren von VCF-Dateien, die Informationen zu Varianten enthalten, die an speziellen Positionen in einem Referenzgenom gefunden wurden.

MiSeq Reporter und Local Run Manager verfügen über identische Funktionen zur Probenanalyse und Berichterstellung. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Softwareprogrammen besteht in der Verbindungsmethode für das MiSeqDx-Gerät. Weitere Informationen zu den Unterschieden und zum Bestimmen der verwendeten Software finden Sie unter *Verbindungsmethoden für das MiSeqDx-Gerät* auf Seite 8.

Weitere Informationen zum Analyse-Workflow finden Sie in den Handbüchern zur Analysesoftware, die auf Ihrem MiSeqDx-Gerät installiert ist. Informationen finden Sie unter *Geräte- und Softwarehandbücher* auf Seite 19.

Verbindungsmethoden für das MiSeqDx-Gerät

Es gibt zwei unterschiedliche Verbindungsmethoden mit dem MiSeqDx-Gerät, die für den klinischen Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose verfügbar sind. Die ursprüngliche Verbindungsmethode verwendet die MiSeq Reporter-Software zusammen mit Illumina Worklist Manager (IWM) und Illumina User Management Software. Die neue Methode verwendet die Software „Local Run Manager“.

MiSeq Reporter und Local Run Manager verfügen über identische Funktionen zur Probenanalyse und Berichterstellung.

Softwarefunktionen	Ursprünglich	Neu
Laufkonfiguration für das MiSeqDx-Gerät	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Probenkonfiguration und -verfolgung	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Steuerung des Benutzerzugriffs	Illumina User Management Software	Local Run Manager
Ausführung der Sekundäranalyse	MiSeq Reporter	Local Run Manager
Generieren der Berichte	MiSeq Reporter	Local Run Manager

Führen Sie die folgenden Schritte aus, um zu bestimmen, ob Local Run Manager verwendet wird.

- 1 Greifen Sie remote auf das MiSeqDx-Gerät zu.
- 2 Melden Sie sich an, wenn Sie dazu aufgefordert werden.
- 3 Stellen Sie sicher, dass „Local Run Manager“ oben auf dem Bildschirm angezeigt wird.



HINWEIS

Wenn Sie nicht dazu aufgefordert werden, sich anzumelden, wenn Sie remote auf das Gerät zugreifen, wird MiSeq Reporter gerade verwendet.

Kontroll-Tools

Illumina bietet die folgenden Tools für die Probenverfolgung und für Unterstützung im Labor:

- ▶ Das **Lab Tracking Form** (Laborkontrollformular) kann zum Aufzeichnen von Informationen verwendet werden, wie z. B. Bedienernamen, Informationen zur Probe und zum Index, Start- und Stoppzeiten, Reagenz-Chargennummern und Barcodes.
- ▶ Für MiSeq Reporter Software wird der **Illumina Worklist Manager** zum Erstellen eines Probenblatts über eine assistentenbasierte Anwendung verwendet. Er bietet eine Funktion für das Aufzeichnen von Parametern für die Probenplatte, z. B. der Proben-ID und der doppelten Indizes, sowie andere Funktionen für den Lauf. Local Run Manager bietet dieselben Funktionen, jedoch gibt es kein separates Probenblatt. Geben Sie Informationen zur Probenkonfiguration direkt in das **Analysemodul für die klinische CF-Sequenzierung von Local Run Manager** ein.



HINWEIS

Sie können die oben aufgeführten Dokumente für den Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose von der Illumina-Website herunterladen. Navigieren Sie hierzu zur Support-Seite für den Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose und klicken Sie auf die Registerkarte **Documentation & Literature** (Dokumentation und Literatur).

Erste Schritte

In diesem Abschnitt werden der Kit-Inhalt für den Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose, die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte sowie die Empfehlungen zur DNA-Eingabe und die Best Practices, die während des Protokolls anzuwenden sind, beschrieben.

Kit-Inhalt des MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose

Das Kit für den MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose von Illumina enthält die nachfolgend beschriebenen Komponenten. Lagern Sie die Kit-Komponenten bei der angegebenen Temperatur und in ausgewiesenen Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereichen.

Da die Reagenzien für die Vor- und die Nachamplifikation zusammen versendet werden, ist es wichtig, die Reagenzien im Voramplifikationsbereich des Labors zu entpacken und anschließend die Reagenzien für die Nachamplifikation am richtigen Lagerort für die Nachamplifikation aufzubewahren.

MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose, Karton 1

Tabelle 1 Karton 1A: Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
CF Clinical Sequencing Assay-Oligo Pool (Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay)	1 Röhrchen	600 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Oligonukleotiden, die auf das <i>CFTR</i> -Gen abzielen	-25 °C bis -15 °C
Hybridization Buffer (Hybridisierungspuffer)	1 Röhrchen	4,32 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und Formamid	-25 °C bis -15 °C
Extension-Ligation Mix (Extension-Ligation-Mischung)	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit einer proprietären Mischung aus DNA-Polymerasen, DNA-Ligasen und dNTPs	-25 °C bis -15 °C
Index-Primer C (A503), D (A504) und E (A505)	1 Röhrchen pro Primer	192 µl	PCR-Primer mit Indexsequenzen und Sequenzierungsadaptern	-25 °C bis -15 °C
Index-Primer 1 (A701), 2 (A702) und 10 (A710)	1 Röhrchen pro Primer	128 µl	PCR-Primer mit Indexsequenzen und Sequenzierungsadaptern	-25 °C bis -15 °C
PCR Polymerase (PCR-Polymerase)	1 Röhrchen	56 µl	Proprietäre DNA-Polymerase	-25 °C bis -15 °C
PCR Master Mix (PCR-Master-Mischung)	1 Röhrchen	2,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen und dNTPs	-25 °C bis -15 °C

Tabelle 2 Karton 1B: Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Library Normalization Diluent (Bibliotheksnormalisierungsverdünner)	1 Röhrchen	4,6 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	-25 °C bis -15 °C
Library Dilution Buffer (Bibliotheksverdünnungspuffer)	1 Röhrchen	4,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung	-25 °C bis -15 °C
PhiX Internal Control (interne PhiX-Kontrolle)	1 Röhrchen	10 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit genomischer PhiX-DNA	-25 °C bis -15 °C

MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose, Karton 2

Tabelle 3 Karton 2: Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Inhalt	Lagerung
MiSeqDx Cartridge - CF Clinical Sequencing Assay (MiSeqDx-Kartusche – Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay)	6 Kartuschen	Einweg-Kartusche mit Clusterbildungs- und Sequenzierungsreagenzien für die Verwendung mit dem MiSeqDx-Gerät, einschließlich Formamid, 2-Mercaptoethanol und < 2 % DMSO	-25 °C bis -15 °C

MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose, Karton 3

Tabelle 4 Karton 3A: Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Stringent Wash Buffer (stringenter Waschpuffer)	1 Flasche	24 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	2 °C bis 8 °C
Universal Wash Buffer (universeller Waschpuffer)	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen	2 °C bis 8 °C

Tabelle 5 Karton 3B: Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
PCR Clean-Up Beads (PCR-Reinigungs-Beads)	1 Röhrchen	5 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit festphasigen paramagnetischen Beads und Polyethylenglykol	2 °C bis 8 °C
Library Normalization Wash (Bibliotheksnormalisierungs-Waschlösung)	2 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salzen, 2-Mercaptoethanol und Formamid	2 °C bis 8 °C

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Library Beads (Bibliotheksb-Beads)	1 Röhrchen	1,2 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit festphasigen paramagnetischen Beads	2 °C bis 8 °C
MiSeqDx Flow Cell - CF Clinical Sequencing Assay (MiSeqDx-Fließzelle – Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay)	6 Behälter	1 Fließzelle	Glassubstrat mit kovalent gebundenen Oligonukleotiden	2 °C bis 8 °C

MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose, Karton 4

Tabelle 6 Karton 4: Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
MiSeqDx SBS Solution (PR2) - CF Clinical Sequencing Assay (MiSeqDx-SBS-Lösung (PR2) – Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay)	6 Flaschen	353,1 ml	Gepufferte wässrige Lösung	2 °C bis 8 °C

MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose, Karton 5

Tabelle 7 Karton 5: Voramplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Filter Plate (Filterplatte)	6 Platten	n. z.	Polypropylen-Mikrotiterplatte mit einer modifizierten Polyethersulfonmembran	15 °C bis 30 °C

Tabelle 8 Karton 5: Nachamplifikationsreagenzien

Komponente	Menge	Füllmenge	Wirkstoffe	Lagerung
Elution Buffer (Elutionspuffer)	1 Röhrchen	4,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung	15 °C bis 30 °C
Library Storage Buffer (Bibliothekslagerungspuffer)	1 Röhrchen	3,5 ml	Gepufferte wässrige Lösung	15 °C bis 30 °C

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Reagenzien

Voramplifikationsreagenzien

- ▶ 10 N NaOH (aus Tabletten herstellen oder Standardlösung verwenden)
- ▶ TE-Puffer
- ▶ RNase-/DNase-freies Wasser

Nachamplifikationsreagenzien

- ▶ 10 N NaOH (aus Tabletten herstellen oder Standardlösung verwenden)
- ▶ Ethanol absolut für die Molekularbiologie
- ▶ TE-Puffer
- ▶ RNase-/DNase-freies Wasser

Geräte und Materialien

Bereitgestellte, separat erhältliche Geräte und Materialien

- 1 **MiSeqDx-Gerät**, Katalog-Nr. DX-410-1001
- 2 **TruSeq Index Plate Fixture Kit**, Katalog-Nr. FC-130-1005
- 3 **TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit**, Katalog-Nr. FC-130-1007
- 4 **Ersatzverschlüsse für Indexadapter**, Katalog-Nr. DX-502-1003

Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Geräte und Materialien

Geräte und Materialien für die Voramplifikation

- 1 **Hitzeblock:** Sie benötigen einen Hitzeblock für eine 96-Well-Platte. Der Hitzeblock muss folgende Leistungsspezifikationen erfüllen. Die Verwendung von Hitzeblöcken mit beheizbarem Deckel ist akzeptabel.
 - Temperaturbereich: Umgebungstemperatur +5 °C bis 99 °C
 - Temperaturregelung: ±0,1 °C bei 37 °C; ±0,4 °C bei 60 °C
- 2 **Probeninkubator:** Es wird ein Inkubator (Hybridisierungssofen) benötigt. Der Inkubator muss folgende Leistungsspezifikationen erfüllen.
 - Temperaturbereich: 10 °C bis 100 °C
 - Temperaturregelung: ±0,2 °C
- 3 **Tischzentrifuge:** Sie benötigen eine Tischzentrifuge mit Temperaturregelung, die die Temperatur von 20 °C halten kann. (Außerdem ist eine separate Zentrifuge im Nachamplifikationsbereich erforderlich.) Es eignet sich jede Plattenzentrifuge, die eine 96-Well-Platte mit Filtereinheit aufnehmen kann und die vorgesehenen Geschwindigkeiten des Protokolls (280 bis 2.400 × g) erreicht.
- 4 **Präzisionspipetten:** Sie benötigen einen Satz Präzisionspipetten. (Außerdem ist ein separater Satz im Nachamplifikationsbereich erforderlich.) Die Verwendung von Präzisionspipetten ist notwendig, um eine genaue Reagenzien- und Probenabgabe zu gewährleisten. Sie können Einzel- oder Mehrkanalpipetten verwenden, wenn diese regelmäßig kalibriert werden und ihre Genauigkeit innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegt.
- 5 **Verbrauchsmaterialien:** Die folgenden Verbrauchsmaterialien werden benötigt.
 - 96-Well-PCR-Platten mit Rahmen, 0,2 ml, Polypropylen oder vergleichbar
 - 96-Well-Lagerungsplatten, 0,8 ml (MIDI-Platten)
 - Lösungsbecken, PVC, DNase-/RNase-frei (Bottich)
 - Klebende Aluminiumverschlussfolie
 - Entsprechende PCR-Plattenversiegelung
 - Aerosol-resistente Pipettenspitzen

