

Guida di consultazione per il saggio MiSeqDx[®] Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Introduzione	6
Informazioni preliminari	10
Guide ai software e alla strumentazione	19
Flusso di lavoro del saggio	21
Immissione delle informazioni per la corsa	22
Ibridazione del pool di oligonucleotidi	27
Rimozione di oligonucleotidi non legati	30
Estensione-ligazione degli oligonucleotidi legati	33
Amplificazione mediante PCR	34
Pulizia della PCR	38
Normalizzazione delle librerie	41
Raggruppamento delle librerie	45
Le novità	49
Assistenza tecnica	



Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente ad uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina, per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti, con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti, senza previa approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento, Illumina non trasferisce a terzi alcuna licenza ai sensi dei suoi brevetti, marchi, copyright, o diritti riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti simili di alcun genere.

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE PUÒ CAUSARE DANNI AL PRODOTTO, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I QUI DESCRITTI (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSO).

© 2020 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Illumina, MiSeqDx, la tonalità di arancione e la grafica del fluire delle basi sono marchi di fabbrica di Illumina, Inc. e/o delle sue affiliate negli Stati Uniti e/o in altri paesi. Tutti gli altri nomi, loghi e altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

AMPure, Beckman e Beckman Coulter sono marchi di fabbrica o marchi registrati di Beckman Coulter, Inc.

Cronologia revisioni

Documento n.	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15038346	03	Aprile 2020	<ul style="list-style-type: none">• Aggiornati gli indirizzi dei rappresentanti autorizzati nell'Unione Europea.• Aggiornato l'indirizzo dello sponsor Australiano.

Documento n.	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15038346	02	Agosto 2017	<ul style="list-style-type: none"> • Aggiornamento dell'etichetta relativa al Rappresentante autorizzato nella Comunità europea: Emergo Europe è stato sostituito da Illumina Cambridge Limited. • Aggiunte in tutta la guida informazioni per gli utenti del software Local Run Manager. • Modificato il titolo della sezione "Creazione di un foglio campioni" in "Preparazione delle informazioni sui campioni"; eseguiti cambiamenti minimi nella formulazione del testo della sezione di modo che sia valido sia per gli utenti di MiSeq Reporter che per quelli di Local Run Manager. • Aggiunte informazioni sul software di analisi in tempo reale RTA (Real Time Analysis) e sul ruolo di RTA nell'analisi primaria nella sezione "Sequenziamento automatico e analisi dei dati". • Aggiunta una nuova sezione intitolata "Metodi di interfaccia dello strumento MiSeqDx" per spiegare le differenze tra le funzioni dei software MiSeq Reporter e Local Run Manager, e come determinare quale software è stato installato con il proprio MiSeqDx. • Aggiunta una nuova sezione intitolata "Guide ai software e alla strumentazione". La sezione fornisce informazioni su quali guide utilizzare per i software e lo strumento in base alla configurazione relativa allo strumento del proprio MiSeqDx e al software di analisi installato con esso. • Aggiunta una sezione intitolata "Informazioni sulla corsa per il MiSeqDx" per presentare le differenze tra l'utilizzo di IWM e del modulo per il saggio CF Clinical Sequencing per Local Run Manager per l'immissione delle informazioni sui campioni e sulla corsa. • Ibridazione del pool di oligonucleotidi - Procedura: sostituita l'espressione "tutti i pozzetti contenenti DNA genomico" con "tutti i pozzetti di campione" per avere la certezza dell'inclusione del campione NTC. • Amplificazione della PCR - Preparazione: aggiunta una fase di centrifuga per la provetta della polimerasi per la PCR per assicurarsi che siano utilizzati volumi adeguati di polimerasi per la PCR. • Revisionato l'elenco degli acronimi: <ul style="list-style-type: none"> • Ridefinito NTC da Negative Template Control (controllo non template) a No Template Control (controllo senza template). • Eliminato il controllo positivo (POS).

Documento n.	Revisione	Data	Descrizione della modifica
15038346	01	Marzo 2017	<ul style="list-style-type: none"> • Apparecchiatura e materiali per pre-amplificazione: requisiti aggiornati per la centrifuga da tavolo. • Inserimento delle informazioni sui campioni: aggiunta una nota per la modifica dei foglio campioni solo in Illumina Worklist Manager. • Rimozione degli oligonucleotidi non legati - Preparazione: aggiunta un'avvertenza relativa al controllo della temperatura della centrifuga. • Per tutta la guida: aggiunte informazioni su sponsor Australia nella quarta di copertina.
15038346	B	Marzo 2015	<ul style="list-style-type: none"> • Per tutta la guida: aggiornate le informazioni sui marchi di fabbrica. • Per tutta la guida: aggiornate le informazioni sui marchi di conformità alle normative. • Inserire delle informazioni sui campioni: aggiunta una seconda frase alla fase 5. • Denaturazione e diluizione del campione di controllo interno PhiX: aggiornata la procedura di diluizione del campione di controllo PhiX.
15038346	A	Aprile 2014	<ul style="list-style-type: none"> • Versione iniziale

Introduzione

Uso previsto

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina è un sistema diagnostico *in vitro* per il sequenziamento mirato che sottopone a risequenziamento le regioni codificanti la proteina e i limiti introne/esone del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica *CFTR* in DNA genomico isolato da campioni di sangue periferico umano raccolti in K₂EDTA. Il test rileva le varianti di singolo nucleotide e Indel piccole nella regione sequenziata e inoltre riporta due mutazioni introniche profonde e due delezioni ampie. Il test è previsto per l'uso sullo strumento MiSeqDx Illumina.

Questo test è previsto per contribuire alla diagnosi in individui con sospetta fibrosi cistica (CF). Questo saggio è più appropriato quando il paziente presenta una fibrosi cistica atipica o non classica o quando altri pannelli di mutazioni non sono riusciti a identificare entrambe le mutazioni causanti la malattia. I risultati del test devono essere interpretati da un gruppo di genetisti molecolari certificati o da un esperto equivalente e devono essere usati assieme ad altre informazioni inclusi sintomi clinici, altri test diagnostici e anamnesi familiare.

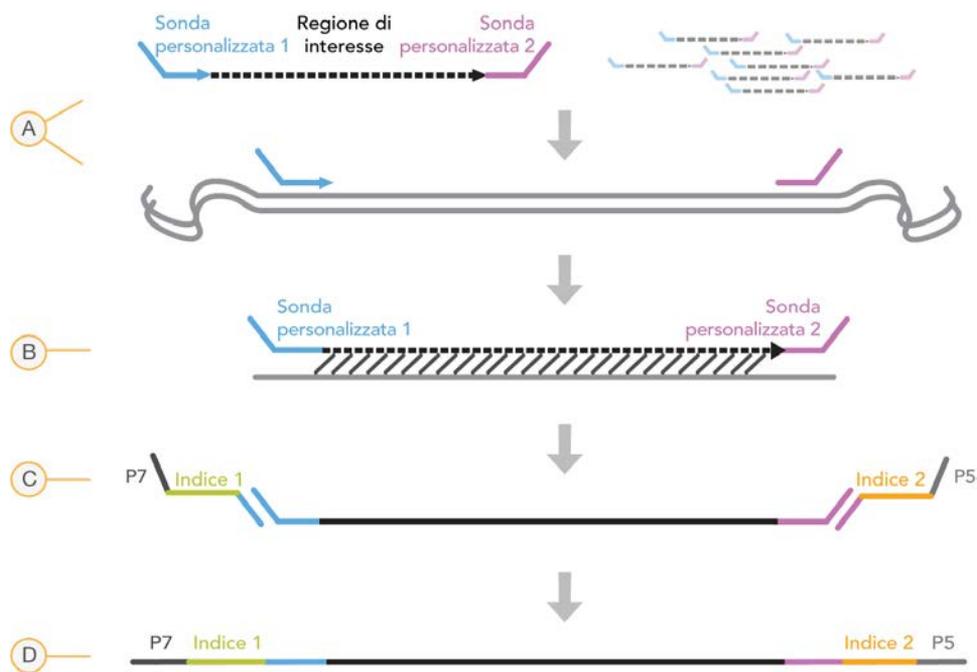
Questo test non è indicato per fini diagnostici indipendenti, diagnosi prenatale, analisi pre-impianto, screening del portatore, screening dei neonati o screening della popolazione.

Informazioni sulla guida

Nella presente guida di riferimento sono riportate istruzioni più dettagliate, suggerimenti sulle tecniche e cenni utili ai nuovi utenti formati per guidarli nell'esecuzione corretta del protocollo per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing. La guida ha valore di integrazione e non è intesa a sostituire l'insero della confezione.

Come funziona il saggio?

Per ciascun amplicone del gene *CFTR* è prevista una coppia di oligonucleotidi CF specifica. L'ibridazione di questi oligonucleotidi su DNA genomico avviene in una piastra a 96 pozzetti; successivamente il processo di estensione e ligazione forma templati di DNA costituiti dalle regioni di interesse affiancate da sequenze di primer universali. Mediante i primer indice forniti con il kit, i templati di DNA vengono amplificati mediante PCR, raggruppati in pool in una singola provetta e sequenziati sullo strumento MiSeqDx.



- A Ibridazione di sonde oligonucleotidiche personalizzate
- B Estensione e ligazione
- C Aggiunta di indici e adattatori di sequenziamento mediante PCR
- D Amplicone finale pronto per il sequenziamento con MiSeq

Panoramica del processo

Il processo del saggio Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing può essere riassunto nelle seguenti fasi:

Inserimento delle informazioni sui campioni

Innanzitutto, preparare le informazioni relative ai campioni da utilizzare su MiSeqDx per identificare ogni campione e l'indice corrispondente. Immettere l'ID dei campioni, gli indici e gli altri parametri applicabili alla piastra a 96 pozzetti. Per ulteriori informazioni, vedere la sezione relativa all'*Immissione delle informazioni per la corsa* a pagina 22.

Le informazioni sui campioni immesse su MiSeqDx possono essere utilizzate anche come guida per la configurazione della piastra durante il flusso di lavoro del saggio.

Preparazione delle librerie

Preparare le librerie utilizzando il protocollo descritto nei dettagli nella presente guida per l'utente.

Campioni di sequenziamento su MiSeqDx

Il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing deve essere sequenziato su uno strumento MiSeqDx che utilizzi una corsa paired-end da 150 cicli con doppia indicizzazione. Per istruzioni su come eseguire una corsa di sequenziamento su MiSeqDx, vedere la Guida di consultazione dello strumento MiSeqDx relativa alla propria configurazione. Vedere la sezione *Guide ai software e alla strumentazione* a pagina 19.

Sequenziamento automatico e analisi dei dati

La prima fase dell'analisi dei dati è denominata analisi primaria. Questo processo viene eseguito dal software di analisi in tempo reale RTA (Real Time Analysis) e ha come risultati l'identificazione delle basi e la valutazione della qualità. Nella fase successiva, denominata analisi secondaria, i dati relativi all'identificazione delle basi eseguita durante l'analisi primaria vengono elaborati per estrarre le informazioni relative a ciascun campione. L'analisi secondaria, eseguita dal software MiSeq Reporter o dal software Local Run Manager, comprende la separazione delle letture, la generazione del file FASTQ, l'allineamento, l'identificazione delle varianti e la generazione di file VCF contenenti le informazioni relative alle varianti trovate in determinate posizioni del genoma di riferimento.

MiSeq Reporter e Local Run Manager hanno funzioni identiche per l'analisi dei campioni e la creazione di report. La differenza principale tra i due software è il metodo con cui si interfacciano con lo strumento MiSeqDx. Per ulteriori informazioni sulle differenze tra MiSeq Reporter e Local Run Manager e per capire quale software è in uso, vedere la sezione *Metodi di interfaccia dello strumento MiSeqDx* a pagina 8.

Per ulteriori informazioni sul flusso di lavoro dell'analisi consultare le guide relative al software di analisi installato con il proprio MiSeqDx. Vedere la sezione *Guide ai software e alla strumentazione* a pagina 19.

Metodi di interfaccia dello strumento MiSeqDx

Esistono due metodi diversi per utilizzare lo strumento MiSeqDx disponibile per il saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing. Il metodo originale prevede l'utilizzo del software MiSeq Reporter insieme ai software Illumina Worklist Manager (IWM) e Illumina User Management Software. Il nuovo metodo prevede l'utilizzo del software Local Run Manager.

MiSeq Reporter e Local Run Manager hanno funzioni identiche per l'analisi dei campioni e la creazione di report.

Funzioni del software	Originale	Nuovo
Impostazione di una corsa per lo strumento MiSeqDx	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Configurazione dei campioni e monitoraggio	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Controllo dell'accesso utente	Software Illumina User Management	Local Run Manager
Esecuzione di analisi secondarie	MiSeq Reporter	Local Run Manager
Generazione di report	MiSeq Reporter	Local Run Manager

Eseguire i passi seguenti per verificare se Local Run Manager è in uso.

- 1 Accedere da remoto allo strumento MiSeqDx.
- 2 Quando richiesto, eseguire l'accesso.
- 3 Controllare che nella parte alta dello schermo sia visualizzata la dicitura "Local Run Manager".



NOTA

Se non viene richiesto di eseguire l'accesso quando ci si connette da remoto allo strumento significa che è in uso MiSeq Reporter.

Strumenti per il monitoraggio

Illumina fornisce i seguenti strumenti per il monitoraggio dei campioni e istruzioni per il laboratorio:

- ▶ È possibile utilizzare il **Modulo di monitoraggio del laboratorio** per registrare dati come il nome dell'operatore, le informazioni sui campioni e sugli indici, gli orari di inizio e fine, i numeri di lotto dei reagenti e i codici a barre.
- ▶ Per il software MiSeq Report viene utilizzato **Illumina Worklist Manager** per creare il foglio campioni mediante un'applicazione basata su una procedura guidata. Illumina Worklist Manager presenta una funzionalità atta a registrare i parametri per la piastra campioni, come l'ID del campione, gli indici doppi e altre caratteristiche applicabili alla corsa. Local Run Manager ha le stesse funzionalità. Tuttavia non è presente un foglio campioni indipendente. Inserire le informazioni di configurazione dei campioni direttamente nel modulo di analisi CF Clinical Sequencing per **Local Run Manager**.



NOTA

I documenti relativi al saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing di cui sopra possono essere scaricati dal sito Web Illumina. Accedere alla pagina di supporto del saggio Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing e fare clic sulla scheda **Documentation & Literature** (Documentazione e letteratura).

Informazioni preliminari

Questa sezione descrive il contenuto del kit per il saggio Illumina MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, le apparecchiature e i materiali di consumo utilizzati, le raccomandazioni per l'input di DNA e le procedure consigliate da applicare durante il protocollo.

Contenuto del kit per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Il kit per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina contiene i seguenti componenti. Conservare i componenti del kit alla temperatura indicata e in zone designate per la pre-amplificazione e la post-amplificazione.

Dato che i reagenti per la pre-amplificazione e la post-amplificazione vengono consegnati insieme, è importante disimballare i reagenti nella zona di pre-amplificazione del laboratorio e quindi spostare i reagenti per la post-amplificazione nell'apposita area di conservazione.

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 1

Tabella 1 Scatola 1A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi	1 provetta	600 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi mirati al gene <i>CFTR</i>	tra -25 °C e -15 °C
Hybridization Buffer (Tampone di ibridazione)	1 provetta	4.32 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e formammide	tra -25 °C e -15 °C
Extension-Ligation Mix	1 provetta	4.8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente una miscela proprietaria di DNA polimerasi, DNA ligasi e dNTP	tra -25 °C e -15 °C
Primer indice C (A503), D (A504) ed E (A505)	1 provetta per primer	192 µl	Primer per PCR con sequenze d'indice e adattatori di sequenziamento	tra -25 °C e -15 °C
Primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710)	1 provetta per primer	128 µl	Primer per PCR con sequenze d'indice e adattatori di sequenziamento	tra -25 °C e -15 °C
PCR polimerasi	1 provetta	56 µl	DNA polimerasi proprietaria	tra -25 °C e -15 °C
Master Mix per PCR	1 provetta	2.8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e dNTP	tra -25 °C e -15 °C

Tabella 2 Scatola 1B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Diluyente normalizzazione libreria	1 provetta	4.6 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra -25 °C e -15 °C
Tampone di diluizione libreria	1 provetta	4.5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra -25 °C e -15 °C
Campione di controllo interno PhiX	1 provetta	10 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA genomico PhiX	tra -25 °C e -15 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 2

Tabella 3 Scatola 2 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Contenuto	Conservazione
Cartuccia MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing	6 cartucce	Cartucce monouso che contengono reagenti per generazione di cluster e sequenziamento da usare con MiSeqDx, compresi formammide, 2-mercaptoetanolo e < 2% DMSO	tra -25 °C e -15 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 3

Tabella 4 Scatola 3A Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di lavaggio stringente	1 flacone	24 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Tampone di lavaggio universale	1 provetta	4.8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	tra 2 °C e 8 °C

Tabella 5 Scatola 3B Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Microsfere per la pulizia della PCR	1 provetta	5 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida e polietilene glicole	tra 2 °C e 8 °C
Lavaggio normalizzazione libreria	2 provette	4.8 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	tra 2 °C e 8 °C
Microsfere libreria	1 provetta	1.2 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida	tra 2 °C e 8 °C

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Cella a flusso MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing	6 contenitori	1 cella a flusso	Substrato di vetro con oligonucleotidi legati covalentemente	tra 2 °C e 8 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 4

Tabella 6 Scatola 4 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Soluzione SBS MiSeqDx (PR2) - saggio CF Clinical Sequencing	6 flaconi	353.1 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 2 °C e 8 °C

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing, Scatola 5

Tabella 7 Scatola 5 Reagenti pre-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Piastra filtro	6 piastre	N/A	Piastra di microtitolazione in polipropilene con una membrana in polietersulfone modificata	tra 15 °C e 30 °C

Tabella 8 Scatola 5 Reagenti post-amplificazione

Componente	Quantità	Volume di riempimento	Ingredienti attivi	Conservazione
Tampone di eluizione	1 provetta	4.8 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C
Tampone di conservazione libreria	1 provetta	3.5 ml	Soluzione acquosa tamponata	tra 15 °C e 30 °C

Reagenti richiesti, non forniti

Reagenti pre-amplificazione

- ▶ 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- ▶ Tampone TE
- ▶ Acqua priva di DNasi e di RNasi

Reagenti post-amplificazione

- ▶ 10 N NaOH (preparare da compresse o con una soluzione standard)
- ▶ Etanolo, 200 proof per biologia molecolare
- ▶ Tampone TE
- ▶ Acqua priva di DNasi e di RNasi

Apparecchiature e materiali

Apparecchiatura e materiali di consumo forniti, venduti separatamente

- 1 **Strumento MiSeqDx**, n. di catalogo DX-410-1001
- 2 **TruSeq Index Plate Fixture Kit**, n. di catalogo FC-130-1005
- 3 **TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit**, n. di catalogo FC-130-1007
- 4 **Tappi sostitutivi per adattatore indice**, n. di catalogo DX-502-1003

Apparecchiatura e materiali richiesti, non forniti

Apparecchiatura e materiali per pre-amplificazione

- 1 **Blocco termico**: è necessario un blocco termico per una piastra a 96 pozzetti. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione. Sono accettabili i blocchi termici con coperchi riscaldati.
 - Intervallo di temperatura: ambiente da +5 °C a 99 °C
 - Regolazione della temperatura: ± 0.1 °C a 37 °C; ± 0.4 °C a 60 °C
- 2 **Incubatore di campioni**: è necessario un incubatore (forno per ibridazione). L'incubatore deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione.
 - Intervallo di temperatura: da 10 °C a 100 °C
 - Regolazione della temperatura: ± 0.2 °C
- 3 **Centrifuga da tavolo**: è necessaria una centrifuga da tavolo con controllo della temperatura in grado di mantenere la temperatura di 20 °C. Come specificato sopra, nell'area di post-amplificazione è necessaria un'altra centrifuga. È possibile utilizzare una qualsiasi centrifuga per piastre compatibile con una piastra a 96 pozzetti con unità filtro e che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2.400 × g).
- 4 **Pipette di precisione**: è necessaria una serie di pipette di precisione. Come specificato sopra, nell'area di post-amplificazione è necessario un altro set. L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette monocanale che multicanale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume stabilito.
- 5 **Materiali di consumo**: sono necessari i seguenti materiali di consumo.
 - Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, polipropilene, o equivalente
 - Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)
 - Bacinella per soluzione, in PVC, priva di DNAasi e RNAasi (vaschetta)
 - Sigillo adesivo in alluminio
 - Sigillo per piastre PCR appropriato
 - Punte di pipette dotate di barriera aerosol

Apparecchiatura e materiali per post-amplificazione

- 1 **Termociclatore**: è necessario un termociclatore. Il termociclatore deve essere dotato di un coperchio riscaldato e soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
 - Intervallo di controllo della temperatura: da 4 °C a 99 °C
 - Accuratezza del controllo: $\pm 0,25$ °C da 35 °C a 99 °C

- 2 **Shaker per micropiastre:** nell'area adibita al laboratorio post-amplificazione è necessario uno shaker per micropiastre. Lo shaker per piastre deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione:
 - Velocità massima di miscelazione: 3.000 rpm
 - Intervallo di velocità di miscelazione: 200-3.000 rpm
- 3 **Centrifuga da tavolo:** è necessaria una centrifuga da tavolo in grado di mantenere la temperatura di 20 °C. Come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessaria un'altra centrifuga. Qualsiasi centrifuga per piastre che raggiunga le velocità previste dal protocollo (da 280 a 2.400 × g) è accettabile.
- 4 **Blocco termico:** è necessario un blocco termico per le provette. Il blocco termico deve soddisfare le seguenti specifiche di prestazione.
 - Intervallo di temperatura: ambiente da +5 °C a 99 °C
 - Regolazione della temperatura: ± 0,1 °C a 37 °C; ± 0,4 °C a 60 °C
- 5 **Supporto magnetico:** è necessario un supporto magnetico per una piastra a 96 pozzetti. Le prestazioni migliori si osservano quando i magneti si trovano sul lato del supporto e non nella parte inferiore.
- 6 **Pipette di precisione:** è necessaria una serie di pipette di precisione. Come specificato sopra, nell'area di pre-amplificazione è necessario un altro set. L'utilizzo di pipette di precisione è necessario per assicurare un'erogazione accurata di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette monocanale che multicanale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume stabilito.
- 7 **Materiali di consumo:** sono necessari i seguenti materiali di consumo:
 - Piastre skirted per PCR a 96 pozzetti, 0,2 ml, in polipropilene, o equivalente
 - Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)



NOTA

Assicurarsi che la piastra a 96 pozzetti sia compatibile con il supporto magnetico.

- Provette coniche, 15 ml
- Provette per microcentrifuga Eppendorf (sono consigliate quelle con tappo a vite)
- Strisce a otto provette per PCR
- Bacinelle per soluzione, in PVC, priva di DNasi e RNasi (vaschetta)
- Sigilli adesivi in alluminio
- Sigilli adesivi per piastra monouso
- Punte di pipette dotate di barriera aerosol

Prevenzione della contaminazione da PCR

La PCR è comunemente utilizzata in laboratorio per amplificare sequenze specifiche di DNA. Se non si adottano misure igieniche adeguate nel laboratorio, i prodotti della PCR possono contaminare i reagenti, gli strumenti e i campioni di DNA genomico, portando a risultati inesatti e inaffidabili. La contaminazione da PCR può interrompere i processi del laboratorio e ritardare sensibilmente il normale svolgimento del lavoro.