Geräte und Materialien für die Nachamplifikation

- 1 **Thermocycler:** Sie benötigen einen Thermocycler. Der Thermocycler muss einen beheizbaren Deckel besitzen und den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen:
 - Temperatursteuerbereich: 4 °C bis 99 °C
 - Steuergenauigkeit: $\pm 0,25$ °C von 35 °C bis 99 °C
- 2 **Mikroplattenschüttler:** Es wird ein Mikroplattenschüttler im Nachamplifikationsbereich des Labors benötigt. Der Plattenschüttler muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen:
 - Maximale Mischgeschwindigkeit: 3.000 rpm
 - Mischgeschwindigkeitsbereich: 200 bis 3.000 rpm
- 3 **Tischzentrifuge:** Sie benötigen eine Tischzentrifuge, die die Temperatur von 20 °C halten kann. (Es wird eine separate Zentrifuge im Voramplifikationsbereich benötigt.) Es eignet sich jede Plattenzentrifuge, die die vorgesehenen Geschwindigkeiten des Protokolls (280 bis 2.400 \times g) erreicht.
- 4 **Hitzeblock:** Sie benötigen einen Hitzeblock für Röhrchen. Der Hitzeblock muss den folgenden Leistungsspezifikationen entsprechen.
 - Temperaturbereich: Umgebungstemperatur +5 °C bis 99 °C
 - Temperaturregelung: $\pm 0,1$ °C bei 37 °C; $\pm 0,4$ °C bei 60 °C
- 5 **Magnetstativ:** Sie benötigen ein Magnetstativ für eine 96-Well-Platte. Die Leistung ist besser, wenn sich die Magnete an der Seite des Stativs und nicht am Boden befinden.
- 6 **Präzisionspipetten:** Sie benötigen einen Satz Präzisionspipetten. (Es wird ein separater Satz im Voramplifikationsbereich benötigt.) Die Verwendung von Präzisionspipetten ist notwendig, um eine genaue Reagenzien- und Probenabgabe zu gewährleisten. Sie können Einzel- oder Mehrkanalpipetten verwenden, wenn diese regelmäßig kalibriert werden und ihre Genauigkeit innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegt.
- 7 **Verbrauchsmaterialien:** Die folgenden Verbrauchsmaterialien werden benötigt.
 - 96-Well-PCR-Platten mit Rahmen, 0,2 ml, Polypropylen oder vergleichbar
 - 96-Well-Lagerungsplatten, 0,8 ml (MIDI-Platten)



HINWEIS

Stellen Sie sicher, dass die 96-Well-Platte zum Magnetstativ passt.

- Konische 15-ml-Röhrchen
- Eppendorf-Mikrozentrifugenröhrchen (Schraubverschluss empfohlen)
- PCR-8-fach-Röhrchenstreifen
- Lösungsbecken, PVC, DNase-/RNase-frei (Bottich)
- Klebende Aluminiumverschlussfolien
- Klebende Plattenversiegelungen für den einmaligen Gebrauch
- Aerosol-resistente Pipettenspitzen

Verhindern von PCR-Produktkontamination

Das PCR-Verfahren wird häufig im Labor verwendet, um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Wenn im Laborbereich die Hygienevorschriften missachtet werden, können PCR-Produkte Reagenzien, Instrumente und genomische DNA-Proben verunreinigen, was zu ungenauen und unzuverlässigen Ergebnissen führt. Eine PCR-Produktkontamination kann Laborprozesse beenden und die normalen Betriebsabläufe erheblich verzögern.

Stellen Sie sicher, dass das Labor ordnungsgemäß eingerichtet ist, um das Risiko der PCR-Produktkontamination zu verringern:

- ▶ **Räumliche Trennung der Vor- und Nachamplifikationsbereiche**
 - Stellen Sie sicher, dass die Laborbereiche, in denen Voramplifikationsprozesse durchgeführt werden (DNA-Extraktion, -Quantifizierung und -Normalisierung), von den Laborbereichen, in denen Nachamplifikationsprozesse durchgeführt werden, räumlich voneinander getrennt sind.
 - Verwenden Sie zum Waschen von Vor- und Nachamplifikationsbottichen niemals dasselbe Waschbecken.
 - Verwenden Sie für Vor- und Nachamplifikationsprozesse niemals dasselbe Wasserreinigungssystem.
 - Lagern Sie alle Materialien, die in den Protokollen verwendet werden, im Voramplifikationsbereich und bringen Sie sie nach Bedarf in den Nachamplifikationsbereich.
- ▶ **Verwendung der für die Laborprozesse vorgesehenen Gerätschaften und Materialien**
 - Weisen Sie vollständige Sätze von Gerätschaften und Materialien (Pipetten, Zentrifugen, Ofen, Hitzeblock usw.) den Vor- und Nachamplifikations-Laborprozessen zu und verwenden Sie sie niemals für beide Prozesse.
 - Bewahren Sie die Verbrauchsmaterialien für die Vor- und die Nachamplifikation in getrennten Lagerbereichen (Gefrier- und Kühlschränke) auf.

Da die Reagenzien für die Vor- und die Nachamplifikation zusammen versendet werden, ist es wichtig, die Reagenzien im Voramplifikationsbereich des Labors zu entpacken und anschließend die Reagenzien für die Nachamplifikation im entsprechenden Nachamplifikationslager aufzubewahren.

Laborverfahren der Vor- und Nachamplifikation

Zur Vermeidung einer PCR-Produktkontamination ist es wichtig, Laborverfahren festzulegen und die Best Practices einzuhalten. Illumina empfiehlt eine tägliche und wöchentliche Reinigung der Laborbereiche mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche).



VORSICHT

Um den Abbau von Proben oder Reagenzien zu verhindern, stellen Sie sicher, dass alle Dämpfe der Reinigungslösung vollständig verflüchtigt sind, bevor Sie mit anderen Verfahren beginnen.

Tägliche Reinigung des Voramplifikationsbereichs

Die tägliche Reinigung des Voramplifikationsbereichs mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche) hilft, das PCR-Produkt zu beseitigen, das in den Voramplifikationsbereich gelangt ist.

Identifizieren Sie die Voramplifikationsbereiche, die das größte Risiko einer Kontamination darstellen, und reinigen Sie sie mit einer 0,5%igen

Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche), bevor Sie Voramplifikationsprozesse starten. Zu den Bereichen mit hohem Risiko könnten u. a. die folgenden gehören:

- ▶ Tischplatten
- ▶ Türgriffe
- ▶ Türgriffe von Kühlschränken und Gefrierfächern
- ▶ Computer-Maus
- ▶ Tastaturen

Tägliche Reinigung des Nachamplifikationsbereichs

Durch Verringern der Menge des PCR-Produkts im Nachamplifikationsbereich kann das Risiko einer Kontamination im Voramplifikationsbereich reduziert werden. Eine tägliche Reinigung des Nachamplifikationsbereichs mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche) kann dabei helfen.

Identifizieren Sie die Nachamplifikationsbereiche, die das größte Risiko einer Kontamination darstellen, und reinigen Sie sie täglich mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche). Zu den Bereichen mit hohem Risiko könnten u. a. die folgenden gehören:

- ▶ Thermocycler
- ▶ Arbeitsflächen, die für das Verarbeiten von amplifizierter DNA verwendet werden
- ▶ Türgriffe
- ▶ Türgriffe von Kühlschränken und Gefrierfächern
- ▶ Computer-Maus
- ▶ Tastaturen

Wöchentliche Reinigung aller Laborbereiche

Führen Sie einmal wöchentlich eine gründliche Reinigung der Vor- und Nachamplifikationsbereiche mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche) durch.

- ▶ Reinigen Sie alle Tischplatten und Laboroberflächen.
- ▶ Reinigen Sie alle Geräte, die nicht täglich gereinigt werden.
- ▶ Wischen Sie den Fußboden des Labors gründlich.
- ▶ Stellen Sie sicher, dass die Mitarbeiter, die für die wöchentliche Reinigung zuständig sind, entsprechend geschult sind, um eine PCR-Produktkontamination zu vermeiden.

Gegenstände, die auf den Boden fallen

Der Fußboden ist mit dem PCR-Produkt kontaminiert, das über die Schuhe von Personen, die aus dem Nachamplifikationsbereich kommen, übertragen wird. Daher ist alles, was auf den Boden fällt, als kontaminiert zu betrachten.

- ▶ Einwegartikel, die auf den Boden gefallen sind, wie z. B. leere Röhrchen, Pipettenspitzen, Handschuhe und Laborkittel-Kleiderbügel, müssen entsorgt werden.
- ▶ Wiederverwendbare Artikel, die auf den Boden gefallen sind, wie z. B. eine Pipette oder der Behälter einer wichtigen Probe, müssen sofort und gründlich mit einer 0,5%igen Natriumhypochloritlösung (10 % Bleiche) gereinigt werden, um PCR-Produktkontaminationen zu entfernen.
- ▶ Reinigen Sie alle Laboroberflächen, die in Kontakt mit dem kontaminierten Artikel gekommen sind. Personen, die mit irgendeinem Artikel in Berührung kommen, der auf den Boden gefallen ist, sei es ein Einweg- oder wiederverwendbarer Artikel, müssen ihre Laborhandschuhe entsorgen und ein neues Paar anziehen.

Vorsichtsmaßnahmen

Beachten Sie die folgenden Empfehlungen, wenn Sie mithilfe dieses Protokolls Bibliotheken für die Sequenzierung vorbereiten.

Sicherstellen der Einheitlichkeit

- ▶ **Mehrkanalpipetten verwenden:** Um Einheitlichkeit über alle Proben hinweg zu gewährleisten, verwenden Sie nach Möglichkeit eine Mehrkanalpipette. Kalibrieren Sie die Pipetten regelmäßig.
- ▶ **Einheitlichkeit bei der Vorbereitung kleinerer Probenmengen:** Jedes im Lieferumfang des Kits enthaltene Reagenzröhrchen enthält eine ausreichende Menge, um unter Verwendung von manuellen Pipetten und Reagenzbottichen Ergebnisse zu generieren, wenn die Standard-Labortechniken eingehalten werden. Um genaue Reagenzmengen zu gewährleisten, geben Sie das Reagenz mit einer Einzelpipette in jeden Well oder pipettieren Sie es mit einer Mehrkanalpipette in einen PCR-8-fach-Röhrchenstreifen.

Handhaben von magnetischen Beads

- ▶ **Bei Raumtemperatur verwenden:** Sorgen Sie vor dem Gebrauch dafür, dass die Beads Raumtemperatur haben.
- ▶ **Beads mit dem Vortexer mischen, bis sie gut suspendiert sind:** Mischen Sie die Beads unmittelbar vor Gebrauch mit dem Vortexer, bis sie gut suspendiert sind und die Farbe homogen erscheint.
- ▶ **Proben gründlich mischen:** Nachdem Sie die Beads zu den Proben hinzugefügt haben, mischen Sie sie sorgfältig, indem Sie 10-mal auf- und abpipettieren. Illumina empfiehlt zudem die Verwendung eines Schüttlers, um die Proben gründlich zu mischen.
- ▶ **Maximale Bindung ermöglichen:** Um optimale Ergebnisse zu erzielen, inkubieren Sie die Bead/Proben-Mischungen bei Raumtemperatur für die gesamte im Protokoll angegebene Dauer.
- ▶ **Klare Lösung langsam aspirieren:** Platzieren Sie die Platte auf dem Magnetstativ und warten Sie, bis die Lösung klar ist, bevor Sie fortfahren. Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ und aspirieren Sie langsam die klare Lösung. Achten Sie dabei darauf, dass die separierten Beads nicht durcheinandergebracht werden.

Vermeiden einer Kreuzkontamination

- ▶ **Spitzen nach dem Zuführen von Reagenzien und Proben austauschen:** Verwenden Sie stets frische Pipettenspitzen beim Zuführen von Reagenzien und Proben.
- ▶ **Platten gemäß Anweisungen mischen:** Mischen Sie die Proben mit einer Mehrkanalpipette und zentrifugieren Sie die Platte zum angegebenen Zeitpunkt. Mischen Sie die Platten nicht mit dem Vortexer.
- ▶ **Aerosol-resistente Spitzen verwenden:** Die Verwendung von Aerosol-resistenten Pipettenspitzen verringert das Risiko einer Amplikon-Übertragung und einer Kreuzkontamination von Probe zu Probe.

Waschen mit 80%igem Ethanol während des PCR-Reinigungsschritts

- ▶ **Frisches 80%iges Ethanol zubereiten:** Bereiten Sie stets frisches 80%iges Ethanol für Waschläufe zu. Ethanol kann Wasser aus der Luft aufnehmen und damit die Ergebnisse verfälschen.

- ▶ **Ethanol vollständig aus den Wells entfernen:** Stellen Sie sicher, dass das Ethanol vollständig aus den Wells entfernt wird, da es sonst Restverunreinigungen enthalten kann. Verwenden Sie eine P20-Mehrkanalpipette, um die Ethanolreste zu entfernen und das Trocknen zu beschleunigen.
- ▶ **Für vollständige Verdunstung sorgen:** Nehmen Sie die Platte vom Magnetstativ und lassen Sie sie bei Raumtemperatur trocknen. Die vollständige Verdunstung dauert mindestens 5 Minuten. Ethanolreste können den Ablauf nachfolgender Reaktionen beeinträchtigen.

Anforderungen für die DNA-Zugabe

- ▶ Das Protokoll für den MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose von Illumina erfordert 250 ng genomische DNA. Illumina empfiehlt dringend, eine Quantifizierung des genomischen Ausgangsmaterials durchzuführen.
- ▶ **Quantifizierung der Zugabe-DNA:** Quantifizieren Sie das genomische Ausgangsmaterial mithilfe von UV-Spektralphotometermethoden basierend auf A260/A280-OD-Werten.
- ▶ **Beurteilung der DNA-Qualität:** In der Regel werden Absorptionsmessungen bei 260 nm durchgeführt, um DNA zu quantifizieren. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm wird als Indikator für die Reinheit der Probe verwendet. Dieses Protokoll ist für DNA mit einem Absorptionsverhältnis größer als 1,5 optimiert.

Qualitätskontrollen

- ▶ Die guten Laborpraktiken schreiben vor, dass jeder Lauf eine positive Kontroll-DNA-Probe und eine negative Kontrollprobe (No Template Control) enthalten muss.
- ▶ Die positive Kontroll-DNA-Probe muss eine gut charakterisierte Probe mit einer bekannten CFTR-Mutation sein.
- ▶ Illumina empfiehlt zudem die Verwendung einer Wildtyp-Kontrollprobe in jedem Lauf.

Akronyme

Tabelle 9 Im Zusammenhang mit dem Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose verwendete Akronyme

Akronym	Definition
AMP	Amplification Plate (Amplifikationsplatte)
CLP	CLean-up Plate (Reinigungsplatte)
DAL	Diluted Amplicon Library (Verdünnte Amplikon-Bibliothek)
FPU	Filter Plate Unit (Filterplatteneinheit)
HYB	HYBridization Plate (Hybridisierungsplatte)
LNP	Library Normalization Plate (Bibliotheksnormalisierungsplatte)
NTC	No Template Control (Negativkontrolle)
PAL	Pooled Amplicon Library (Gepoolte Amplikon-Bibliothek)
SGP	StoraGe Plate (Lagerungsplatte)

Geräte- und Softwarehandbücher

Welche Geräte- und Softwarehandbücher Sie mit dem Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose verwenden, richtet sich nach der Laufwerkkonfiguration des MiSeqDx-Geräts und der darauf installierten Analysesoftware.

Wenn Sie sich nicht sicher sind, welche Software auf dem MiSeqDx-Gerät installiert ist, finden Sie Informationen hierzu unter *Verbindungsmethoden für das MiSeqDx-Gerät* auf Seite 8. Wenn Sie wegen der Laufwerkkonfiguration auf Ihrem MiSeqDx-Gerät unsicher sind, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.

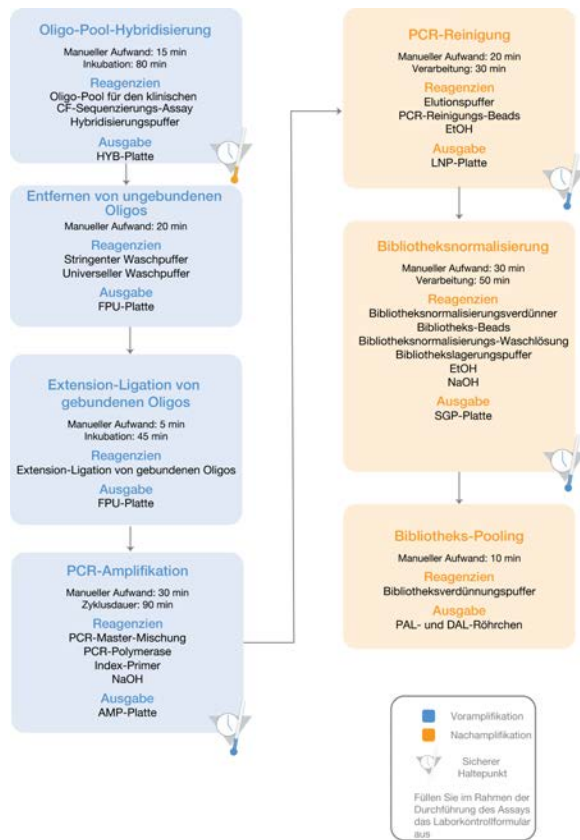
Handbücher	Dual-Boot-Laufwerk mit Local Run Manager	Dual-Boot-Laufwerk mit MiSeq Reporter	Einzelnes Laufwerk mit MiSeq Reporter
<i>MiSeqDx Handbuch zur Standortvorbereitung für Geräte mit Dual-Boot-Konfiguration</i> (Dokument-Nr. 15070066) Handbuch zur Standortvorbereitung	x	x	
<i>MiSeqDx-Gerät Referenzhandbuch für MOS v2</i> (Dokument-Nr. 100000021961) Referenzhandbuch zum Gerät	x		
<i>Local Run Manager Software Referenzhandbuch für MiSeqDx</i> (Dokument-Nr. 100000011880) Handbuch zur Analysesoftware	x		
<i>Local Run Manager Workflow CF Clinical Sequencing Analysis Module Workflow Guide</i> (Dokument-Nr. 100000012185) Handbuch zur Analysesoftware	x		
<i>MiSeqDx Referenzhandbuch für Geräte mit Dual-Boot-Konfiguration</i> (Dokument-Nr. 15070067) Referenzhandbuch zum Gerät		x	
<i>MiSeqDx-Gerät Handbuch zur Standortvorbereitung</i> (Dokument-Nr. 15038351) Handbuch zur Standortvorbereitung			x

Handbücher	Dual-Boot-Laufwerk mit Local Run Manager	Dual-Boot-Laufwerk mit MiSeq Reporter	Einzelnes Laufwerk mit MiSeq Reporter
<i>MiSeqDx-Gerät Referenzhandbuch (Dokument-Nr. 15038353)</i> Referenzhandbuch zum Gerät			x
<i>MiSeq Reporter Softwarehandbuch (Dokument-Nr. 15038356)</i> Handbuch zur Analysesoftware		x	x
<i>MiSeqDx-Gerät Sicherheits- und Compliance-Handbuch (Dokument-Nr. 15034477)</i> Sicherheits- und Compliance-Handbuch zum Gerät	x	x	x

Assay-Workflow

Das folgende Schaubild verdeutlicht den Workflow des MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose von Illumina. Zwischen den Schritten sind sichere Haltepunkte markiert.

Abbildung 1 Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose Workflow



Eingeben von Laufinformationen

MiSeq Reporter und Local Run Manager sind die beiden verfügbaren Softwareoptionen für die Einrichtung eines Laufs mit dem klinischen Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose. Ausführliche Informationen finden Sie in den Handbüchern zur Analysesoftware für Ihre Konfiguration, die unter *Geräte- und Softwarehandbücher* auf Seite 19 aufgelistet sind.

Wenn Sie MiSeq Reporter verwenden, generieren Sie mithilfe des Illumina Worklist Manager ein Probenblatt.

Wenn Sie Local Run Manager verwenden, gibt es kein separates Probenblatt. Geben Sie Informationen zur Lauf- und Probenkonfiguration direkt in das Analysemodul für die klinische CF-Sequenzierung von Local Run Manager ein.

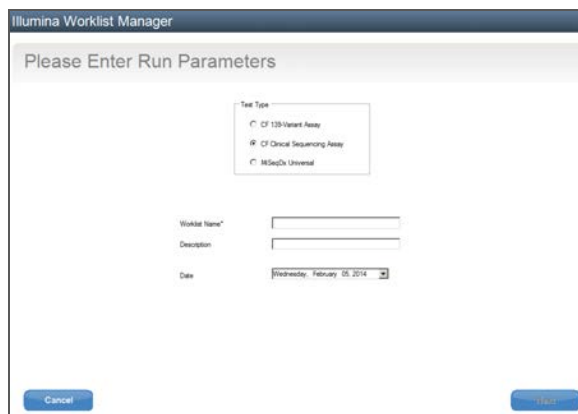
Weitere Informationen zu den Unterschieden zwischen MiSeq Reporter und Local Run Manager finden Sie unter *Verbindungsmethoden für das MiSeqDx-Gerät* auf Seite 8.

Verwenden von Illumina Worklist Manager (IWM)

MiSeqDx-Probenblattvorbereitung

- 1 Wählen Sie im Begrüßungsbildschirm von Illumina Worklist Manager **Create Worklist** (Arbeitsliste erstellen). Der Bildschirm „Enter Run Parameters“ (Laufparameter eingeben) wird geöffnet.

Abbildung 2 Illumina Worklist Manager, Bildschirm „Enter Run Parameters“ (Laufparameter eingeben)



- 2 Wählen Sie im Feld „Test Type“ (Testtyp) die Option **CF Clinical Sequencing Assay** (Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay).
- 3 Geben Sie im Feld „Worklist Name“ (Name der Arbeitsliste) einen Namen für das Probenblatt ein. Dies ist ein erforderliches Feld.
 - Wenn für den Namen des Probenblatts die alphanumerische Barcode-ID der Reagenzienkartusche verwendet wird, findet die MiSeq Operating Software (MOS) das Probenblatt automatisch. (Die Barcode-ID befindet sich auf dem Etikett der Reagenzienkartusche direkt unterhalb des Barcodes.)
 - Wenn ein anderer Name für das Probenblatt verwendet wird, kann über die Schaltfläche **Browse** (Durchsuchen) in der MiSeq Operating Software (MOS) zum entsprechenden Probenblatt navigiert werden.
- 4 **[Optional]** Geben Sie eine Beschreibung für den Lauf ein.

- 5 Stellen Sie sicher, dass das Datum mit dem Startdatum des Laufs übereinstimmt. Standardmäßig wird das aktuelle Datum angezeigt.
- 6 Wählen Sie **Next** (Weiter). Der Bildschirm „Enter Sample Information“ (Probeninformationen eingeben) wird geöffnet.

Abbildung 3 Illumina Worklist Manager, Bildschirm „Enter Sample Information“ (Probeninformationen eingeben)

Sample ID	Sample Name	Index 1 (I1)	Index 2 (I2)	Control	Description
AB1		A707	A507		
AB2		A707	A504		
AB3		A707	A505		
AB4		A707	A503		
AB5		A702	A504		
AB6		A702	A505		
AB7		A702	A503		
AB8		A702	A504		

Eingeben von Probeninformationen

- 1 Geben Sie auf der Registerkarte „Table“ (Tabelle) oder „Plate“ (Platte) für jeden Proben-Well folgende Informationen ein:
 - a **Sample ID** (Proben-ID): Geben Sie eine eindeutige Proben-ID ein. Die Proben-ID dient zum Nachverfolgen der Probe von der Vorbereitung über die Sequenzierung bis hin zur Analyse. Die ID ist in der Regel ein Barcode. Jedoch wird jeder beliebige Wert akzeptiert.
 - b **Index 1 and Index 2** (Index 1 und Index 2): Geben Sie den Indexadapter an, der für jeden Index-Read verwendet werden soll. Illumina empfiehlt die Verwendung von Kombinationen, die bei jedem Zyklus mindestens eine A- oder C-Base (rot) und eine G- oder T-Base (grün) ergeben.



HINWEIS

Informationen zur Auswahl der entsprechenden Indizes finden Sie unter *Probandurchsatz und Indexdarstellung* auf Seite 26.

- 2 **[Optional]** Um detailliertere Informationen zu den Proben aufzuzeichnen, geben Sie einen Probennamen und eine Beschreibung ein.
- 3 **[Optional]** Wählen Sie zum Angeben von Kontrollen auf der Platte im Dropdown-Menü **Control** (Kontrolle) die Option „Negative“ (Negativ) oder „Positive“ (Positiv) aus.
- 4 Wechseln Sie zur Registerkarte „Plate Graphic“ (Plattengrafik) und verwenden Sie die Option **Copy to Clipboard** (In Zwischenablage kopieren) oder **Print** (Drucken), um ein Bild der Probenplatte zu erfassen.