Accertarsi che il laboratorio abbia attuato le misure necessarie per ridurre il rischio di contaminazione da PCR.

- ▶ **Separare fisicamente le aree di pre-amplificazione e post-amplificazione**
 - Separare fisicamente gli spazi del laboratorio dove si eseguono i processi di pre-amplificazione (estrazione, quantificazione e normalizzazione del DNA) dagli spazi in cui si eseguono i processi di post-amplificazione.

- Non utilizzare mai lo stesso lavandino per lavare le vaschette utilizzate per la pre-amplificazione e la post-amplificazione.
- Non utilizzare mai lo stesso sistema di purificazione dell'acqua per i processi di pre-amplificazione e post-amplificazione.
- Conservare tutti i materiali usati per i protocolli nell'area di pre-amplificazione e portarli nell'area di post-amplificazione secondo necessità.
- ▶ **Utilizzare apparecchiature e materiali dedicati**
 - Dedicare set completi separati di apparecchiature e materiali (pipette, centrifughe, forno, blocco termico, ecc.) ai processi di pre-amplificazione e post-amplificazione del laboratorio e impedirne la condivisione tra le due aree.
 - Dedicare aree di conservazione separate (congelatori e frigoriferi) ai materiali di consumo pre-amplificazione e post-amplificazione.

Dato che i reagenti per la pre-amplificazione e la post-amplificazione vengono consegnati insieme, è importante disimballarli nell'area di pre-amplificazione del laboratorio e quindi spostare i reagenti per la post-amplificazione nell'apposita area di conservazione.

Procedure di pre-amplificazione e post-amplificazione per il laboratorio

Per impedire la contaminazione da PCR, è importante adottare procedure di laboratorio e attenersi alle pratiche migliori. Illumina consiglia di pulire ogni giorno e ogni settimana le aree del laboratorio con sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%).



ATTENZIONE

Onde evitare la degradazione del campione o del reagente, accertarsi che tutti i vapori della soluzione detergente si siano dissipati completamente prima di iniziare qualsiasi processo.

Pulizia quotidiana dell'area di pre-amplificazione

Una pulizia quotidiana dell'area di pre-amplificazione con sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%) contribuisce a eliminare i prodotti della PCR entrati nell'area di pre-amplificazione.

Identificare le aree di pre-amplificazione a maggior rischio di contaminazione e pulirle con una soluzione di sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%) prima di iniziare qualsiasi processo di pre-amplificazione. Aree ad alto rischio comprendono, in via esemplificativa, i seguenti elementi:

- ▶ Ripiani dei banchi
- ▶ Maniglie delle porte
- ▶ Maniglie di frigoriferi/congelatori
- ▶ Mouse del computer
- ▶ Tastiere

Pulizia quotidiana dell'area di post-amplificazione

Ridurre la quantità di prodotti della PCR nell'area di post-amplificazione contribuisce a ridurre il rischio di contaminazione nell'area di pre-amplificazione. La pulizia quotidiana dell'area di post-amplificazione mediante sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%) contribuisce a tale risultato.

Identificare le aree di post-amplificazione a maggior rischio di contaminazione e pulirle ogni giorno con una soluzione di sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%). Aree ad alto rischio comprendono, in via esemplificativa, i seguenti elementi:

- ▶ Termociclatori
- ▶ Area del banco utilizzata per elaborare il DNA amplificato
- ▶ Maniglie delle porte
- ▶ Maniglie di frigoriferi/congelatori
- ▶ Mouse del computer
- ▶ Tastiere

Pulizia settimanale di tutte le aree del laboratorio

Una volta alla settimana, eseguire una pulizia profonda delle aree di pre-amplificazione e post-amplificazione con sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%).

- ▶ Pulire i ripiani dei banchi e le superfici del laboratorio.
- ▶ Pulire tutti gli strumenti che non vengono puliti ogni giorno.
- ▶ Lavare a fondo i pavimenti del laboratorio.
- ▶ Assicurarci che il personale responsabile della pulizia settimanale sia adeguatamente preparato sulla prevenzione della contaminazione da PCR.

Oggetti caduti sul pavimento

Il pavimento è contaminato dai prodotti della PCR trasferiti sulle scarpe delle persone provenienti dall'area di post-amplificazione, pertanto qualsiasi oggetto che cada sul pavimento deve essere trattato come contaminato.

- ▶ Gli oggetti monouso caduti sul pavimento, come provette vuote, punte di pipette, guanti, appendiabiti devono essere smaltiti.
- ▶ Gli oggetti non monouso caduti sul pavimento, come una pipetta o un contenitore di campioni importante, devono essere puliti immediatamente e a fondo con soluzione di sodio ipoclorito allo 0,5% (candeggina al 10%) per rimuovere la contaminazione da PCR.
- ▶ Pulire qualsiasi superficie del laboratorio entrata in contatto con l'oggetto contaminato. Le persone che manipolano qualsiasi oggetto caduto sul pavimento, monouso o non, devono smaltire i propri guanti da laboratorio e indossarne un paio nuovo.

Precauzioni

Durante la preparazione delle librerie per il sequenziamento mediante il presente protocollo, attenersi alle seguenti raccomandazioni.

Garantire la coerenza

- ▶ **Utilizzare pipette multicanale:** per garantire la coerenza fra i campioni, ove possibile, utilizzare una pipetta multicanale. Calibrare le pipette regolarmente.
- ▶ **Coerenza per preparazioni di campioni più piccoli:** ciascuna provetta di reagente fornita con il kit contiene un volume sufficiente a produrre risultati usando pipette manuali e vaschette di reagenti seguendo le tecniche standard di laboratorio. Per garantire la precisione nell'erogazione dei volumi dei reagenti, pipettare singolarmente i reagenti in ciascun pozzetto o pipettare con una pipetta multicanale in una striscia a otto provette per PCR.

Manipolazione delle microsfere magnetiche

- ▶ **Utilizzo a temperatura ambiente:** prima dell'uso, lasciare che le microsfere raggiungano la temperatura ambiente.
- ▶ **Agitare fino a sospensione completa:** immediatamente prima dell'uso, agitare le microsfere finché raggiungono la completa sospensione e il colore appare omogeneo.
- ▶ **Miscelare a fondo i campioni:** dopo aver aggiunto le microsfere ai campioni, miscelare a fondo pipettando su e giù dieci volte. Illumina consiglia anche di utilizzare uno shaker per miscelare a fondo i campioni.
- ▶ **Consentire un legame massimo:** per ottenere i risultati migliori, incubare le miscele di microsfere/campioni a temperatura ambiente per tutta la durata indicata sul protocollo.
- ▶ **Aspirare lentamente la soluzione trasparente:** dopo aver posizionato la piastra sul supporto magnetico, attendere finché la soluzione diventa trasparente prima di procedere. Tenere la piastra sul supporto magnetico durante l'aspirazione lenta della soluzione trasparente, facendo attenzione a non toccare le microsfere separate.

Evitare la contaminazione incrociata

- ▶ **Sostituire le punte fra l'erogazione dei reagenti e dei campioni:** utilizzare sempre punte di pipette nuove fra l'erogazione dei reagenti e quella dei campioni.
- ▶ **Miscelare le piastre seguendo le indicazioni:** miscelare i campioni con una pipetta multicanale e centrifugare la piastra quando indicato. Non agitare le piastre.
- ▶ **Utilizzare punte dotate di barriera aerosol:** l'utilizzo di punte di pipette dotate di barriera aerosol riduce il rischio di contaminazione incrociata da carry-over di ampliconi o da campione a campione.

Lavaggio con etanolo all'80% durante la fase di pulizia della PCR

- ▶ **Preparare sempre al momento etanolo all'80%:** preparare sempre al momento etanolo all'80% per le fasi di lavaggio. L'etanolo può assorbire l'acqua dall'aria e influire sui risultati.
- ▶ **Rimuovere tutto l'etanolo dai pozzetti:** assicurarsi che tutto l'etanolo venga rimosso dal fondo dei pozzetti, in quanto può contenere residui di contaminanti. Utilizzare una pipetta multicanale P20 per rimuovere l'etanolo residuo e accelerare l'asciugatura.
- ▶ **Consentire l'evaporazione completa:** consentire un tempo di asciugatura di almeno cinque minuti fuori dal supporto magnetico a temperatura ambiente per l'evaporazione completa. L'etanolo residuo può influire sulle prestazioni delle reazioni successive.

Requisiti di input di DNA

- ▶ Il protocollo del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina richiede 250 ng di DNA genomico. Illumina consiglia vivamente di quantificare il materiale genomico iniziale.
- ▶ **Quantificazione del DNA di input:** quantificare il materiale genomico iniziale mediante metodi spettrofotometrici UV basati su letture OD A260/A280.
- ▶ **Valutazione della qualità del DNA:** per quantificare il DNA si utilizzano le misurazioni solitamente utilizzate dell'assorbanza a 260nm . Il rapporto fra l'assorbanza a 260 nm e a 280 nm viene utilizzato come indicazione di purezza del campione. Il protocollo è ottimizzato per DNA con valori del rapporto di assorbanza maggiori di 1,5.

Controlli qualità

- ▶ Le buone pratiche di laboratorio dispongono che in ogni corsa siano inclusi un campione di DNA di controllo positivo e un campione di controllo negativo (non templato).
- ▶ Il campione di DNA di controllo positivo deve essere un campione ben caratterizzato con una mutazione nota del CFTR.
- ▶ Illumina consiglia anche di includere in ciascuna corsa un controllo del wild type.

Acronimi

Tabella 9 Acronimi del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina

Acronimo	Definizione
AMP	Piastra di amplificazione
CLP	Piastra di pulizia
DAL	Libreria di ampliconi diluita
FPU	Unità piastra filtro
HYB	Piastra di ibridazione
LNP	Piastra di normalizzazione della libreria
NTC	Controllo senza template
PAL	Libreria di ampliconi raggruppati in pool
SGP	Piastra di conservazione

Guide ai software e alla strumentazione

Le guide ai software e alla strumentazione da utilizzare con il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing di Illumina sono diverse a seconda della configurazione del disco su cui si trova lo strumento MiSeqDx e del software di analisi installato con esso. Clini

Se non si è certi di quale software sia installato con MiSeqDx, vedere la sezione *Metodi di interfaccia dello strumento MiSeqDx* a pagina 8. Se non si è certi della configurazione del disco di MiSeqDx contattare il supporto tecnico di Illumina.