Abbildung 4 Illumina Worklist Manager, Registerkarte „Plate Graphic“ (Plattengrafik)

- 5 Wählen Sie **Finish** (Fertigstellen). Beim Speichern des Probenblatts erstellt die Software eine .csv- und eine .png-Datei der Plattengrafik und speichert beide Dateien zur Verwendung bei der Versuchskonfiguration in demselben Speicherort.



HINWEIS

Probenblattdaten nur mit dem Illumina Worklist Manager bearbeiten. Das Bearbeiten außerhalb des Illumina Worklist Manager kann dazu führen, dass der Lauf oder die Analyse fehlschlägt.

Verwenden des Analysemoduls für die klinische CF-Sequenzierung von Local Run Manager

Festlegen von Parametern

- 1 Melden Sie sich bei Local Run Manager an.
- 2 Klicken Sie auf **Create Run** (Lauf erstellen) und wählen Sie **CF Clinical** (CF klinisch) aus.
- 3 Geben Sie einen Namen ein, mit dem der Lauf von der Sequenzierung bis zur Analyse identifiziert werden kann.
Verwenden Sie alphanumerische Zeichen, Leerzeichen, Unterstriche oder Bindestriche.
- 4 [Optional] Geben Sie eine Laufbeschreibung ein, die hilft, den Lauf zu identifizieren.
Verwenden Sie alphanumerische Zeichen.


Angeben der Proben für den Lauf

Ihnen stehen folgende Möglichkeiten zur Verfügung, Proben für den Lauf anzugeben:

- ▶ **Enter samples manually** (Manuelles Eingeben der Proben): Verwenden Sie die leere Tabelle auf dem Bildschirm „Create Run“ (Lauf erstellen). Vorgeschlagene Proben- Wells sind hervorgehoben.
- ▶ **Import samples** (Importieren von Proben): Navigieren Sie zu einer externen Datei mit kommagetrennten Werten (*.csv). Im Bildschirm „Create Run“ (Lauf erstellen) steht eine Vorlage zum Herunterladen zur Verfügung.

Nachdem Sie die Probentabelle ausgefüllt haben, können Sie die Probeninformationen in eine externe Datei exportieren. Diese Datei können Sie bei der Vorbereitung von Bibliotheken als Referenz verwenden oder für einen anderen Lauf importieren.


Manuelles Eingeben der Proben

- 1 Geben Sie im Feld „Sample Name“ (Probenname) einen eindeutigen Probennamen ein.
Verwenden Sie alphanumerische Zeichen, Bindestriche oder Unterstriche.
- 2 Klicken Sie mit der rechten Maustaste und wählen Sie positive und negative Kontrollproben aus.
- 3 [Optional] Geben Sie auf der Registerkarte „Sample Description“ (Probenbeschreibung) eine Probenbeschreibung ein.
Verwenden Sie alphanumerische Zeichen, Bindestriche, Unterstriche oder Leerzeichen.
- 4 [Optional] Wählen Sie in der Dropdown-Liste „Index 1 (i7)“ einen Index-1-Adapter aus.
Dieser Schritt ist optional, da die i7- und i5-Indexkombinationen, die automatisch in die Wells eingetragen werden, bereits die Anforderungen an die Index-Diversität erfüllen.
- 5 [Optional] Wählen Sie in der Dropdown-Liste „Index 2 (i5)“ einen Index-2-Adapter aus.
Dieser Schritt ist optional, da die i7- und i5-Indexkombinationen, die automatisch in die Wells eingetragen werden, bereits die Anforderungen an die Index-Diversität erfüllen.
- 6 Klicken Sie auf das Symbol  **Print** (Drucken), um das Plattenlayout anzuzeigen.
- 7 Wählen Sie **Print** (Drucken), um das Plattenlayout auszudrucken, damit es bei der Vorbereitung von Bibliotheken als Referenz zur Verfügung steht.
- 8 [Optional] Klicken Sie auf **Export** (Exportieren), um Probeninformationen in eine externe Datei zu exportieren.
- 9 Klicken Sie auf **Save Run** (Lauf speichern).

Importieren von Proben

- 1 Klicken Sie auf **Import Samples** (Proben importieren) und navigieren Sie zum Speicherort der Datei mit den Probeninformationen. Sie können zwei Dateitypen importieren.
 - ▶ Klicken Sie auf **Template** (Vorlage), um ein neues Plattenlayout zu erstellen. Die Vorlagendatei enthält die korrekten Spaltenüberschriften für den Import. Tragen Sie in jeder Spalte Informationen zu den Proben im Lauf ein. Löschen Sie die Probeninformationen in nicht genutzten Zellen und speichern Sie anschließend die Datei.

Sample_Name	Description	I7_Index_ID	I5_Index_ID	Sample_Well	Control
Sample1		A701	A503	A01	
Sample2		A701	A504	A02	
Sample3		A701	A505	A03	
Sample4		A702	A503	A04	
Sample5		A702	A504	A05	
Sample6		A702	A505	A06	
Sample7		A710	A503	A07	Positive
Sample8		A710	A504	A08	Negative

- ▶ Verwenden Sie eine Datei mit Probeninformationen, die mittels der Export-Funktion aus dem Workflowanalysemodul exportiert wurde.
2. Klicken Sie auf das Symbol  **Print** (Drucken), um das Plattenlayout anzuzeigen.
3. Wählen Sie **Print** (Drucken), um das Plattenlayout auszudrucken, damit es bei der Vorbereitung von Bibliotheken als Referenz zur Verfügung steht.
4. [Optional] Klicken Sie auf **Export** (Exportieren), um Probeninformationen in eine externe Datei zu exportieren.
5. Klicken Sie auf **Save Run** (Lauf speichern).

Probendurchsatz und Indexdarstellung

Beim Illumina MiSeqDx Klinischer Sequenzierungs-Assay für zystische Fibrose beträgt der Probendurchsatz pro MiSeqDx-Lauf acht Proben. Die während der PCR-Amplifikation verwendeten Index-Primer müssen auf Basis des gewünschten endgültigen Probendurchsatzes ausgewählt werden, damit Diversität in der Indexsequenz sichergestellt ist.

Das MiSeqDx-Gerät verwendet eine grüne LED zum Sequenzieren von G/T-Basen und eine rote LED zum Sequenzieren von A/C-Basen. Um eine ordnungsgemäße Registrierung sicherzustellen, muss in jedem Zyklus mindestens eines der zwei Nukleotide für jeden Farbkanal gelesen werden. Es ist wichtig, die Farbbalance für jede Base des sequenzierten Index-Reads zu halten. Anderenfalls kann bei der Sequenzierung des Index-Reads ein Registrierungsfehler auftreten.

Verwenden Sie den folgenden minimalen Satz an Indizes mit Farbbalance für Sequenzierungsläufe mit acht Proben:

Tabelle 10 Index-Primer-Kombinationen für 8-Proben-Sequenzierungsläufe

	Index-Primer 1 (A701)	Index-Primer 2 (A702)	Index-Primer 10 (A710)
Index-Primer C (A503)	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Index-Primer D (A504)	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Index-Primer E (A505)	Probe 7	Probe 8	--

Wenn keine sechs eindeutigen Proben (die positiven und negativen Kontrollen ausgenommen) verfügbar sind, können Sie den Lauf mit Replikaten von humangenomischen DNA-Proben auffüllen.

Hybridisierung des Oligonukleotid-Pools

Während dieses Schrittes wird der Oligonukleotid-Pool der zystischen Fibrose mit den Upstream- und Downstream-Oligonukleotiden, die spezifisch für das „Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“-Gen (CFTR) sind, an genomische DNA-Proben hybridisiert.



WARNUNG

Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter support.illumina.com/sds.html.

Geschätzte Zeit

- ▶ Gesamtdauer: 1 Stunde und 35 Minuten
- ▶ Manueller Aufwand: 15 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Hybridisierungspuffer	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Genomische DNA (50 ng/ μ l empfohlen)	5 μ l	-25 °C bis -15 °C	Benutzer
96-Well-PCR-Platte mit Rahmen	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Klebende Aluminiumverschlussfolie	2 Versiegelungen	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Sterile Bottiche	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer

Vorbereitung

- 1 Nehmen Sie den Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay, den Hybridisierungspuffer, die Proben genomischer DNA und die positive Kontrollprobe aus dem -25 °C bis -15 °C kalten Lagerort heraus und lassen Sie sie bei Raumtemperatur auftauen.
- 2 Mischen Sie den Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay und den Hybridisierungspuffer kräftig mit dem Vortexer, um sicherzustellen, dass sich alle Ablagerungen vollständig aufgelöst haben. Zentrifugieren Sie dann kurz die Röhrchen, um Flüssigkeit zu sammeln.

**HINWEIS**

Halten Sie vor der Verwendung des Hybridisierungspuffers das Röhrchen ans Licht und stellen Sie sicher, dass sich alle Ablagerungen vollständig aufgelöst haben.

- 3 Erhitzen Sie einen 96-Well-Hitzeblock auf 95 °C.
- 4 Erwärmen Sie einen Inkubator auf 37 °C, um den Extension-Ligation-Schritt vorzubereiten.
- 5 Erstellen Sie die Probenplatte entsprechend der von Illumina Worklist Manager oder Local Run Manager ausgedruckten Plattengrafik. Überprüfen Sie, ob die Positionen der positiven und negativen Kontrollen übereinstimmen. Illumina empfiehlt, Proben in Chargen von mindestens acht Stück zu verarbeiten.

**HINWEIS**

Das Verwenden von Kontrollen ermöglicht es dem technischen Support von Illumina, effektive Unterstützung bei der Fehlerbehebung zu bieten. Der technische Support von Illumina bietet nur dann Unterstützung, wenn diese Kontrollreaktionen im Lauf enthalten waren.

Verfahren

- 1 Geben Sie der neuen 96-Well-PCR-Platte die Bezeichnung „**HYB_Plate_ID**“.
- 2 Fügen Sie 5 µl Probe oder Kontrolle bei 50 ng/µl (250 ng insgesamt) zu den entsprechenden Wells in der **HYB**-Platte hinzu. Folgen Sie dem generierten Plattenlayout, um eine korrekte Well-Auswahl vorzunehmen.

**HINWEIS**

Stellen Sie sicher, dass das DNA-Proben-Layout und die Positionen der positiven und negativen Kontrollen mit der Plattengrafik übereinstimmen.

- 3 Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 5 µl Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay zu allen Proben-Wells hinzu. Wechseln Sie die Spitzen nach jeder Reihe, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- 4 Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 40 µl Hybridisierungspuffer zu jeder Probe in der **HYB**-Platte hinzu. Pipettieren Sie drei- bis fünfmal leicht auf und ab, um zu mischen. Wechseln Sie die Spitzen nach jeder Reihe, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.

**HINWEIS**

Stellen Sie sicher, dass sich alle Kristalle oder Ablagerungen im Hybridisierungspuffer aufgelöst haben.

**HINWEIS**

Mischen Sie den Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay und den Hybridisierungspuffer nicht zum Lagern. Wenn diese vermischt werden, wird der Oligo-Pool für den klinischen CF-Sequenzierungs-Assay selbst bei Gefrierlagerung instabil.

- 5 Verschließen Sie die **HYB**-Platte mit klebbarer Aluminiumfolie und sichern Sie den Verschluss mit einer Gummiwalze oder einem Dichtkeil.
- 6 Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 1.000 × g und 20 °C.
- 7 Platzieren Sie die **HYB**-Platte in dem mit 95 °C vorgeheizten Block und inkubieren Sie sie 1 Minute lang.
- 8 Verringern Sie die Temperatur des Hitzeblocks auf 40 °C und fahren Sie mit der Inkubation fort, bis der Hitzeblock 40 °C erreicht. Diese Abkühlzeit beträgt etwa 80 Minuten.



HINWEIS

Während der Inkubation verringert sich die Temperatur des Hitzeblocks allmählich von 95 °C auf 40 °C. Dieser Vorgang dauert für gewöhnlich 80 Minuten. Diese allmähliche Abkühlung ist für eine ordnungsgemäße Hybridisierung kritisch. Deshalb werden PCR-Thermocycler mit aktiver Kühlung (z. B. Peltier, thermoelektrisch gekühlt) für diesen Vorgang nicht empfohlen.



SICHERER HALTEPUNKT

Nachdem der Hitzeblock 40 °C erreicht hat, bleibt die **HYB**-Platte 2 Stunden lang bei 40 °C stabil.

Entfernen von ungebundenen Oligonukleotiden

Bei diesem Verfahren werden unter Verwendung eines Filters, der in der Lage ist, eine Größenauswahl zu treffen, ungebundene Oligonukleotide aus genomischer DNA entfernt. Zwei Waschschritte mit stringentem Waschpuffer stellen das vollständige Entfernen ungebundener Oligonukleotide sicher. Ein dritter Waschschritt mit universellem Waschpuffer entfernt Reste des stringenten Waschpuffers und bereitet die Probe für den Extension-Ligation-Schritt vor.



WARNUNG

Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter support.illumina.com/sds.html.

Geschätzte Zeit

- ▶ Gesamtdauer: 20 Minuten
- ▶ Manueller Aufwand: 20 Minuten

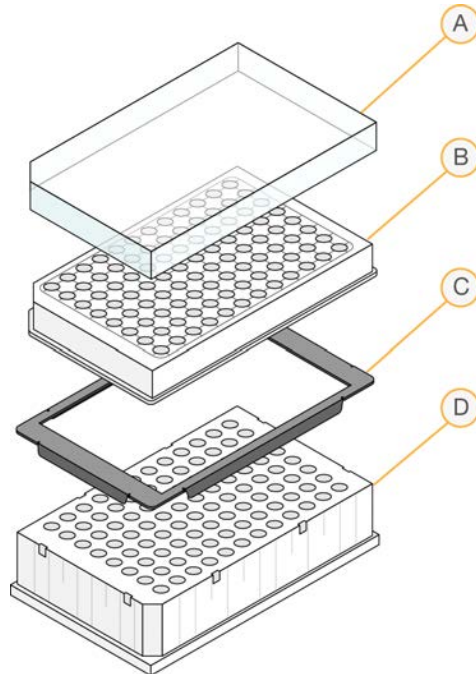
Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Extension-Ligation-Mischung	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Stringenter Waschpuffer	1 Flasche	2 °C bis 8 °C	Illumina
Universeller Waschpuffer	1 Röhrchen	2 °C bis 8 °C	Illumina
Filterplatte	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Illumina
Adapterkranz	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Illumina
MIDI-Platte	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Bottiche	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer

Vorbereitung

- 1 Nehmen Sie die Extension-Ligation-Mischung aus dem Lagerort mit einer Temperatur von -25 °C bis -15 °C heraus und tauen Sie sie bei Raumtemperatur auf. Die Extension-Ligation-Mischung wird im Extension-Ligation-Schritt verwendet und benötigt etwa 20 Minuten zum Auftauen.
- 2 Nehmen Sie den stringenten Waschpuffer und den universellen Waschpuffer aus dem Lagerort mit einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C heraus und stellen Sie sie bei Raumtemperatur zur Seite.
- 3 Fügen Sie die Filterplatten-Assembly-Einheit (**FPU**) in der folgenden Reihenfolge (von oben nach unten) zusammen:

Abbildung 5 Filterplatten-Assembly-Einheit



- A Deckel
- B Filterplatte
- C Adapterkranz
- D MIDI-Platte

- 4 Geben Sie der Filterplatte die Bezeichnung „**FPU-Platten-ID**“. Die Platten-ID muss mit der für die **HYB**-Platte verwendeten ID übereinstimmen.
- 5 Waschen Sie die Filterplattenmembran vorab wie folgt:
 - a Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl stringenten Waschpuffer in jeden Well.
 - b Schließen Sie die **FPU**-Platte mit dem Filterplattendeckel und halten Sie sie bei jedem Zentrifugationsschritt zugedeckt.
 - c Zentrifugieren Sie die **FPU** 5 Minuten lang bei 2.400 × g und 20 °C.



HINWEIS

Stellen Sie sicher, dass alle Wells der Filterplatte vollständig entleert werden. Wenn der Waschpuffer nicht vollständig abläuft, zentrifugieren Sie erneut bei 2.400 × g und 20 °C, bis die gesamte Flüssigkeit durchgelaufen ist (weitere 5–10 Minuten).



VORSICHT

Es ist äußerst wichtig, die Zentrifugentemperatur bei den Waschschritten zu prüfen. Temperaturen von 25 °C oder höher können zu einer höheren Stringenz bei der Bindung der Primer führen. In seltenen Fällen, wenn Proben SNVs in Primer-Bindungsregionen aufweisen, kann die höhere Stringenz zu Allelausfällen führen.

Verfahren

- 1 Stellen Sie nach dem Abschluss der Hybridisierung sicher, dass der Hitzeblock auf 40 °C abgekühlt ist. Während sich die **HYB**-Platte noch im Hitzeblock befindet, verstärken Sie die Versiegelung mit einer Gummiwalze oder einem Dichtkeil. Wenn die Temperatur von 40 °C nicht innerhalb von 80 Minuten erreicht wird, fahren Sie mit der Inkubation fort, bis sich der Hitzeblock auf 40 °C abgekühlt hat.

- 2 Entfernen Sie die **HYB**-Platte aus dem Hitzeblock und zentrifugieren Sie sie 1 Minute lang bei $1.000 \times g$ und $20 \text{ }^\circ\text{C}$, um die Kondensation zu sammeln.
- 3 Übertragen Sie das gesamte Volumen jeder Probe mithilfe einer auf $60 \text{ }\mu\text{l}$ eingestellten Mehrkanalpipette in die Mitte der entsprechenden, vorab gewaschenen Wells der Filterplatte. Wechseln Sie die Spitzen nach jeder Reihe, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- 4 Versiegeln Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie 5 Minuten lang bei $2.400 \times g$ und $20 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 5 Waschen Sie die Filterplatte wie folgt:
 - a Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette $45 \text{ }\mu\text{l}$ stringenten Waschpuffer in jeden Proben-Well.
Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
 - b Versiegeln Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie 5 Minuten lang bei $2.400 \times g$ und $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

**HINWEIS**

Falls der Waschpuffer nicht vollständig abläuft, zentrifugieren Sie erneut bei $2.400 \times g$ und $20 \text{ }^\circ\text{C}$, bis die gesamte Flüssigkeit durchgelaufen ist (weitere 5–10 Minuten).

- 6 Wiederholen Sie den Waschvorgang wie folgt:
 - a Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette $45 \text{ }\mu\text{l}$ stringenten Waschpuffer in jeden Proben-Well.
Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
 - b Versiegeln Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie 5 Minuten lang bei $2.400 \times g$ und $20 \text{ }^\circ\text{C}$.
 - c Wenn der Waschpuffer nicht vollständig abläuft, zentrifugieren Sie die Filterplatte erneut 5 Minuten lang bei $2.400 \times g$ und $20 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 7 Entsorgen Sie den gesamten bis zu diesem Zeitpunkt angefallenen Durchfluss (der Formamid enthält) in einen entsprechenden Behälter für gefährliche Abfälle und setzen Sie dann die **FPU** wieder zusammen. Für den restlichen Voramplifikationsvorgang kann dieselbe MIDI-Platte verwendet werden.
- 8 Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette $45 \text{ }\mu\text{l}$ universellen Waschpuffer in jeden Proben-Well.
Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- 9 Versiegeln Sie die Filterplatte mit dem Deckel und zentrifugieren Sie sie 10 Minuten lang bei $2.400 \times g$ und $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

**HINWEIS**

Stellen Sie sicher, dass die gesamte Flüssigkeit nach dem Zentrifugieren abgelaufen ist. Wiederholen Sie das Zentrifugieren bei Bedarf. Waschpufferreste können nachfolgende enzymatische Reaktionen verhindern.

Extension-Ligation von gebundenen Oligonukleotiden

Dieser Prozess verbindet die hybridisierten Upstream- und Downstream-Oligonukleotide. Eine DNA-Polymerase erstreckt sich vom Upstream-Oligonukleotid über die Zielregion hinaus, gefolgt von der Ligation mit dem 5'-Ende des Downstream-Oligonukleotids mittels DNA-Ligase. Das Ergebnis besteht in der Bildung von Produkten, die die gezielten Regionen von Interesse enthalten, flankiert von Sequenzen, die für die Amplifikation benötigt werden.

Geschätzte Zeit

- ▶ Gesamtdauer: 50 Minuten
- ▶ Manueller Aufwand: 5 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Extension-Ligation-Mischung	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Klebende Aluminiumverschlussfolie	1 Versiegelung	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Bottiche	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer

Verfahren

- 1 Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl der Extension-Ligation-Mischung zu jedem Proben-Well der Filterplatte hinzu. Die Extension-Ligation-Reaktion findet auf der Filterplattenmembran statt.
Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- 2 Verschließen Sie die Filterplatte mit klebbarer Aluminiumfolie und decken Sie sie dann mit dem Deckel zu, um die Folie während der Inkubation zu sichern.
- 3 Inkubieren Sie die gesamte **FPU**-Assemblierung im vorab erwärmten Inkubator 45 Minuten lang bei 37 °C.
- 4 Bereiten Sie während der Inkubation der **FPU**-Platte die AMP (Amplifikationsplatte) vor, wie im folgenden Abschnitt beschrieben.

PCR-Amplifikation

In diesem Schritt werden die Extension-Ligation-Produkte unter Verwendung von Primern, die Indexsequenzen für das Proben-Multiplexing hinzufügen, sowie von gängigen Adaptoren, die für die Clusterbildung erforderlich sind, amplifiziert.

Geschätzte Zeit

- ▶ Gesamtdauer: ca. 90 Minuten
- ▶ Manueller Aufwand: 30 Minuten

Verbrauchsmaterialien

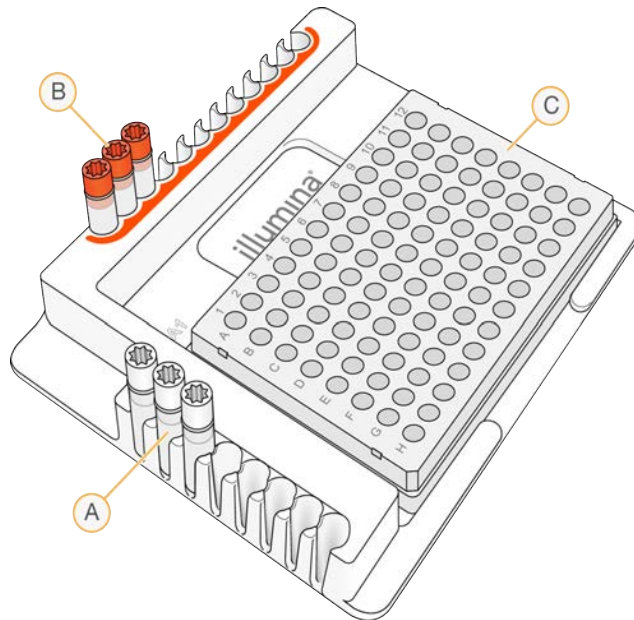
Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
PCR-Master-Mischung	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Index-Primer C (A503), D (A504) und E (A505)	1 Röhrchen pro Primer	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Index-Primer 1 (A701), 2 (A702) und 10 (A710)	1 Röhrchen pro Primer	-25 °C bis -15 °C	Illumina
PCR-Polymerase	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Entsprechende PCR-Plattenversiegelung	1	15 °C bis 30 °C	Benutzer
0,05 N NaOH, frisch zubereitet	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer
96-Well-PCR-Platte mit Rahmen	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Bottiche	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer

Vorbereitung

- 1 Bereiten Sie frisches 0,05 N NaOH vor, indem Sie 25 µl 10 N NaOH zu 4.975 µl RNase-/DNase-freiem Wasser hinzufügen.
- 2 Ermitteln Sie anhand des Plattengrafikausdrucks von Illumina Worklist Manager oder Local Run Manager die zu verwendenden Index-Primer.
- 3 Nehmen Sie die PCR-Master-Mischung und die entsprechenden Index-Primer aus dem -25 °C bis -15 °C kalten Lagerort heraus und tauen Sie sie auf einem Tisch bei Raumtemperatur auf.
Tauen Sie die Reagenzien etwa 20 Minuten lang auf.
- 4 Sobald die Index-Primer vollständig aufgetaut sind, mischen Sie jedes Röhrchen mit dem Vortexer und zentrifugieren Sie die Röhrchen kurz in einer Mikrozentrifuge. Verwenden Sie 1,7-ml-Eppendorf-Röhrchen als Adapter für die Mikrozentrifuge.