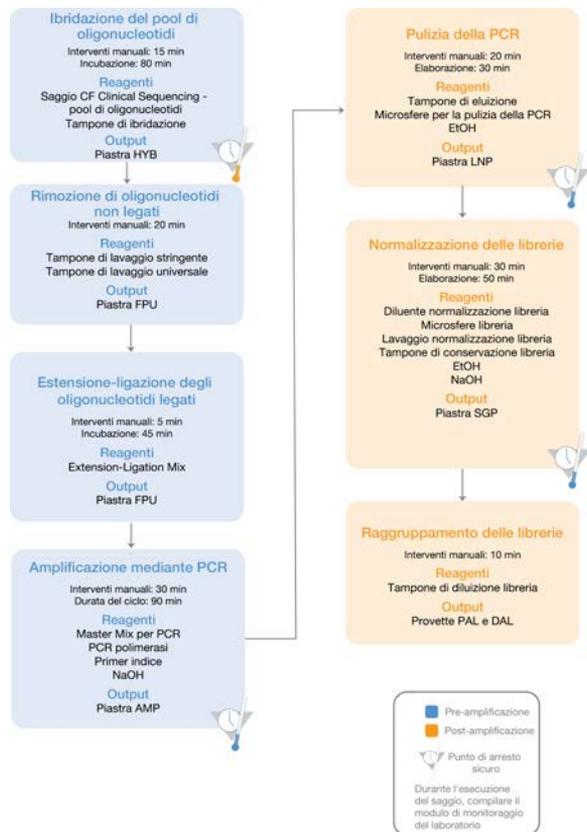
Guide	Disco dual boot con il software Local Run Manager	Disco dual boot con il software MiSeq Reporter	Disco singolo con il software MiSeq Reporter
<p><i>Guida alla preparazione della sede di installazione di MiSeqDx per strumenti con configurazione dual boot (documento n. 15070066)</i></p> <p>Guida alla preparazione della sede di installazione</p>	x	x	
<p><i>Guida di consultazione dello strumento MiSeqDx per MOS v2 (documento n. 100000021961)</i></p> <p>Guida di consultazione dello strumento</p>	x		
<p><i>Guida di riferimento del software Local Run Manager per MiSeqDx (documento n. 1000000011880)</i></p> <p>Guida al software di analisi</p>	x		
<p><i>Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi CF Clinical Sequencing per Local Run Manager (documento n. 1000000012185)</i></p> <p>Guida al software di analisi</p>	x		
<p><i>Guida di consultazione di MiSeqDx per strumenti con configurazione dual boot (documento n. 15070067)</i></p> <p>Guida di consultazione dello strumento</p>		x	

Guide	Disco dual boot con il software Local Run Manager	Disco dual boot con il software MiSeq Reporter	Disco singolo con il software MiSeq Reporter
<p><i>Guida alla preparazione della sede di installazione dello strumento MiSeqDx (documento n. 15038351)</i></p> <p>Guida alla preparazione della sede di installazione</p>			x
<p><i>Guida di consultazione dello strumento MiSeqDx (documento n. 15038353)</i></p> <p>Guida di consultazione dello strumento</p>			x
<p><i>Guida del software MiSeq Reporter (documento n. 15038356)</i></p> <p>Guida al software di analisi</p>		x	x
<p><i>Guida alla sicurezza e conformità dello strumento MiSeqDx (documento n. 15034477)</i></p> <p>Guida sulla sicurezza e conformità dello strumento</p>	x	x	x

Flusso di lavoro del saggio

Il seguente diagramma illustra il flusso di lavoro del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina. Fra i vari passaggi sono contrassegnati i punti di arresto sicuri.

Figura 1 Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina Flusso di lavoro



Immissione delle informazioni per la corsa

MiSeq Reporter e Local Run Manager sono i due software con cui è possibile impostare una corsa del saggio Cystic Fibrosis Clinical Sequencing. Per le informazioni complete consultare le guide dei software di analisi per la propria configurazione elencate nella sezione *Guide ai software e alla strumentazione* a pagina 19.

Se si utilizza il software MiSeq Reporter, utilizzare Illumina Worklist Manager per generare un foglio campioni.

Se si utilizza il software Local Run Manager, non è presente un foglio campioni indipendente. Inserire le informazioni di configurazione dei campioni e della corsa direttamente nel modulo di analisi CF Clinical Sequencing per Local Run Manager.

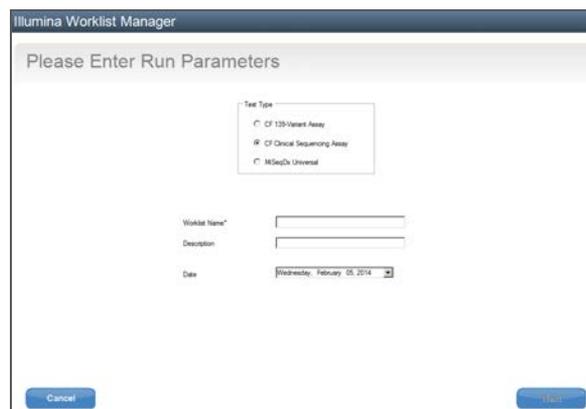
Per ulteriori informazioni sulle differenze tra MiSeq Reporter e Local Run Manager, vedere la sezione *Metodi di interfaccia dello strumento MiSeqDx* a pagina 8.

Utilizzo di Illumina Worklist Manager (IWM)

Preparazione del foglio campioni MiSeqDx

- 1 Dalla schermata Welcome (Benvenuto) di Illumina Worklist Manager, selezionare **Create Worklist** (Crea lista di lavoro). Viene visualizzata la schermata Enter Run Parameters (Immetti parametri della corsa).

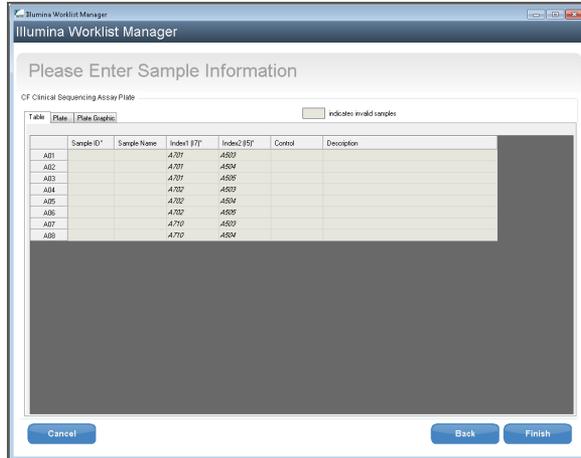
Figura 2 Illumina Worklist Manager, schermata Enter Run Parameters (Immetti parametri della corsa)



- 2 Nel campo di testo, selezionare **CF Clinical Sequencing Assay** (Saggio CF Clinical Sequencing).
- 3 Nel campo Worklist Name (Nome lista di lavoro), immettere un nome per il foglio campioni. Questo è un campo obbligatorio.
 - Se per il nome del foglio campioni viene utilizzato l'ID alfanumerico del codice a barre della cartuccia di reagenti, MiSeq Operating Software (MOS) troverà automaticamente il foglio campioni. L'ID del codice a barre si trova sull'etichetta della cartuccia di reagenti proprio sotto il codice a barre.
 - Se per il foglio campioni viene utilizzato un qualsiasi altro nome, il pulsante **Browse** (Sfoglia) in MiSeq Operating Software (MOS) può essere utilizzato per trovare il foglio campioni corretto.
- 4 **[Opzionale]** Immettere una descrizione per identificare la corsa.

- 5 Assicurarsi che la data corrisponda alla data di inizio della corsa. La data attuale appare per impostazione predefinita.
- 6 Selezionare **Next** (Avanti). Viene visualizzata la schermata Enter Sample Information (Immetti informazioni campioni).

Figura 3 Illumina Worklist Manager, schermata Enter Sample Information (Immetti informazioni sui campioni)



Inserimento delle informazioni sui campioni

- 1 Nella scheda Table (Tabella) o nella scheda Plate (Piastra), inserire le seguenti informazioni per ogni pozzetto contenente campione:
 - a **Sample ID** (ID campione): inserire un ID campione univoco. L'ID campione viene usato per monitorare il campione dalla preparazione al sequenziamento fino all'analisi. Normalmente, l'ID è un codice a barre; tuttavia, è accettabile qualsiasi valore.
 - b **Index 1 e Index 2** (Indice 1 e Indice 2): specificare l'adattatore indice che sarà utilizzato per ogni Index Read (Lettura indici). Illumina consiglia di utilizzare le combinazioni che producono almeno una base A o C (rosso) e almeno una base G o T (verde) per ogni ciclo.



NOTA

Per informazioni su come scegliere gli indici appropriati, vedere *Rendimento dei campioni e rappresentazione dell'indice* a pagina 26.

- 2 **[Facoltativo]** Per registrare informazioni più dettagliate sui campioni, inserire il nome e la descrizione di un campione.
- 3 **[Facoltativo]** Per identificare i controlli sulla piastra, selezionare Negative (Negativo) o Positive (Positivo) dal menu a discesa **Control** (Controllo).
- 4 Andare alla scheda Plate Graphic (Schema piastra) e utilizzare l'opzione **Copy to Clipboard** (Copia in appunti) o **Print** (Stampa) per acquisire un'immagine della piastra campioni.

Figura 4 Illumina Worklist Manager, scheda Plate Graphic (Schema piastra)

- 5 Selezionare **Finish** (Termina). Quando si salva il foglio campioni, il software crea un file .csv e un file .png di Plate Graphic (Schema piastra) automaticamente e li salva nella stessa posizione da utilizzare con l'impostazione dell'esperimento.



NOTA

Utilizzare Illumina Worklist Manager esclusivamente per modificare le informazioni del foglio campioni. Se le modifiche non vengono eseguite mediante Illumina Worklist Manager la corsa o l'analisi potrebbe non riuscire.

Utilizzo del modulo di analisi CF Clinical Sequencing per Local Run Manager

Impostazione dei parametri

- 1 Accedere a Local Run Manager.
- 2 Fare clic su **Create Run** (Crea corsa) e selezionare **CF Clinical**.
- 3 Immettere un nome che identifichi la corsa dal sequenziamento fino all'analisi. Utilizzare caratteri alfanumerici, spazi, trattini bassi o trattini.
- 4 [Facoltativo] Immettere una descrizione per identificare la corsa. Utilizzare caratteri alfanumerici.

Impostazione dei campioni per la corsa

Specificare i campioni per la corsa mediante una delle seguenti opzioni:

- ▶ **Immissione manuale dei campioni:** utilizzare la tabella vuota che si trova nella schermata Create Run (Crea corsa). Sono evidenziati i pozzetti di campione suggeriti.
- ▶ **Importazione dei campioni:** individuare un file esterno in un formato con valori separati da virgole (*.csv). Dalla schermata Create Run (Crea corsa) è possibile scaricare un modello.

Dopo aver popolato la tabella dei campioni, è possibile esportare le informazioni sui campioni in un file esterno e utilizzare il file come riferimento quando si preparano le librerie o si importa il file per un'altra corsa.

Immissione manuale dei campioni

- 1 Immettere un nome del campione univoco nel campo Sample Name (Nome del campione).
Utilizzare caratteri alfanumerici, trattini o trattini bassi.
- 2 Fare clic con il pulsante destro del mouse e selezionare i campioni di controllo positivo e negativo.
- 3 [Facoltativo] Immettere una descrizione del campione nella scheda Sample Description (Descrizione del campione).
Utilizzare caratteri alfanumerici, trattini, trattini bassi o spazi.
- 4 [Facoltativo] Selezionare un adattatore indice 1 dall'elenco a discesa Index 1 (i7) (Indice 1 - i7).
Questo passaggio è facoltativo perché le combinazioni di indici i7 e i5 che popolano automaticamente i pozzetti soddisfano già i requisiti di diversità degli indici.
- 5 [Facoltativo] Selezionare un adattatore con indice 2 dall'elenco a discesa Index 2 (i5) (Indice 2 - i5).
Questo passaggio è facoltativo perché le combinazioni di indici i7 e i5 che popolano automaticamente i pozzetti soddisfano già i requisiti di diversità degli indici.
- 6 Fare clic sull'icona  **Print** (Stampa) per visualizzare il layout della piastra.
- 7 Selezionare **Print** (Stampa) per stampare il layout della piastra da utilizzare come riferimento per la preparazione delle librerie.
- 8 [Facoltativo] Fare clic su **Export** (Esporta) per esportare le informazioni sui campioni in un file esterno.
- 9 Fare clic su **Save Run** (Salva corsa).