- 5 Ordnen Sie die Primer in einem Rack wie folgt an:
 - a Ordnen Sie die Primer-Röhrchen der Index-Primer C (A503), D (A504) und E (A505) (weiße Verschlüsse, klare Lösung) vertikal an den Reihen A bis H ausgerichtet an.
 - b Ordnen Sie die Primer-Röhrchen der Index-Primer 1 (A701), 2 (A702) und 10 (A710) (orange Verschlüsse, gelbe Lösung) horizontal an den Spalten 1 bis 12 ausgerichtet an.

Abbildung 6 Indexplattenvorrichtung



- A Index-Primer C (A503), D (A504) und E (A505) (weiße Verschlüsse)
 B Index-Primer 1 (A701), 2 (A702) und 10 (A710) (orange Verschlüsse)
 C AMP-Platte

- 6 Beschriften Sie eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „AMP“ (Amplifikationsplatte).
- 7 Fügen Sie anhand des Probenblatts Index-Primer wie folgt zur AMP-Platte hinzu:
 - a Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 4 μ l der Index-Primer C (A503), D (A504) und E (A505) (klare Lösung) zu den entsprechenden Wells in einer Spalte der AMP-Platte hinzu. Das Auswechseln der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich.
 - b Um eine Index-Kreuzkontamination zu vermeiden, entsorgen Sie die ursprünglichen *weißen* Verschlüsse und bringen Sie neue *weiße* Verschlüsse an.
 - c Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 4 μ l der Index-Primer 1 (A701), 2 (A702) und 10 (A710) (gelbe Lösung) zu den entsprechenden Wells in einer Reihe der AMP-Platte hinzu. **Die Spitzen müssen nach jeder Reihe ausgetauscht werden, um eine Index-Kreuzkontamination zu vermeiden.**
 - d Um eine Index-Kreuzkontamination zu vermeiden, entsorgen Sie die ursprünglichen *orangenen* Verschlüsse und bringen Sie neue *orange* Verschlüsse an. Entfernen Sie alle Index-Primer-Röhrchen aus dem Arbeitsbereich.

- 8 Bereiten Sie die PCR-Gebrauchslösung aus PCR-Master-Mischung und PCR-Polymerase wie folgt vor:
 - a Zentrifugieren Sie das PCR-Polymerase-Röhrchen vor dem Gebrauch kurz, um Luftblasen zu entfernen.
 - b Fügen Sie 5,6 µl PCR-Polymerase zu 280 µl PCR-Master-Mischung hinzu.
 - c Invertieren Sie die vorbereitete PCR-Gebrauchslösung zum Mischen 20-mal. Diese Gebrauchslösung wird im nächsten Abschnitt zur **AMP**-Platte hinzugefügt. Die PCR-Gebrauchslösung ist bei Raumtemperatur 10 Minuten lang stabil.



HINWEIS

Fügen Sie PCR-Polymerase immer kurz vor der Verwendung zur PCR-Master-Mischung hinzu. Bewahren Sie die PCR-Gebrauchslösung niemals auf.

Verfahren

- 1 Entnehmen Sie nach dem Beenden der 45-minütigen Extension-Ligation-Reaktion die **FPU** aus dem Inkubator. Entfernen Sie die Aluminiumverschlussfolie und ersetzen Sie sie durch den Deckel der Filterplatte.
Es wird empfohlen, vor dem Zentrifugieren die Aluminiumverschlussfolie zu entfernen, um sicherzugehen, dass der Reaktionsüberstand wirksam in die Abfallplatte abläuft.
- 2 Zentrifugieren Sie die **FPU** 2 Minuten lang bei $2.400 \times g$ und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 3 Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 25 µl 0,05 N NaOH zu jedem Proben-Well der Filterplatte hinzu. Pipettieren Sie das NaOH 5- bis 6-mal auf und ab und achten Sie dabei darauf, dass die Pipettenspitzen die Membran berühren. Die Spitzen müssen nach jeder Spalte ausgetauscht werden.
- 4 Decken Sie die Filterplatte ab und inkubieren Sie sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur.
- 5 Verwenden Sie während der Inkubation der Filterplatte eine Mehrkanalpipette, um 22 µl der PCR-Gebrauchslösung in jeden Well der AMP-Platte mit Index-Primern zu übertragen. Tauschen Sie zwischen Proben die Spitzen aus.
- 6 Übertragen Sie die vom Filter eluierten Proben wie folgt zur AMP-Platte:
 - a Stellen Sie eine P20-Mehrkanal-Pipette auf 20 µl ein.
 - b Pipettieren Sie die Proben in der ersten Spalte der Filterplatte 5- bis 6-mal auf und ab.
 - c Übertragen Sie 20 µl von der Filterplatte zur entsprechenden Spalte der **AMP**-Platte.
 - d Pipettieren Sie leicht 5- bis 6-mal auf und ab, um die DNA mit der PCR-Gebrauchslösung gründlich zu mischen.



HINWEIS

Neigen Sie die **FPU**-Platte leicht, um die vollständige Aspiration sicherzustellen und um Luftblasen zu verhindern.

- e Übertragen Sie in ähnlicher Weise die verbleibenden Spalten von der Filterplatte zur **AMP**-Platte. *Die Spitzen müssen nach jeder Spalte ausgetauscht werden, um Index- und Probenkreuzkontaminationen zu vermeiden.*
- f Nach der Übertragung aller Proben kann die MIDI-Abfallsammelplatte der **FPU** entsorgt werden. Reinigen Sie den metallischen Adapterkranz und bewahren Sie ihn für die künftige Verwendung auf.

- 7 Versiegeln Sie die **AMP**-Platte mit der entsprechenden Plattenversiegelung und sichern Sie den Verschluss mit einer Gummiwalze.
- 8 Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei $1.000 \times g$ und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 9 Übertragen Sie die **AMP**-Platte in den Nachamplifikationsbereich.
- 10 Führen Sie mithilfe des folgenden Programms auf einem Thermocycler eine PCR durch:
 - $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 3 Minuten
 - 25 Zyklen von:
 - $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 Sekunden
 - $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 Sekunden
 - $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 Sekunden
 - $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 Minuten
 - Halten Sie die Temperatur konstant bei $10\text{ }^{\circ}\text{C}$



SICHERER HALTEPUNKT

Falls Sie nicht gleich mit der PCR-Reinigung fortfahren, kann die **AMP**-Platte über Nacht auf dem Thermocycler bleiben oder sie kann bei $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu 48 Stunden aufbewahrt werden.

PCR-Reinigung

In diesem Verfahren werden PCR-Reinigungs-Beads verwendet, um die PCR-Produkte von den anderen Reaktionskomponenten zu reinigen.

Geschätzte Zeit

- ▶ Gesamtdauer: 50 Minuten
- ▶ Manueller Aufwand: 20 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Elutionspuffer	1 Röhrchen	15 °C bis 30 °C	Illumina
PCR-Reinigungs-Beads	400 µl pro 8 Proben	2 °C bis 8 °C	Illumina
80%iges Ethanol, frisch zubereitet	5 ml pro 8 Proben	15 °C bis 30 °C	Benutzer
96-Well-MIDI-Platten	2	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Klebende Plattenversiegelung	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Bottiche	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer

Vorbereitung



HINWEIS

Bitte lesen Sie im Abschnitt **Vorsichtsmaßnahmen** am Anfang dieses Protokolls die wichtigen Hinweise zur Handhabung der magnetischen Beads und zum Waschen mit 80%igem Ethanol während der PCR-Reinigung.

- 1 Bringen Sie die PCR Clean-Up Beads auf Raumtemperatur.
- 2 Bereiten Sie frisches 80%iges Ethanol aus reinem Ethanol vor.



HINWEIS

Bereiten Sie stets frisches 80%iges Ethanol für die Schritte des Waschlaufs zu. Ethanol kann Wasser aus der Luft aufnehmen, was die Ergebnisse verfälscht.

Verfahren

- 1 Zentrifugieren Sie die AMP-Platte 1 Minute lang bei 1.000 × g und 20 °C, um die Kondensation zu sammeln.
- 2 Beschriften Sie eine neue MIDI-Platte mit „**CLP-Platten-ID**“ (Clean-up Plate, Reinigungsplatte).
- 3 Invertieren Sie PCR-Reinigungs-Beads 10-mal. Mischen Sie kräftig mit dem Vortexer und invertieren Sie erneut 10-mal.
- 4 Inspizieren Sie die Lösung visuell, um sicherzugehen, dass die Beads gut resuspendiert sind.
- 5 Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl PCR-Reinigungs-Beads zu jedem Well der **CLP**-Platte hinzu.

- 6 Übertragen Sie mithilfe einer auf 60 µl eingestellten Mehrkanalpipette das vollständige PCR-Produkt von der AMP- zur **CLP**-Platte. Tauschen Sie zwischen Proben die Spitzen aus.
- 7 Versiegeln Sie die **CLP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.
- 8 Schütteln Sie die **CLP**-Platte auf einem Mikroplattenschüttler 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.
- 9 Inkubieren Sie 10 Minuten lang bei Raumtemperatur (15 °C bis 30 °C), ohne zu schütteln.
- 10 Platzieren Sie die Platte mindestens 2 Minuten bzw. so lange auf einem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.
- 11 Lassen Sie die **CLP**-Platte auf dem Magnetstativ und entfernen und entsorgen Sie mithilfe einer auf 100 µl eingestellten Mehrkanalpipette vorsichtig den Überstand. Tauschen Sie zwischen Proben die Spitzen aus.



HINWEIS

Falls versehentlich Beads in die Spitzen aspiriert werden, verteilen Sie die Beads wieder auf die Platte, lassen Sie die Platte 2 Minuten lang auf dem Magnet ruhen und stellen Sie sicher, dass der Überstand klar ist.

- 12 Lassen Sie die **CLP**-Platte auf dem Magnetstativ und waschen Sie die Beads mit frisch zubereitetem 80%igem Ethanol wie folgt:
 - a Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 200 µl frisch zubereitetes 80%iges Ethanol zu jedem Proben-Well hinzu. Das Austauschen der Spitzen ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden. Zu diesem Zeitpunkt brauchen Sie die Beads nicht zu resuspendieren.
 - b Inkubieren Sie die Platte auf dem Magnetstativ mindestens 30 Sekunden bzw. so lange, bis der Überstand klar ist.
 - c Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.
- 13 Lassen Sie die **CLP**-Platte auf dem Magnetstativ und führen Sie einen zweiten Ethanol-Waschlauf wie folgt durch:
 - a Fügen Sie mit einer Mehrkanalpipette 200 µl frisch zubereitetes 80%iges Ethanol zu jedem Proben-Well hinzu.
 - b Inkubieren Sie die Platte auf dem Magnetstativ mindestens 30 Sekunden bzw. so lange, bis der Überstand klar ist.
 - c Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn.
- 14 Verwenden Sie eine auf 20 µl eingestellte P20-Mehrkanalpipette, um überflüssiges Ethanol zu entfernen.
- 15 Entfernen Sie die **CLP**-Platte vom Magnetstativ und lassen Sie die Beads 10 Minuten lang an der Luft trocknen.
- 16 Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 30 µl Elutionspuffer in jede Probe. Das Austauschen der Spitzen ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- 17 Versiegeln Sie die Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.
- 18 Schütteln Sie die **CLP**-Platte auf einem Mikroplattenschüttler 2 Minuten lang bei 1.800 rpm.



HINWEIS

Stellen Sie sicher, dass alle Proben vollständig resuspendiert sind. Wenn es Proben gibt, in denen die Beads nicht vollständig resuspendiert sind, pipettieren Sie diese vorsichtig auf und ab, um die Beads zu resuspendieren, und wiederholen Sie die beiden vorhergehenden Schritte.

- 19 Inkubieren Sie 2 Minuten lang bei Raumtemperatur (15 °C bis 30 °C) .
- 20 Platzieren Sie die **CLP**-Platte mindestens 2 Minuten bzw. so lange auf dem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.
- 21 Beschriften Sie eine neue MIDI-Platte mit **LNP-Platten-ID** (Library Normalization Plate, Bibliotheksnormalisierungsplatte).
- 22 Übertragen Sie mithilfe einer P20-Mehrkanalpipette und feinen Spitzen vorsichtig 20 µl des Überstands von der **CLP**-Platte auf die **LNP**-Platte. Tauschen Sie nach jeder Probe die Spitzen aus, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.