Importazione dei campioni

- 1 Fare clic su **Import Samples** (Importa campioni) e andare alla posizione in cui si trova il file contenente le informazioni sui campioni. Possono essere importati due tipi di file.
 - ▶ Fare clic su **Template** (Modello) per creare il layout di una nuova piastra. Il file modello contiene le intestazioni di colonna corrette per eseguire l'importazione. In ciascuna colonna, immettere le informazioni sui campioni da analizzare nella corsa. Eliminare le informazioni di esempio nelle caselle non utilizzate, quindi salvare il file.

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

- ▶ Utilizzare un file contenente le informazioni sui campioni esportato dal modulo Workflow analysis (analisi del flusso di lavoro) mediante la funzione Export (Esporta).
- 2 Fare clic sull'icona  **Print** (Stampa) per visualizzare il layout della piastra.
- 3 Selezionare **Print** (Stampa) per stampare il layout della piastra da utilizzare come riferimento per la preparazione delle librerie.
- 4 [Facoltativo] Fare clic su **Export** (Esporta) per esportare le informazioni sui campioni in un file esterno.
- 5 Fare clic su **Save Run** (Salva corsa).

Rendimento dei campioni e rappresentazione dell'indice

Per il saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina, il rendimento dei campioni per la corsa MiSeqDx è di 8 campioni. I primer di indicizzazione usati durante l'amplificazione mediante PCR devono essere scelti in base al rendimento dei campioni finale desiderato per garantire diversità nella sequenza d'indice.

MiSeqDx utilizza un LED verde per il sequenziamento delle basi G/T e un LED rosso per il sequenziamento delle basi A/C. Per garantire la corretta registrazione, a ogni ciclo deve essere letto almeno uno dei due nucleotidi per ciascun canale cromatico. È importante conservare l'equilibrio cromatico per ciascuna base della lettura indici sequenziata, altrimenti potrebbe verificarsi un problema di registrazione durante il sequenziamento della Index Read (Lettura indici).

Utilizzare il seguente set minimo di indici con bilanciamento dei colori per corse di sequenziamento di otto campioni:

Tabella 10 Combinazioni primer indice per corse di sequenziamento a 8 campioni

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

Se non sono disponibili sei campioni univoci (esclusi i controlli positivi e negativi), è accettabile completare la corsa con replicati di qualsiasi campione di DNA genomico umano.

Ibridazione del pool di oligonucleotidi

Questo passaggio consiste nell'ibridazione del pool di oligonucleotidi per la fibrosi cistica contenente a monte e a valle oligonucleotidi specifici del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR) con campioni di DNA genomico.



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 1 ora e 35 minuti
- ▶ Interventi manuali: 15 minuti

Materiali di consumo

Item	Quantità	Conservazione	Fornito da
Saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Tampone di ibridazione	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
DNA genomico (quantità consigliata: 50 ng/μl)	5 μl	tra -25 °C e -15 °C	Utente
Piastra skirted per PCR a 96 pozzetti	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Sigillo adesivo in alluminio	2 sigilli	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Vaschette sterili	Secondo necessità	tra 15 °C e 30 °C	Utente

Preparazione

- 1 Rimuovere il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi, il tampone di ibridazione, i campioni di DNA genomico e il campione di controllo positivo dal luogo di conservazione con temperatura tra -25 °C e -15 °C e scongelare a temperatura ambiente.
- 2 Agitare energicamente il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi e il tampone di ibridazione per accertarsi che tutti i precipitati si sciolgano completamente, quindi centrifugare brevemente le provette per recuperare il liquido.



NOTA

Prima di utilizzare il tampone di ibridazione, tenere la provetta davanti a una luce ed eseguire un controllo visivo per assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente disciolti.

- 3 Impostare un blocco termico per piastra a 96 pozzetti su 95 °C.

- 4 Preriscaldare un incubatore a 37 °C per prepararsi alla fase di estensione-ligazione.
- 5 Creare la piastra campioni in base all'immagine stampata da Illumina Worklist Manager o Local Run Manager. Controllare la corrispondenza della posizione dei controlli positivi e negativi. Illumina consiglia di analizzare i campioni in lotti non inferiori a otto.



NOTA

L'uso dei controlli consente all'Assistenza tecnica Illumina di garantire un'assistenza efficace nella risoluzione dei problemi. L'Assistenza tecnica Illumina non fornisce assistenza a meno che queste reazioni di controllo siano state incluse nella corsa.

Procedura

- 1 Etichettare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti "**HYB_Plate_ID**".
- 2 Dispensare 5 µl di campione o campione di controllo a 50 ng/µl (250 ng totali) nei pozzetti appropriati nella piastra **HYB**. Seguire il layout della piastra generato per la corretta selezione dei pozzetti.



NOTA

Verificare che il layout dei campioni di DNA e le posizioni dei controlli positivi e negativi corrispondano allo schema della piastra.

- 3 Utilizzando una pipetta multicanale, dispensare 5 µl del saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi in tutti i pozzetti di campione. Cambiare le punte dopo ciascuna colonna onde evitare una contaminazione incrociata.
- 4 Utilizzando una pipetta multicanale, dispensare 40 µl di tampone di ibridazione in ogni pozzetto contenente campione sulla piastra **HYB**. Pipettare delicatamente su e giù 3-5 volte per miscelare. Cambiare le punte dopo ciascuna colonna onde evitare una contaminazione incrociata.



NOTA

Assicurarsi che eventuali cristalli o precipitato nel tampone di ibridazione si siano disciolti.



NOTA

Non miscelare il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi e il tampone di ibridazione per la conservazione. Se combinati, il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi diventa instabile, anche se congelato.

- 5 Sigillare la piastra **HYB** con un foglio di alluminio adesivo e assicurare la chiusura con un rullo di gomma o un cuneo sigillante.
- 6 Centrifugare a 1.000 × g a 20 °C per un minuto.
- 7 Inserire la piastra **HYB** nel blocco preriscaldato a 95 °C e incubare per 1 minuto.

- 8 Ridurre la temperatura del blocco termico preriscaldato a 40 °C e proseguire l'incubazione fino a quando il blocco di calore raggiunge i 40 °C. Il tempo di rampa è di circa 80 minuti.



NOTA

Durante l'incubazione, la temperatura del blocco termico si riduce gradualmente da 95 °C a 40 °C. Tipicamente questo processo richiede 80 minuti. Questo raffreddamento graduale è essenziale per un'ibridazione corretta; pertanto, per questo processo non si consigliano termociclatori per PCR con raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente).



PUNTO DI ARRESTO SICURO

Quando il blocco termico raggiunge i 40 °C, la piastra **HYB** è stabile a una temperatura di 40 °C per due ore.

Rimozione di oligonucleotidi non legati

Questo processo consiste nella rimozione di oligonucleotidi non legati dal DNA genomico mediante un filtro in grado di selezionare le dimensioni. Due fasi di lavaggio con il tampone di lavaggio stringente garantiscono la rimozione completa degli oligonucleotidi non legati. Una terza fase di lavaggio con il tampone di lavaggio universale rimuove i residui di tampone di lavaggio stringente e prepara i campioni per la fase di estensione-ligazione.



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 20 minuti
- ▶ Interventi manuali: 20 minuti

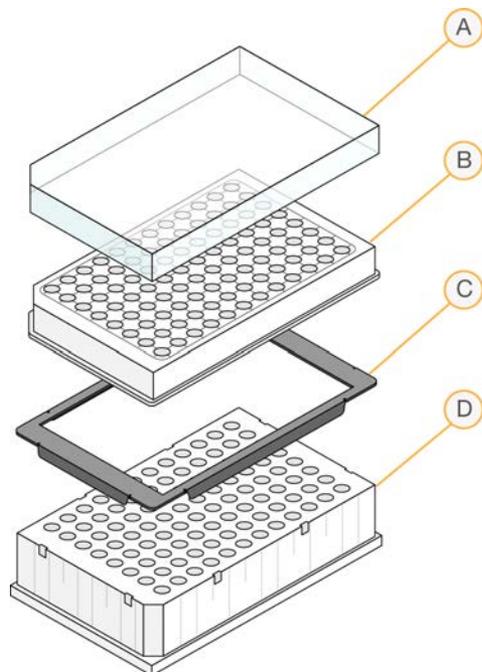
Materiali di consumo

Item	Quantità	Conservazione	Fornito da
Extension-Ligation Mix	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Tampone di lavaggio stringente	1 flacone	tra 2 °C e 8 °C	Illumina
Tampone di lavaggio universale	1 provetta	tra 2 °C e 8 °C	Illumina
Piastra filtro	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	Illumina
Colletto adattatore	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	Illumina
Piastra MIDI	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Vaschette	Secondo necessità	tra 15 °C e 30 °C	Utente

Preparazione

- 1 Prelevare Extension-Ligation Mix dalla temperatura di conservazione compresa tra -25 °C e -15 °C e scongelare a temperatura ambiente. Extension-Ligation Mix viene utilizzato nella fase di estensione-ligazione e impiega circa 20 minuti per scongelarsi.
- 2 Prelevare il tampone di lavaggio stringente e il tampone di lavaggio universale dalla temperatura di conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C e tenerli da parte a temperatura ambiente.
- 3 Assemblare l'unità piastra filtro (FPU) nell'ordine seguente (dall'alto verso il basso):

Figura 5 Gruppo unità piastra filtro



- A Coperchio
- B Piastra filtro
- C Colletto adattatore
- D Piastra MIDI

- 4 Etichettare la piastra filtro "**FPU_Plate_ID**". L'ID piastra deve corrispondere all'ID utilizzato per la piastra **HYB**.
- 5 Pre-lavare la membrana della piastra filtro nel modo seguente:
 - a Con una pipetta multicanale, dispensare 45 μ l di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto.
 - b Coprire la piastra **FPU** con il coperchio della piastra filtro e tenerla coperta durante ogni fase di centrifugazione.
 - c Centrifugare la piastra **FPU** a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per cinque minuti.



NOTA

Verificare che tutti i pozzetti della piastra filtro siano completamente drenati. Se il tampone di lavaggio non fa defluire completamente il liquido, centrifugare di nuovo a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ finché tutto il liquido non viene espulso (ulteriori 5-10 minuti).



ATTENZIONE

Durante le fasi di lavaggio è fondamentale controllare la temperatura della centrifuga. Se la temperatura raggiunge i $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, o una temperatura maggiore, questa potrebbe provocare un legame dei primer più stringente. In casi rari, se i campioni presentano varianti di singolo nucleotide (Single Nucleotide Variant, SNV) nelle regioni di legame dei primer, la maggiore rigidità potrebbe portare a una perdita di alleli.

Procedura

- 1 Una volta completata l'ibridazione, confermare che il blocco termico si sia raffreddato a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mentre la piastra **HYB** si trova ancora nel blocco termico, rinforzare i sigilli con un rullo di gomma o un cuneo sigillante. Se non si raggiungono i $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 80 minuti, continuare a incubare fino al raffreddamento del blocco termico a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- 2 Estrarre la piastra **HYB** dal blocco termico e centrifugare a $1.000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per un minuto per raccogliere il condensato.
- 3 Con una pipetta multicanale impostata su $60\ \mu\text{l}$, trasferire l'intero volume di ciascun campione nel centro dei corrispondenti pozzetti precedentemente lavati della piastra filtro. Cambiare le punte dopo ciascuna colonna onde evitare una contaminazione incrociata.
- 4 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 5 minuti.
- 5 Lavare la piastra filtro nel modo seguente:
 - a Con una pipetta multicanale, dispensare $45\ \mu\text{l}$ di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto contenente il campione.
Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
 - b Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 5 minuti.



NOTA

Se il tampone di lavaggio non fa defluire completamente il liquido, centrifugare di nuovo a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ finché tutto il liquido non viene espulso (ulteriori 5-10 minuti).

- 6 Ripetere il lavaggio nel modo seguente:
 - a Con una pipetta multicanale, dispensare $45\ \mu\text{l}$ di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto contenente il campione.
Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
 - b Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 5 minuti.
 - c Se il tampone di lavaggio non fa defluire completamente il liquido, centrifugare nuovamente la piastra filtro a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per cinque minuti.
- 7 Smaltire tutto il materiale defluito (contenente formammide) raccolto fino a quel momento in un apposito contenitore per rifiuti pericolosi, quindi riassemblare la piastra **FPU**. La stessa piastra **MIDI** può essere riutilizzata per il resto del processo di pre-amplificazione.
- 8 Con una pipetta multicanale, dispensare $45\ \mu\text{l}$ di tampone di lavaggio universale in ciascun pozzetto contenente il campione.
Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
- 9 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti.



NOTA

Accertarsi che tutto il liquido sia defluito dopo la centrifugazione. Se necessario, ripetere la centrifugazione. I residui di tampone di lavaggio potrebbero inibire le successive reazioni enzimatiche.

Estensione-ligazione degli oligonucleotidi legati

Questo processo collega gli oligonucleotidi ibridati a monte e a valle. Una DNA polimerasi si estende dall'oligonucleotide a monte fino alla regione target e successivamente si lega all'estremità 5' dell'oligonucleotide a valle mediante una DNA ligasi. Il risultato consiste nella formazione di prodotti contenenti le regioni di interesse target affiancate da sequenze necessarie per l'amplificazione.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 50 minuti
- ▶ Interventi manuali: 5 minuti

Materiali di consumo

Item	Quantità	Conservazione	Fornito da
Extension-Ligation Mix	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Sigillo adesivo in alluminio	1 sigillo	tra 15 °C e 30 °C	User (Utente)
Vaschette	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	User (Utente)

Procedura

- 1 Utilizzando una pipetta multicanale, dispensare 45 µl di Extension-Ligation Mix in ogni pozzetto contenente campione sulla piastra filtro. La reazione di estensione-ligazione si verifica sulla membrana della piastra filtro.
Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si presta attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
- 2 Sigillare la piastra filtro con un foglio di alluminio adesivo, quindi coprire con il coperchio per fissare il foglio durante l'incubazione.
- 3 Incubare l'intero gruppo **FPU** nell'incubatore preriscaldato a 37 °C per 45 minuti.
- 4 Durante l'incubazione della piastra **FPU**, preparare la piastra AMP (Piastra di amplificazione) come descritto nella prossima sezione.

Amplificazione mediante PCR

Questo passaggio consiste nell'amplificazione dei prodotti del processo di estensione-ligazione mediante primer che aggiungono sequenze d'indici per il multiplex campioni, oltre a comuni adattatori necessari per la generazione di cluster.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: ~ 90 minuti
- ▶ Interventi manuali: 30 minuti

Materiali di consumo

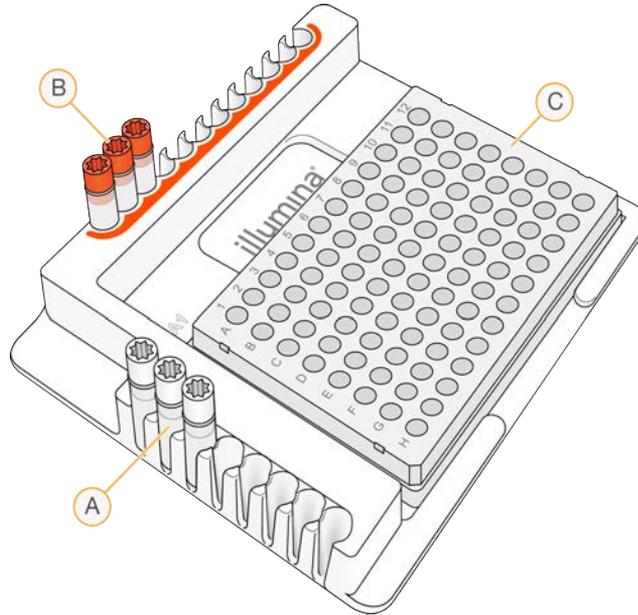
Item	Quantità	Conservazione	Fornito da
Master Mix per PCR	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Primer indice C (A503), D (A504) ed E (A505)	1 provetta per primer	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710)	1 provetta per primer	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
PCR polimerasi	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Sigillo per piastre PCR appropriato	1	tra 15 °C e 30 °C	User (Utente)
0.05 N NaOH preparato al momento	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	User (Utente)
Piastra skirted per PCR a 96 pozzetti	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	User (Utente)
Vaschette	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	User (Utente)

Preparazione

- 1 Preparare 0,05 N di NaOH al momento aggiungendo 25 µl di 10 N di NaOH a 4975 µl di acqua priva di RNasi/DNasi.
- 2 Determinare i primer indice da utilizzare in base alla stampa dello schema della piastra di Illumina Worklist Manager o Local Run Manager.
- 3 Rimuovere Master Mix per PCR e i primer indice appropriati dal luogo di conservazione tra -25 °C e -15 °C, quindi scongelarli sul banco a temperatura ambiente.
Per lo scongelamento dei reagenti, attendere circa 20 minuti.
- 4 Dopo che i primer indice sono completamente scongelati, agitare ogni provetta per miscelare e centrifugare brevemente le provette in una microcentrifuga. Utilizzare provette Eppendorf da 1,7 ml come adattatori per la microcentrifuga.

- 5 Disporre i primer in un rack utilizzando le disposizioni seguenti:
 - a Disporre le provette dei primer indice C (A503), D (A504) ed E (A505) (tappi bianchi, soluzione trasparente) in verticale, allineate alle righe dalla A alla H.
 - b Disporre le provette dei primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710) (tappi arancioni, soluzione gialla) in orizzontale, allineate alle colonne dalla 1 alla 12.

Figura 6 Fissaggio della piastra indice



- A Primer indice C (A503), D (A504) ed E (A505) (tappi bianchi)
- B Primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710) (tappi arancioni)
- C Piastra AMP

- 6 Etichettare una nuova piastra per PCR a 96 pozzetti "AMP" (Piastra di amplificazione).
- 7 Dispensare i primer indice sulla piastra AMP in base al foglio campioni nel modo seguente:
 - a Utilizzando una pipetta multicanale, dispensare 4 μ l dei primer indice C (A503), D (A504) ed E (A505) (soluzione trasparente) nei pozzetti appropriati in una colonna della piastra AMP. La sostituzione delle punte tra le colonne non è necessaria.
 - b Per evitare la contaminazione incrociata, smaltire i tappi *bianchi* originali e applicare nuovi tappi *bianchi*.
 - c Utilizzando una pipetta multicanale, dispensare 4 μ l dei primer indice 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710) (soluzione gialla) nei pozzetti appropriati in una riga della piastra AMP. **Le punte devono essere sostituite dopo ogni riga per evitare la contaminazione incrociata.**
 - d Per evitare la contaminazione incrociata, smaltire i tappi *arancioni* originali e applicare tappi *arancioni* nuovi. Rimuovere tutte le provette di primer indice dall'area di lavoro.
- 8 Preparare la soluzione di lavoro per la PCR con Master Mix per PCR/PCR polimerasi nel modo seguente:
 - a Centrifugare brevemente la provetta della polimerasi per PCR prima dell'utilizzo per rimuovere eventuali bolle d'aria.
 - b Dispensare 5,6 μ l di PCR polimerasi a 280 μ l di Master Mix per PCR.

c Capovolgere 20 volte la soluzione di lavoro preparata per la PCR per miscelarla. Nella prossima sezione, questa soluzione di lavoro verrà dispensata nella piastra **AMP**. La soluzione di lavoro per la PCR si mantiene stabile a temperatura ambiente per 10 minuti.



NOTA

Aggiungere sempre PCR polimerasi a Master Mix per PCR subito prima dell'uso. Non conservare mai la soluzione di lavoro per PCR combinata.

Procedura

- 1 Una volta completata la reazione di estensione-ligazione di 45 minuti, rimuovere la piastra **FPU** dall'incubatore. Rimuovere il sigillo in alluminio e sostituirlo con il coperchio della piastra filtro.
Si raccomanda di rimuovere il sigillo in alluminio prima della centrifugazione per garantire che il surnatante di reazione possa defluire efficacemente nella piastra degli scarti.
 - 2 Centrifugare l'**FPU** a $2.400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 2 minuti.
 - 3 Utilizzando una pipetta multicanale, dispensare $25\ \mu\text{l}$ di $0,05\ \text{N}$ di NaOH a ogni pozzetto di campione sulla piastra filtro. Prestando attenzione che le punte della pipetta entrino in contatto con la membrana, pipettare NaOH su e giù 5-6 volte. Le punte devono essere sostituite dopo ogni colonna.
 - 4 Coprire e incubare la piastra filtro a temperatura ambiente per 5 minuti.
 - 5 Durante l'incubazione della piastra filtro, utilizzare una pipetta multicanale per trasferire $22\ \mu\text{l}$ della soluzione di lavoro per PCR in ogni pozzetto della piastra **AMP** contenente i primer indice. Sostituire le punte quando si passa da un campione all'altro.
 - 6 Trasferire i campioni eluiti dal filtro alla piastra **AMP** come segue:
 - a Impostare una pipetta multicanale P20 su $20\ \mu\text{l}$.
 - b Pipettare i campioni nella prima colonna della piastra filtro su e giù 5-6 volte.
 - c Trasferire $20\ \mu\text{l}$ dalla piastra filtro alla colonna corrispondente della piastra **AMP**.
 - d Pipettare delicatamente su e giù 5-6 volte per miscelare accuratamente il DNA con la soluzione di lavoro per la PCR.
-
- NOTA**
- Inclinare leggermente la piastra **FPU** per garantire la completa aspirazione ed evitare la formazione di bolle d'aria.
- e Trasferire le colonne restanti dalla piastra filtro alla piastra **AMP** in modo simile. *Le punte devono essere sostituite dopo ogni colonna per evitare la contaminazione incrociata.*
 - f Dopo che tutti i campioni sono stati trasferiti, la piastra **MIDI** di raccolta dei rifiuti della piastra **FPU** può essere smaltita. Il coltello adattatore in metallo deve essere pulito e conservato per l'uso futuro.
- 7 Coprire la piastra **AMP** con l'apposito sigillo per piastra e assicurarlo con un rullo di gomma.
 - 8 Centrifugare a $1.000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 1 minuto.
 - 9 Trasferire la piastra **AMP** sull'area di post-amplificazione.

10 Eseguire la PCR utilizzando il seguente programma su un termociclatore:

- 95 °C per 3 minuti
- 25 cicli di:
 - 95 °C per 30 secondi
 - 62 °C per 30 secondi
 - 72 °C per 60 secondi
- 72 °C per 5 minuti
- Mantenere la temperatura a 10 °C



PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se non si procede immediatamente alla pulizia della PCR, la piastra **AMP** può restare sul termociclatore per la notte oppure può essere conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per massimo 48 ore.

Pulizia della PCR

Questo processo utilizza microsfere per la pulizia della PCR per purificare i prodotti PCR dagli altri componenti della reazione.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 50 minuti
- ▶ Interventi manuali: 20 minuti

Materiali di consumo

Item	Quantità	Conservazione	Fornito da
Tampone di eluizione	1 provetta	tra 15 °C e 30 °C	Illumina
Microsfere per la pulizia della PCR	400 µl per 8 campioni	tra 2 °C e 8 °C	Illumina
Etanolo all'80% preparato al momento	5 ml per 8 campioni	tra 15 °C e 30 °C	User (Utente)
Piastre MIDI a 96 pozzetti	2	tra 15 °C e 30 °C	User (Utente)
Sigillo adesivo per piastre	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	User (Utente)
Vaschette	Come necessario	tra 15 °C e 30 °C	User (Utente)

Preparazione



NOTA

Rileggere la sezione **Precauzioni** all'inizio del presente protocollo relativamente alla gestione delle microsfere magnetiche e al lavaggio con etanolo all'80% durante la pulizia della PCR.