HINWEIS

Falls versehentlich Beads in die Spitzen aspiriert werden, verteilen Sie die Beads wieder auf die Platte, lassen Sie die Platte 2 Minuten lang auf dem Magnet ruhen und stellen Sie sicher, dass der Überstand klar ist.

- 23 **[Optional]** Übertragen Sie die verbleibenden 10 µl Überstand von der **CLP**-Platte auf eine neue Platte und beschriften Sie diese Platte mit einem Laufnamen und Datum. Lagern Sie diese Platte bis zum Ende des Sequenzierungslaufs und der Datenanalyse bei -25 °C bis -15 °C. Die gereinigten PCR-Produkte können im Falle von Probenfehlern zur Fehlerbehebung verwendet werden.
- 24 Wenn Sie den Vorgang an diesem Punkt beenden, versiegeln Sie die **LNP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung und zentrifugieren Sie sie 1 Minute lang bei 1.000 × g und 20 °C, um sicherzustellen, dass sich der gesamte Überstand am Boden des Wells befindet.



SICHERER HALTEPUNKT

Nach der PCR-Reinigung ist die Platte 3 Stunden lang bei 2 °C bis 8 °C stabil.

Bibliotheksnormalisierung

Dieses Verfahren normalisiert die Menge jeder Bibliothek, um eine ausgewogene Bibliotheksrepräsentation in der gepoolten Probe zu gewährleisten.

Geschätzte Zeit

- ▶ Gesamtdauer: 1 Stunde und 20 Minuten
- ▶ Manueller Aufwand: 30 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Bibliotheksnormalisierungsverdünner	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
Bibliotheks-Beads	1 Röhrchen	2 °C bis 8 °C	Illumina
Bibliotheksnormalisierungs-Waschlösung	2 Röhrchen	2 °C bis 8 °C	Illumina
Bibliotheksagerungspuffer	1 Röhrchen	15 °C bis 30 °C	Illumina
0,1 N NaOH, frisch zubereitet	2 ml pro 48 Proben	15 °C bis 30 °C	Benutzer
96-Well-PCR-Platte mit Rahmen	1 Platte	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Konisches 15-ml-Röhrchen	1 Röhrchen	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Klebende Plattenversiegelung	Nach Bedarf	15 °C bis 30 °C	Benutzer



WARNUNG

Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter support.illumina.com/sds.html.

Vorbereitung

- 1 Bereiten Sie frisches 0,1 N NaOH vor, indem Sie 30 µl 10 N NaOH zu 2.970 µl RNase-/DNase-freiem Wasser hinzufügen.
- 2 Nehmen Sie den Bibliotheksnormalisierungsverdünner aus dem -25 °C bis -15 °C kalten Lagerort heraus und bringen Sie ihn auf Raumtemperatur. Verwenden Sie bei Bedarf ein Wasserbad mit einer Temperatur von 20 °C bis 25 °C.



HINWEIS

Der Bibliotheksnormalisierungsverdünner kann sichtbare Ablagerungen oder Kristalle bilden. Mischen Sie die Lösung vor dem Gebrauch kräftig mit dem Vortexer. Halten Sie dann das Röhrchen vor eine Lichtquelle und prüfen Sie die Lösung visuell, um sicherzustellen, dass alle Ablagerungen vollständig aufgelöst wurden.

- 3 Nehmen Sie die Bibliotheks-Beads und die Bibliotheksnormalisierungs-Waschlösung aus dem 2 °C bis 8 °C kalten Lagerort heraus und bringen Sie sie auf Raumtemperatur.
Verwenden Sie bei Bedarf ein Wasserbad mit einer Temperatur von 20 °C bis 25 °C.
- 4 Mischen Sie die Bibliotheks-Beads kräftig 1 Minute lang mit dem Vortexer (zeitweilig mit Inversion), bis die Beads resuspendiert sind und sich kein Pellet im unteren Bereich des Röhrchens befindet, wenn das Röhrchen invertiert wird.

Verfahren

- 1 Geben Sie 394 µl Bibliotheksnormalisierungsverdünner in ein frisches 1,5-ml-Röhrchen.
- 2 Verwenden Sie eine auf 1.000 µl eingestellte P1000-Pipette, um die Bibliotheks-Beads gründlich zu resuspendieren, indem Sie 10-mal auf- und abpipettieren.



HINWEIS

Es ist äußerst wichtig, das Bibliotheks-Bead-Pellet im unteren Bereich des Röhrchens vollständig zu resuspendieren. Durch die Verwendung einer P1000 wird sichergestellt, dass die Beads homogen resuspendiert werden und sich keine Bead-Masse im unteren Bereich des Röhrchens befindet. Dies ist unerlässlich, um eine einheitliche Clusterdichte auf der Fließzelle zu erzielen.

- 3 Pipettieren Sie 72 µl der Bibliotheks-Beads-Lösung in das Röhrchen mit Bibliotheksnormalisierungsverdünner. Mischen Sie die Lösung gründlich, indem Sie das Röhrchen 15- bis 20-mal invertieren.



HINWEIS

Sie benötigen eine auf 1.000 µl eingestellte P1000-Pipette, um in Schritt 2 die Beads vollständig resuspendieren zu können. Mischen Sie nur die für den aktuellen Assay erforderliche Menge an Bibliotheksnormalisierungsverdünner und Bibliotheks-Beads. Bewahren Sie die verbleibenden Mengen an Bibliotheksnormalisierungsverdünner und Bibliotheks-Beads getrennt bei den jeweils empfohlenen Temperaturen auf. Um die Stabilität zu bewahren, dürfen die Beads der Bibliotheks-Beads-Lösung nie eingefroren oder mit Bibliotheksnormalisierungsverdünner vermischt werden, wenn sie nicht umgehend verwendet werden.

- 4 Geben Sie mithilfe einer Mehrkanalpipette 45 µl der kombinierten Bibliotheksnormalisierungsverdünner/Bibliotheks-Beads-Gebrauchslösung in jeden Well der LNP-Platte mit den Bibliotheken. Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- 5 Versiegeln Sie die LNP-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.
- 6 Schütteln Sie die LNP-Platte auf einem Mikroplattenschüttler 30 Minuten lang bei 1.800 rpm.



HINWEIS

Diese 30-minütige Inkubation ist wichtig für die ordnungsgemäße Bibliotheksnormalisierung. Eine Inkubationszeit von mehr oder weniger als 30 Minuten kann die Bibliotheksdarstellung und die Clusterdichte beeinträchtigen.



HINWEIS

Wenn Sie mit der Sequenzierung am selben Tag fortfahren möchten, ist jetzt ein guter Zeitpunkt, um mit dem Auftauen der Reagenzienkartusche anzufangen. Befolgen Sie die Anweisungen zum Auftauen der MiSeqDx-Reagenzienkartusche im Abschnitt mit dem Titel *Vorbereiten der Reagenzienkartusche* auf Seite 45.

- 7 Platzieren Sie die Platte mindestens 2 Minuten bzw. so lange auf einem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.

- 8 Lassen Sie die **LNP**-Platte auf dem Magnetstativ und verwenden Sie eine auf 80 µl eingestellte Mehrkanalpipette, um vorsichtig den Überstand zu entfernen und ihn in einem entsprechenden Behälter für gefährliche Abfälle zu entsorgen.



HINWEIS

Falls versehentlich Beads in die Spitzen aspiriert werden, verteilen Sie die Beads wieder auf die Platte und lassen Sie die Platte 2 Minuten bzw. so lange ruhen, bis der Überstand klar ist.

- 9 Entfernen Sie die **LNP**-Platte vom Magnetstativ und waschen Sie die Beads mit Bibliotheksnormalisierungs-Waschlösung wie folgt:
- Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl Bibliotheksnormalisierungs-Waschlösung in jeden Proben-Well.
Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
 - Versiegeln Sie die **LNP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.
 - Schütteln Sie die **LNP**-Platte auf einem Mikroplattenschüttler 5 Minuten lang bei 1.800 rpm.
 - Platzieren Sie die Platte mindestens 2 Minuten bzw. so lange auf dem Magnetstativ, bis der Überstand klar ist.
 - Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn in einem entsprechenden Behälter für gefährliche Abfälle.
- 10 Entfernen Sie die **LNP**-Platte vom Magnetstativ und wiederholen Sie den Waschlauf mit Bibliotheksnormalisierungs-Waschlösung wie folgt:
- Geben Sie mit einer Mehrkanalpipette 45 µl Bibliotheksnormalisierungs-Waschlösung in jeden Well.
Das Austauschen der Spitzen zwischen Spalten ist nicht erforderlich, wenn Sie vorsichtig agieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
 - Versiegeln Sie die **LNP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.
 - Schütteln Sie die **LNP**-Platte auf einem Mikroplattenschüttler 5 Minuten lang bei 1.800 rpm.
 - Platzieren Sie die Platte mindestens 2 Minuten lang auf dem Magnetstativ.
 - Entfernen Sie vorsichtig den Überstand und entsorgen Sie ihn in einem entsprechenden Behälter für gefährliche Abfälle.
- 11 Verwenden Sie eine auf 20 µl eingestellte P20-Mehrkanalpipette, um überschüssige Bibliotheksnormalisierungs-Waschlösung zu entfernen.
- 12 Entfernen Sie die **LNP**-Platte vom Magnetstativ und fügen Sie 30 µl von 0,1 N NaOH zu jedem Well hinzu, um die Probe zu eluieren.
- 13 Versiegeln Sie die **LNP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung.
- 14 Schütteln Sie die **LNP**-Platte auf einem Mikroplattenschüttler 5 Minuten lang bei 1.800 rpm.
- 15 Beschriften Sie während der 5-minütigen Elution eine neue 96-Well-PCR-Platte mit „**SGP-Platten-ID**“ (StoraGe-Platte).
- 16 Fügen Sie 30 µl Bibliothekslagerungspuffer zu jedem Well hinzu, der in der **SGP**-Platte verwendet werden soll.

- 17 Stellen Sie nach Beendigung der 5-minütigen Elution sicher, dass alle Proben in der **LNP**-Platte vollständig resuspendiert sind. Falls die Proben nicht vollständig resuspendiert sind, pipettieren Sie diese Proben behutsam auf und ab oder klopfen Sie die Platte leicht auf die Arbeitsfläche, um die Beads zu resuspendieren, und schütteln Sie sie für weitere 5 Minuten.
- 18 Platzieren Sie die **LNP**-Platte mindestens 2 Minuten lang auf dem Magnetstativ.
- 19 Übertragen Sie mithilfe einer auf 30 µl eingestellten Mehrkanalpipette den Überstand von der **LNP**- auf die **SGP**-Platte. Pipettieren Sie leicht fünfmal auf und ab, um zu mischen.

**HINWEIS**

Falls versehentlich Beads in die Spitzen aspiriert werden, verteilen Sie die Beads wieder auf die Platte, lassen Sie die Platte 2 Minuten lang auf dem Magnet ruhen und stellen Sie sicher, dass der Überstand klar ist.

- 20 Versiegeln Sie die **SGP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung und zentrifugieren Sie sie anschließend 1 Minute lang bei 1.000 × g und 20 °C.

**SICHERER HALTEPUNKT**

Wenn Sie nicht gleich mit dem Bibliotheks-Pooling und der anschließenden Sequenzierung auf dem MiSeqDx-Gerät fortfahren, bewahren Sie die versiegelte **SGP**-Platte bis zu 3 Tage bei -25° C bis -15 °C auf.

Bibliotheks-Pooling

Bei der Vorbereitung für die Clusterbildung und die Sequenzierung werden vor der Sequenzierung auf dem MiSeqDx-Gerät gleiche Volumina normalisierter Bibliothek gemischt, in Hybridisierungspuffer verdünnt und vor der Sequenzierung auf dem MiSeqDx durch Hitze denaturiert. PhiX wird als interne Kontrolle für die Sequenzierung verwendet.