- 1 Portare le microsfere per la pulizia della PCR a temperatura ambiente.
- 2 Preparare al momento etanolo all'80% a partire dall'etanolo assoluto.



NOTA

Per le fasi di lavaggio, preparare sempre al momento etanolo all'80%. L'etanolo può assorbire l'acqua dall'aria e influire sui risultati.

Procedura

- 1 Centrifugare la piastra AMP a 1.000 × g a 20 °C per un minuto per raccogliere il condensato.
- 2 Etichettare la nuova piastra MIDI "**CLP_Plate_ID**" (Piastra di pulizia).
- 3 Capovolgere 10 volte le microsfere per la pulizia della PCR. Agitare energicamente, quindi capovolgere ancora 10 volte.
- 4 Controllare visivamente la soluzione per assicurarsi che le microsfere siano ben risospese.

- 5 Utilizzando una pipetta multicanale, dispensare 45 µl di microsfere per la pulizia della PCR in ogni pozzetto della piastra **CLP**.
- 6 Utilizzando una pipetta multicanale impostata su 60 µl, trasferire l'intero prodotto per PCR dalla piastra AMP alla piastra **CLP**. Sostituire le punte quando si passa da un campione all'altro.
- 7 Sigillare la piastra **CLP** con un sigillo adesivo per piastre.
- 8 Agitare la piastra **CLP** su uno shaker per micropiastre a 1.800 rpm per due minuti.
- 9 Incubare a temperatura ambiente (tra 15 °C e 30 °C) senza agitare per 10 minuti.
- 10 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o fino alla scomparsa del surnatante.
- 11 Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico e una pipetta multicanale impostata su 100 µl, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante. Sostituire le punte quando si passa da un campione all'altro.



NOTA

Qualora nelle punte vengano inavvertitamente aspirate delle microsfere, ridispensare queste ultime sulla piastra e lasciare riposare la piastra sul magnete per 2 minuti, quindi controllare che il surnatante sia scomparso.

- 12 Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico, lavare le microsfere con etanolo all'80% preparato subito prima dell'operazione nel modo seguente:
 - a Con una pipetta multicanale, dispensare 200 µl di etanolo all'80% appena preparato in ciascun pozzetto contenente il campione. Non è necessario sostituire le punte se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata. In questa fase non occorre risospendere le microsfere.
 - b Incubare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 30 secondi o finché il surnatante è limpido.
 - c Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
- 13 Con la piastra **CLP** sul supporto magnetico, eseguire un secondo lavaggio nel modo seguente:
 - a Con una pipetta multicanale, dispensare 200 µl di etanolo all'80% appena preparato in ciascun pozzetto contenente il campione.
 - b Incubare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 30 minuti o finché il surnatante è limpido.
 - c Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
- 14 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di etanolo.
- 15 Rimuovere la piastra **CLP** dal supporto magnetico e asciugare all'aria le microsfere per 10 minuti.
- 16 Con una pipetta multicanale, aggiungere 30 µl di tampone di eluizione a ciascun campione.
Non è necessario sostituire le punte se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
- 17 Sigillare la piastra con un sigillo adesivo per piastre.

- 18 Agitare la piastra **CLP** su uno shaker per micropiastre a 1.800 rpm per due minuti.

**NOTA**

Assicurarsi che tutti i campioni siano completamente risospesi. Se vi sono campioni in cui le microsfere non sono completamente risospese, pipettare delicatamente su e giù per risospenderle e ripetere i due passaggi precedenti.

- 19 Incubare a temperatura ambiente (tra 15 °C e 30 °C) per due minuti.
- 20 Posizionare la piastra **CLP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.
- 21 Etichettare la nuova piastra MIDI "**LNP_Plate_ID**" (Piastra di normalizzazione della libreria).
- 22 Utilizzando una pipetta multicanale P20 e punte fini, trasferire delicatamente 20 µl di surnatante dalla piastra **CLP** alla piastra **LNP**. Cambiare le punte tra i campioni onde evitare una contaminazione incrociata.

**NOTA**

Qualora nelle punte vengano inavvertitamente aspirate delle microsfere, ridispensare queste ultime sulla piastra e lasciare riposare la piastra sul magnete per 2 minuti, quindi controllare che il surnatante sia scomparso.

- 23 **[Facoltativo]** Trasferire i restanti 10 µl di surnatante dalla piastra **CLP** su una nuova piastra ed etichettare la piastra con il nome della corsa e la data. Conservare questa piastra a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino al completamento della corsa di sequenziamento e analisi dei dati. I prodotti della PCR puliti possono essere usati per risolvere eventuali problemi a carico dei campioni.
- 24 Se ci si ferma a questo punto, sigillare la piastra **LNP** con un sigillo adesivo per piastre, quindi centrifugare a 1.000 × g a 20 °C per un minuto per garantire che tutto il surnatante si trovi in fondo al pozzetto.

**PUNTO DI ARRESTO SICURO**

Dopo la pulizia della PCR, la piastra è stabile per circa tre ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Normalizzazione delle librerie

Questo processo consiste nel normalizzare la quantità di ciascuna libreria per garantirne una rappresentazione equilibrata nel pool di campioni.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 1 ora e 20 minuti
- ▶ Interventi manuali: 30 minuti

Materiali di consumo

Item	Quantità	Conservazione	Fornito da
Diluyente di normalizzazione delle librerie	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
Microsfere della libreria	1 provetta	tra 2 °C e 8 °C	Illumina
Lavaggio di normalizzazione della libreria	2 provette	tra 2 °C e 8 °C	Illumina
Tampone di conservazione libreria	1 provetta	tra 15 °C e 30 °C	Illumina
0,1 N di NaOH preparato al momento	2 ml per 48 campioni	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Piastra skirted per PCR a 96 pozzetti	1 piastra	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Provetta conica da 15 ml	1 provetta	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Sigillo adesivo per piastre	Secondo necessità	tra 15 °C e 30 °C	Utente



AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Maneggiare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, vedere le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

Preparazione

- 1 Preparare al momento NaOH 0,1 N aggiungendo 30 µl di NaOH 10 N a 2.970 µl di acqua priva di RNasi/DNasi.
- 2 Rimuovere il diluyente di normalizzazione della libreria dalla temperatura di conservazione tra -25 °C e -15 °C e portarlo a temperatura ambiente. Utilizzare un bagno d'acqua tra 20 °C e 25 °C secondo necessità.

**NOTA**

Il diluente di normalizzazione della libreria potrebbe formare precipitati o cristalli visibili. Prima dell'uso, agitare energicamente, quindi porre la provetta davanti a una luce ed eseguire un controllo visivo per assicurarsi che tutti i precipitati si siano completamente disciolti.

- 3 Prelevare le microsfere della libreria e il lavaggio di normalizzazione della libreria dalla temperatura conservazione compresa tra 2 °C e 8 °C e portare a temperatura ambiente.
Utilizzare un bagno d'acqua tra 20 °C e 25 °C secondo necessità.
- 4 Agitare le microsfere della libreria energicamente per 1 minuto con inversione intermittente fino a risospensione delle microsfere e assenza di pellet sul fondo della provetta quando quest'ultima viene capovolta.

Procedura

- 1 Dispensare 394 µl di diluente di normalizzazione della libreria in una provetta nuova da 1,5 ml.
- 2 Utilizzare una pipetta P1000 impostata su 1.000 µl per risospendere completamente le microsfere della libreria pipettando su e giù dieci volte.

**NOTA**

È fondamentale risospendere completamente il pellet delle microsfere della libreria in fondo alla provetta. L'uso di una provetta P1000 garantisce che le microsfere vengano risospese in modo omogeneo e che non ci sia massa di microsfere sul fondo della provetta. Questo è fondamentale per ottenere una densità cluster omogenea sulla cella a flusso.

- 3 Pipettare 72 µl di microsfere della libreria nella provetta contenente il diluente di normalizzazione della libreria. Miscelare bene capovolgendo la provetta 15-20 volte.

**NOTA**

È necessaria una P1000 impostata su 1.000 µl per risospendere completamente le microsfere nella fase 2. Miscelare solo le quantità richieste di diluente di normalizzazione della libreria e di microsfere della libreria per il saggio corrente. Conservare separatamente il diluente di normalizzazione della libreria e le microsfere della libreria rimanenti alle rispettive temperature consigliate. Per assicurare la stabilità, le microsfere della libreria non devono mai essere congelate o miscelate con il diluente di normalizzazione della libreria se non si prevede un uso immediato.

- 4 Con una pipetta multicanale, dispensare 45 µl di soluzione di lavoro contenente diluente di normalizzazione della libreria e microsfere della libreria in ciascun pozzetto della piastra LNP contenente le librerie. Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
- 5 Sigillare la piastra LNP con un sigillo adesivo per piastre.
- 6 Agitare la piastra LNP su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 30 minuti.

**NOTA**

Questa incubazione di 30 minuti è fondamentale per una corretta normalizzazione della libreria. Le incubazioni con una durata superiore o inferiore ai 30 minuti possono influenzare la rappresentazione della libreria e la densità cluster.

**NOTA**

Se lo stesso giorno si procede con il sequenziamento, questo è un buon momento per iniziare lo scongelamento della cartuccia di reagenti. Attenersi alle istruzioni relative allo scongelamento della cartuccia di reagenti MiSeqDx contenute nella sezione *Preparazione della cartuccia di reagenti* a pagina 45.

- 7 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o fino alla scomparsa del surnatante.
- 8 Con la piastra **LNP** sul supporto magnetico, utilizzando una pipetta multicanale impostata su 80 μ l, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante in un apposito contenitore per rifiuti pericolosi.



NOTA

Qualora nelle punte vengano inavvertitamente aspirate delle microsfere, ridispensare queste ultime sulla piastra e lasciare riposare la piastra per due minuti o fino alla scomparsa del surnatante.

- 9 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e lavare le microsfere con il lavaggio di normalizzazione della libreria nel modo seguente:
 - a Con una pipetta multicanale, dispensare 45 μ l di lavaggio di normalizzazione della libreria in ciascun pozzetto contenente il campione.
Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
 - b Sigillare la piastra **LNP** con un sigillo adesivo per piastre.
 - c Agitare la piastra **LNP** su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.
 - d Posizionare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.
 - e Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante in un apposito contenitore per rifiuti pericolosi.
- 10 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e ripetere il lavaggio con il lavaggio di normalizzazione della libreria nel modo seguente:
 - a Con una pipetta multicanale, dispensare 45 μ l di lavaggio di normalizzazione della libreria in ciascun pozzetto.
Non è necessario cambiare le punte quando si cambia colonna se si fa attenzione a evitare la contaminazione incrociata.
 - b Sigillare la piastra **LNP** con un sigillo adesivo per piastre.
 - c Agitare la piastra **LNP** su uno shaker per micropiastre a 1.800 rpm per cinque minuti.
 - d Posizionare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti.
 - e Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante in un apposito contenitore per rifiuti pericolosi.
- 11 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 μ l per rimuovere l'eccesso di lavaggio di normalizzazione della libreria.
- 12 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e dispensare 30 μ l di 0,1 N di NaOH in ogni pozzetto per eluire il campione.
- 13 Sigillare la piastra **LNP** con un sigillo adesivo per piastre.
- 14 Agitare la piastra **LNP** su un agitatore per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.
- 15 Durante l'eluizione di 5 minuti, etichettare una nuova piastra per PCR a 96 pozzetti "**SGP_Plate_ID**" (Piastra StoraGe).
- 16 Dispensare 30 μ l di tampone di conservazione della libreria in ciascun pozzetto da usare nella piastra **SGP**.
- 17 Dopo l'eluizione di 5 minuti, assicurarsi che tutti i campioni nella piastra **LNP** siano completamente risospesi. Se i campioni non sono completamente risospesi, pipettare

delicatamente i campioni su e giù oppure battere delicatamente la piastra sul banco per risospendere le microsfele, quindi agitare per altri 5 minuti.