Geschätzte Zeit

- ▶ Gesamtdauer: 10 Minuten
- ▶ Manueller Aufwand: 10 Minuten

Verbrauchsmaterialien

Element	Menge	Lagerung	Bereitgestellt von
Bibliotheksverdünnungspuffer	1 Röhrchen	-25 °C bis -15 °C	Illumina
10 nM interne PhiX-Kontrolle	2 µl	-25 °C bis -15 °C	Illumina
0,1 N NaOH, frisch zubereitet	1 ml	15 °C bis 30 °C	Benutzer
1X TE-Puffer	8 µl	15 °C bis 30 °C	Benutzer
Eppendorf-Gefäße (Schraubverschluss empfohlen)	2 Röhrchen	15 °C bis 30 °C	Benutzer
PCR-8-fach-Röhrchenstreifen	1	15 °C bis 30 °C	Benutzer
2,5-l-Eiskübel	1	15 °C bis 30 °C	Benutzer

Vorbereiten des Bibliotheks-Poolings

- 1 Erhitzen Sie einen für 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen passenden Hitzeblock auf 96 °C.
- 2 Bereiten Sie in einem Eiskübel ein Eiswasserbad vor. Kühlen Sie den Bibliotheksverdünnungspuffer im Eiswasserbad.
- 3 Beginnen Sie mit dem Auftauen der MiSeqDx-Reagenzienkartusche.

Vorbereiten der Reagenzienkartusche

In den folgenden Anweisungen wird beschrieben, wie die Reagenzienkartusche in einem Wasserbad mit Raumtemperatur aufgetaut wird. Diese Methode nimmt etwa 1 Stunde in Anspruch.

- 1 Nehmen Sie die Reagenzienkartusche aus dem -25 °C bis -15 °C kalten Lagerort heraus.
- 2 Legen Sie die Reagenzienkartusche in ein Wasserbad, das ausreichend raumtemperiertes Wasser in Laborqualität enthält, um die Basis der Reagenzienkartusche bis zu der auf der Reagenzienkartusche aufgedruckten Wasserlinie einzutauchen. Das Wasser darf die maximale Wasserlinie nicht übersteigen.

Abbildung 7 Maximale Wasserlinie



- 3 Lassen Sie die Reagenzienkartusche im raumtemperierten Wasserbad etwa 1 Stunde bzw. so lange auftauen, bis sie aufgetaut ist.
- 4 Nehmen Sie die Kartusche aus dem Wasserbad und klopfen Sie sie vorsichtig auf der Arbeitsfläche ab, um das Wasser von der Basis der Kartusche zu entfernen. Trocknen Sie die Basis der Kartusche ab. Stellen Sie sicher, dass kein Wasser auf die Oberseite der Reagenzienkartusche gespritzt ist.

Überprüfen der Reagenzienkartusche

- 1 Invertieren Sie die Reagenzienkartusche 10-mal, um die aufgetauten Reagenzien zu mischen, und überprüfen Sie, ob alle Positionen aufgetaut sind.



HINWEIS

Es ist äußerst wichtig, dass die Reagenzien in der Kartusche vollständig aufgetaut und gemischt sind, damit eine ordnungsgemäße Sequenzierung sichergestellt werden kann.

- 2 Überprüfen Sie die Reagenzien an den Positionen 1, 2 und 4, um sicherzugehen, dass sie vollständig gemischt und keine Ablagerungen enthalten sind.
- 3 Klopfen Sie die Kartusche vorsichtig auf die Arbeitsfläche, um Luftblasen in den Reagenzien zu entfernen.



HINWEIS

Die MiSeqDx-Sipper-Röhrchen reichen bis zum Boden der einzelnen Behälter, um die Reagenzien zu aspirieren. Deshalb ist es wichtig, dass sich keine Luftblasen in den Behältern befinden.

- 4 Lagern Sie die Reagenzienkartusche auf Eis bzw. lagern Sie sie bei 2 °C bis 8 °C (bis zu sechs Stunden), bis Sie den Lauf konfigurieren können. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, fahren Sie direkt mit dem Laden der Probe und dem Konfigurieren des Laufs fort.

Denaturieren und Verdünnen der internen PhiX-Kontrolle

- 1 Bereiten Sie 0,1 N NaOH vor, indem Sie die folgenden Volumina in einem konischen Röhrchen mischen:
 - DNase-/RNase-freies Wasser (2.475 µl)
 - Stock 10 N NaOH (25 µl)
- 2 Invertieren Sie das Röhrchen zum Mischen mehrmals.



VORSICHT

Die Verwendung von frisch verdünntem NaOH ist notwendig, um die Proben für die Clusterbildung auf dem MiSeqDx vollständig zu denaturieren.



HINWEIS

Wird PhiX am selben Tag wie die Bibliotheksnormalisierung vorbereitet, kann derselbe Stock von 0,1 N NaOH verwendet werden.

- 3 Mischen Sie folgende Volumina, um die Bibliothek mit interner PhiX-Kontrolle auf 2 nM zu verdünnen:
 - 10 nM Bibliothek mit interner PhiX-Kontrolle (2 µl)
 - 1X TE-Puffer (8 µl)
- 4 Mischen Sie die folgenden Volumina, um eine 1-nM-Bibliothek mit interner PhiX-Kontrolle zu erhalten:
 - 2-nM-Bibliothek mit interner PhiX-Kontrolle (10 µl)
 - 0,1 N NaOH (10 µl)
- 5 Mischen Sie die 1-nM-Bibliotheklösung mit interner PhiX-Kontrolle kurz mit dem Vortexer.
- 6 Zentrifugieren Sie die interne 1-nM-PhiX-Kontrolle eine Minute lang bei 280 × g und 20 °C.
- 7 Inkubieren Sie sie fünf Minuten bei Raumtemperatur, um die Bibliotheklösung mit interner PhiX-Kontrolle in einzelne Stränge zu denaturieren.
- 8 Mischen Sie folgende Volumina in einem neuen Mikrozentrifugenröhrchen, um eine 20-pM-Bibliothek mit interner PhiX-Kontrolle zu erhalten:
 - Denaturierte Bibliothek mit interner PhiX-Kontrolle (2 µl)
 - Vorgekühlter Bibliotheksverdünnungspuffer (98 µl)



HINWEIS

Sie können die denaturierte 20-pM-Bibliothek mit interner PhiX-Kontrolle bei -25 °C bis -15 °C bis zu 3 Wochen lang als Aliquote für den Einmalgebrauch aufbewahren. Nach 3 Wochen verringert sich die Anzahl der Cluster.

Vorbereiten von Proben für die Sequenzierung

- 1 Bringen Sie den Bibliotheksverdünnungspuffer auf Raumtemperatur. Mischen Sie den Bibliotheksverdünnungspuffer mit dem Vortexer und stellen Sie sicher, dass alle Ausfällungen vollständig aufgelöst wurden.
- 2 Wenn die **SGP**-Platte gefroren gelagert wurde, tauen Sie die **SGP**-Platte bei Raumtemperatur auf.
- 3 Zentrifugieren Sie die **SGP**-Platte 1 Minute lang bei 1.000 × g und 20 °C, um die Kondensation zu sammeln.
- 4 Beschriften Sie ein neues Eppendorf-Gefäß mit „**PAL-Platten-ID**“ (Pooled Amplicon Library).
- 5 Wenn die **SGP**-Platte gefroren gelagert wurde, mischen Sie mit einer auf 40 µl eingestellten P200-Mehrkanalpipette jede zu sequenzierende Bibliothek, indem Sie 3- bis 5-mal auf- und abpipettieren. Tauschen Sie zwischen Proben die Spitzen aus.
- 6 Übertragen Sie 5 µl jeder zu sequenzierenden Bibliothek von der **SGP**-Platte auf einen PCR-8-fach-Röhrchenstreifen. Versiegeln Sie die **SGP**-Platte mit einer klebenden Plattenversiegelung und legen Sie sie beiseite.



HINWEIS

Bewahren Sie die versiegelte **SGP**-Platte bei -25 °C bis -15 °C auf. Die versiegelte **SGP**-Platte ist bis zu 3 Tage lang stabil.

- 7 Kombinieren und übertragen Sie den Inhalt des PCR-8-fach-Röhrchenstreifens in das **PAL**-Röhrchen. Mischen Sie das **PAL**-Röhrchen gründlich mit dem Vortexer.

- 8 Beschriften Sie das neue Eppendorf-Gefäß mit „**DAL-Platten-ID**“ (Diluted Amplicon Library).
- 9 Geben Sie 585 µl Bibliotheksverdünnungspuffer in das **DAL**-Röhrchen.
- 10 Fügen Sie dem **DAL**-Röhrchen 6 µl 20 pM Interne PhiX-Kontrolle hinzu. Pipettieren Sie mit derselben Spitze 3- bis 5-mal auf und ab, um die Spitze zu spülen und eine vollständige Übertragung sicherzustellen.
- 11 Übertragen Sie 9 µl **PAL** in das **DAL**-Röhrchen mit Bibliotheksverdünnungspuffer. Pipettieren Sie mit derselben Spitze 3- bis 5-mal auf und ab, um die Spitze zu spülen und eine vollständige Übertragung sicherzustellen.
- 12 Mischen Sie das **DAL**-Röhrchen mit dem Vortexer bei höchster Geschwindigkeit.

**HINWEIS**

Wenn Sie die verbleibende **PAL** für eine künftige Verwendung aufbewahren möchten, lagern Sie das **PAL**-Röhrchen bei -25 °C bis -15 °C. **PAL** kann 3 Tage lang aufbewahrt werden.

- 13 Zentrifugieren Sie das **DAL**-Röhrchen 1 Minute lang bei 1.000 × g und 20 °C, um den Inhalt zu sammeln.
- 14 Inkubieren Sie unter Verwendung eines Hitzeblocks das **DAL**-Röhrchen 2 Minuten lang bei 96 °C.
- 15 Invertieren Sie das **DAL**-Röhrchen nach der Inkubation ein- bis zweimal, um es gut zu mischen, und legen Sie es dann sofort in das Eiswasserbad.
- 16 Belassen Sie das **DAL**-Röhrchen 5 Minuten lang im Eiswasserbad.

**HINWEIS**

Sie müssen den Schritt der Hitzedenaturierung direkt vor dem Laden der **DAL** in die MiSeqDx-Reagenzienkartusche durchführen, um ein effizientes Laden der Matrize in die MiSeqDx-Fließzelle sicherzustellen.

Weitere Schritte

Sobald die Amplikonbibliothek mit dem verdünnten und denaturierten PhiX gepoolt wurde, können die Bibliotheken auf die MiSeqDx-Kartusche – Klinischer CF-Sequenzierungs-Assay im angegebenen Behälter mit der Bezeichnung **Load Samples** (Proben laden) geladen werden. Fahren Sie anschließend mit der Konfiguration des Laufs über die Benutzeroberfläche der MiSeq Operating Software (MOS) fort. Informationen hierzu finden Sie im MiSeqDx-Gerät Referenzhandbuch für Ihre Konfiguration. Informationen finden Sie unter *Geräte- und Softwarehandbücher* auf Seite 19.

Technische Unterstützung

Wenn Sie technische Unterstützung benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Illumina.

Tabelle 11 Allgemeine Kontaktinformationen für Illumina

Website	www.illumina.com
E-Mail	techsupport@illumina.com

Tabelle 12 Telefonnummern des Illumina-Kundendienstes

Region	Telefonnummer	Region	Telefonnummer
Nordamerika	1.800.809.4566	Italien	800.874909
Australien	1.800.775.688	Neuseeland	0800.451.650
Belgien	0800.81102	Niederlande	0800.0223859
Dänemark	80882346	Norwegen	800.16836
Deutschland	0800.180.8994	Österreich	0800.296575
Finnland	0800.918363	Schweden	020790181
Frankreich	0800.911850	Schweiz	0800.563118
Großbritannien	0800.917.0041	Spanien	900.812168
Irland	1.800.812949	Andere Länder	+44.1799.534000

Safety Data Sheets (Sicherheitsdatenblätter)

Sicherheitsdatenblätter (SDS) stehen auf der Illumina-Website unter support.illumina.com/sds.html zur Verfügung.

Produktdokumentation

Die Produktdokumentation steht auf der Illumina-Website im PDF-Format zum Herunterladen zur Verfügung. Gehen Sie zu support.illumina.com, wählen Sie ein Produkt aus und klicken Sie anschließend auf **Documentation & Literature** (Dokumentation und Literatur).



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornien 92122, USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (außerhalb von
Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.
Freddy van Riemsdijkweg 15
5657 EE Eindhoven
Niederlande

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