- 18 Posizionare la piastra **LNP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti.
- 19 Utilizzando una pipetta multicanale impostata su 30 μ l, trasferire il surnatante dalla piastra **LNP** alla piastra **SGP**. Pipettare delicatamente su e giù 5 volte per miscelare.



NOTA

Qualora nelle punte vengano inavvertitamente aspirate delle microsfele, ridispensare queste ultime sulla piastra e lasciare riposare la piastra sul magnete per 2 minuti o controllare che il surnatante sia scomparso.

- 20 Sigillare la piastra **SGP** con un sigillo adesivo per piastre e quindi centrifugare a 1.000 \times g a 20 $^{\circ}$ C per 1 minuto.



PUNTO DI ARRESTO SICURO

Qualora non si proceda immediatamente alla creazione di un pool di librerie e al successivo sequenziamento su MiSeqDx, conservare la piastra **SGP** sigillata tra -25 $^{\circ}$ C e -15 $^{\circ}$ C per un massimo di 3 giorni.

Raggruppamento delle librerie

Durante la preparazione per la generazione di cluster e il sequenziamento, volumi uguali di librerie normalizzate vengono combinati, diluiti nel tampone di ibridazione, e denaturati mediante calore prima del sequenziamento con MiSeqDx. Il campione di controllo PhiX è usato a fini di verifica interna per il sequenziamento.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 10 minuti
- ▶ Interventi manuali: 10 minuti

Materiali di consumo

Item	Quantità	Conservazione	Fornito da
Tampone di diluizione libreria	1 provetta	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
10 nM di campione di controllo interno PhiX	2 µl	tra -25 °C e -15 °C	Illumina
0,1 N di NaOH preparato al momento	1 ml	tra 15 °C e 30 °C	Utente
1X di tampone TE	8 µl	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Provette Eppendorf (sono consigliate quelle con tappo a vite)	2 provette	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Striscia a otto provette per PCR	1	tra 15 °C e 30 °C	Utente
Portaghiaccio da 2,5 l	1	tra 15 °C e 30 °C	Utente

Preparazione al pooling delle librerie

- 1 Predisporre un blocco termico adatto a centrifugare provette da 1,5 ml a 96 °C.
- 2 In un portaghiaccio, preparare un bagno d'acqua e ghiaccio. Raffreddare il tampone di diluizione libreria nel bagno d'acqua e ghiaccio.
- 3 Cominciare a scongelare la cartuccia di reagenti MiSeqDx.

Preparazione della cartuccia di reagenti

Le istruzioni che seguono descrivono come scongelare la cartuccia di reagenti utilizzando un bagno d'acqua a temperatura ambiente. Il metodo richiede circa un'ora.

- 1 Rimuovere la cartuccia di reagenti dal luogo di conservazione con una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.

- 2 Collocare la cartuccia di reagenti in un bagno d'acqua contenente acqua da laboratorio a temperatura ambiente in quantità sufficiente per consentire l'immersione della base della cartuccia di reagenti fino alla linea di livello acqua stampata sulla cartuccia stessa. Evitare che l'acqua superi la linea di massimo livello acqua.

Figura 7 Linea di massimo livello acqua



- 3 Lasciare la cartuccia di reagenti a scongelare nel bagno d'acqua a temperatura ambiente per circa un'ora o fino a scongelamento.
- 4 Rimuovere la cartuccia dal bagno d'acqua e picchiettarla delicatamente sul banco per far fuoriuscire l'acqua in eccesso dalla base. Asciugare la base della cartuccia. Verificare che sulla parte superiore della cartuccia di reagenti non sia caduta dell'acqua.

Ispezione della cartuccia di reagenti

- 1 Capovolgere la cartuccia dieci volte per miscelare i reagenti scongelati, quindi ispezionare tutte le posizioni per accertarsi che siano scongelate.



NOTA

È fondamentale che i reagenti nella cartuccia siano scongelati completamente e miscelati per assicurare il sequenziamento corretto.

- 2 Ispezionare i reagenti nelle posizioni 1, 2 e 4 per accertarsi che siano ben miscelati e privi di precipitati.
- 3 Picchiettare delicatamente la cartuccia sul banco per ridurre le bolle d'aria nei reagenti.



NOTA

I tubi dei pescanti di MiSeqDx vanno fino al fondo di ciascun serbatoio per aspirare i reagenti, per questa ragione è importante che i serbatoi non contengano bolle d'aria.

- 4 Riporre la cartuccia in ghiaccio o conservarla a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C (fino a sei ore) finché non si è pronti a impostare la corsa. Per risultati ottimali, procedere direttamente caricando il campione e impostando la corsa.

Denaturazione e diluizione del campione di controllo interno PhiX

- 1 Preparare 0,1 N di NaOH combinando i seguenti volumi in una provetta conica:
 - Acqua priva di DNasi/RNasi (2.475 µl)
 - 10 N di NaOH standard (25 µl)

- 2 Capovolgere la provetta diverse volte per miscelare.



ATTENZIONE

L'utilizzo di una soluzione di NaOH diluito subito prima dell'operazione è essenziale per denaturare completamente i campioni in vista della generazione di cluster su MiSeqDx.



NOTA

Se il campione di controllo PhiX viene preparato lo stesso giorno della normalizzazione della libreria, può essere utilizzata la stessa quantità di 0,1 N di NaOH standard.

- 3 Combinare i seguenti volumi per diluire la libreria del campione di controllo interno PhiX a 2 nM:
 - 10 nM di libreria del campione di controllo interno PhiX (2 µl)
 - 1X di tampone TE (8 µl)
- 4 Combinare i seguenti volumi per ottenere una libreria del campione di controllo interno PhiX da 1 nM:
 - 2 nM di libreria del campione di controllo interno PhiX (10 µl)
 - 0,1 N di NaOH (10 µl)
- 5 Agitare brevemente per miscelare la soluzione della libreria del campione di controllo interno PhiX da 1 nM.
- 6 Centrifugare il campione di controllo interno PhiX da 1 nM a 280 × g a 20 °C per un minuto.
- 7 Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente per denaturare la soluzione della libreria del campione di controllo interno PhiX in filamenti singoli.
- 8 Combinare i seguenti volumi in una nuova provetta per microcentrifuga per ottenere una libreria del campione di controllo interno PhiX da 20 pM:
 - Denaturare la libreria del campione di controllo interno PhiX (f2 µl)
 - Tampone di diluizione libreria pre-raffreddato (98 µl)



NOTA

La libreria del campione di controllo interno PhiX da 20 pM denaturata può essere conservata per un massimo di tre settimane a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C sotto forma di aliquote monouso. Dopo tre settimane, il numero di cluster tende a diminuire.

Preparazione dei campioni per il sequenziamento

- 1 Portare il tampone di diluizione della libreria a temperatura ambiente. Agitare il tampone di diluizione della libreria e verificare che tutti i precipitati si siano completamente sciolti.
- 2 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, scongelare la piastra **SGP** a temperatura ambiente.
- 3 Centrifugare la piastra **SGP** a 1.000 × g a 20 °C per 1 minuto per raccogliere il condensato.
- 4 Etichettare una provetta Eppendorf nuova con "**PAL_Plate_ID**" (Libreria di ampliconi raggruppati in pool).
- 5 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, utilizzare una pipetta multicanale P200 impostata su 40 µl per mescolare ciascuna libreria da sequenziare pipettando su e giù per 3-5 volte. Sostituire le punte quando si passa da un campione all'altro.

- Trasferire 5 µl di ciascuna libreria da sequenziare dalla piastra **SGP** a una striscia a otto provette per PCR. Sigillare l'**SGP** con un sigillo adesivo per piastre e metterla da parte.

**NOTA**

Dopo l'uso, conservare la piastra **SGP**, sigillata, fra -25 °C e -15 °C che rimarrà stabile, a tali condizioni, per un massimo di 3 giorni.

- Combinare e trasferire il contenuto della striscia a otto provette per PCR nella provetta **PAL**. Miscelare energicamente la provetta **PAL** in un agitatore.
- Etichettare una provetta Eppendorf nuova con "**DAL_Plate_ID**" (Libreria di ampliconi diluita).
- Dispensare 585 µl di tampone di diluizione della libreria nella provetta **DAL**.
- Dispensare 6 µl di campione di controllo interno PhiX 20 pM nella provetta **DAL**. Con la stessa punta, pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.
- Trasferire 9 µl di **PAL** nella provetta **DAL** contenente il tampone di diluizione della libreria. Con la stessa punta, pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.
- Mescolare la provetta della **DAL** con un agitatore vortex a velocità massima.

**NOTA**

Se si desidera conservare la restante **PAL** per utilizzarla in futuro, porre la provetta **PAL** a una temperatura fra -25 °C e -15 °C. La **PAL** si conserva bene per tre giorni.

- Centrifugare la provetta **DAL** a 1.000 × g a 20 °C per 1 minuto per raccogliere il contenuto.
- Incubare la provetta **DAL** in un blocco termico a 96 °C per due minuti.
- Dopo l'incubazione, capovolgere la provetta **DAL** 1-2 volte per mescolarla, quindi porla immediatamente in un bagno d'acqua e ghiaccio.
- Tenere la provetta **DAL** nel bagno d'acqua e ghiaccio per 5 minuti.

**NOTA**

Eeguire immediatamente la fase di denaturazione mediante calore prima di caricare la provetta **DAL** nella cartuccia di reagenti MiSeqDx per assicurare un caricamento sufficiente di template sulla cella a flusso MiSeqDx.

Le novità

Una volta raggruppate in pool le librerie di ampliconi con il campione di controllo PhiX diluito e denaturato, le librerie sono pronte per essere caricate sulla cartuccia MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing nell'apposito serbatoio etichettato con **Load Samples** (Carica campioni). La corsa di sequenziamento deve essere quindi configurata usando l'interfaccia di MiSeq Operating Software (MOS). Vedere la guida di riferimento dello strumento MiSeqDx per la configurazione. Vedere la sezione *Guide ai software e alla strumentazione* a pagina 19.

Assistenza tecnica

Per l'assistenza tecnica, contattare l'Assistenza tecnica Illumina.

Tabella 11 Dati di contatto generali Illumina

Sito Web	www.illumina.com
E-mail	techsupport@illumina.com

Tabella 12 Numeri di telefono dell'Assistenza clienti Illumina

Area geografica	Numero di contatto	Area geografica	Numero di contatto
Nord America	1.800.809.4566	Italia	800.874909
Australia	1.800.775.688	Norvegia	800.16836
Austria	0800.296575	Nuova Zelanda	0800.451.650
Belgio	0800.81102	Paesi Bassi	0800.451.650
Danimarca	80882346	Regno Unito	0800.917.0041
Finlandia	0800.918363	Spagna	900.812168
Francia	0800.911850	Svezia	020790181
Germania	0800.180.8994	Svizzera	0800.563118
Irlanda	1.800.812949	Altri paesi	+44.1799.534000

Schede di sicurezza (SDS)

Le schede di sicurezza (Safety data sheet, SDS) sono disponibili sul sito Web Illumina all'indirizzo support.illumina.com/sds.html.

Documentazione dei prodotti

La documentazione dei prodotti in formato PDF può essere scaricata dal sito web Illumina. Andare alla pagina support.illumina.com, selezionare un prodotto, quindi fare clic su **Documentation & Literature** (Documentazione e letteratura).



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Sponsor Australiano:
Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Australia