

Formulář sledování laboratorních výsledků TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO
URČENO POUZE NA EXPORT

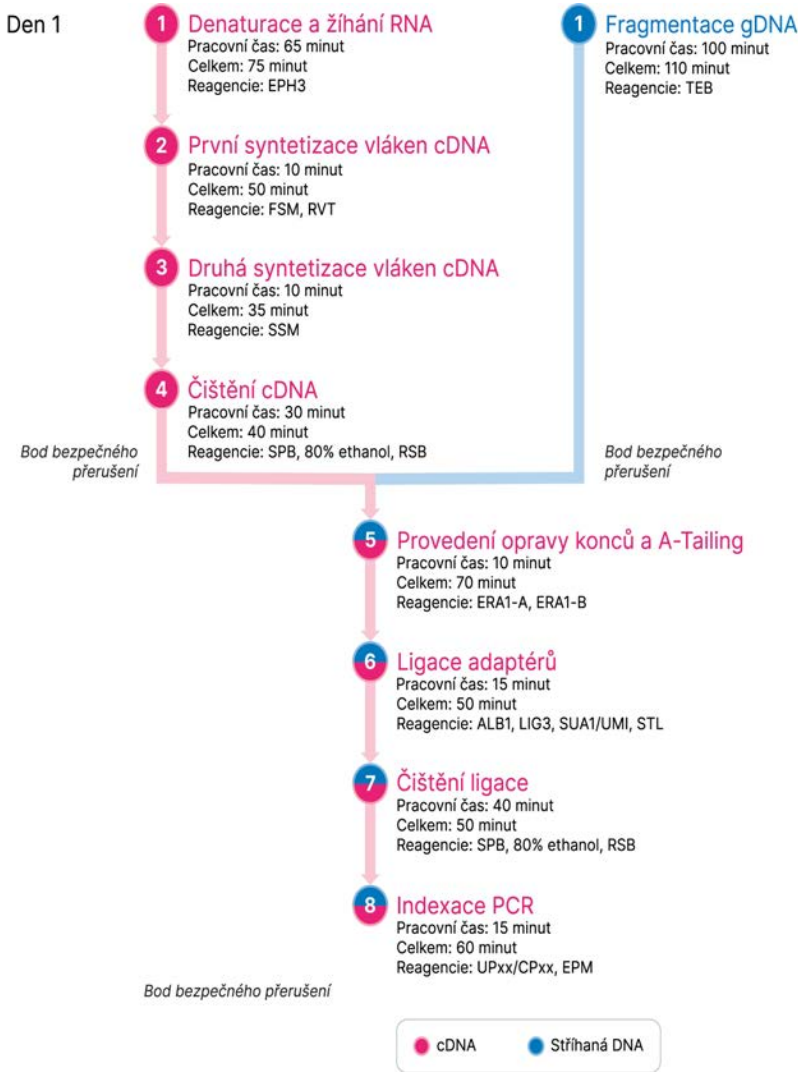
Návod k použití

Přehled pracovního postupu TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) je znázorněn na [Obrázek 1](#) a [Obrázek 2](#).

Před zahájením protokolu si prostudujte varování a preventivní opatření v *příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200007789)*.

Pracovní postup přípravy knihovny

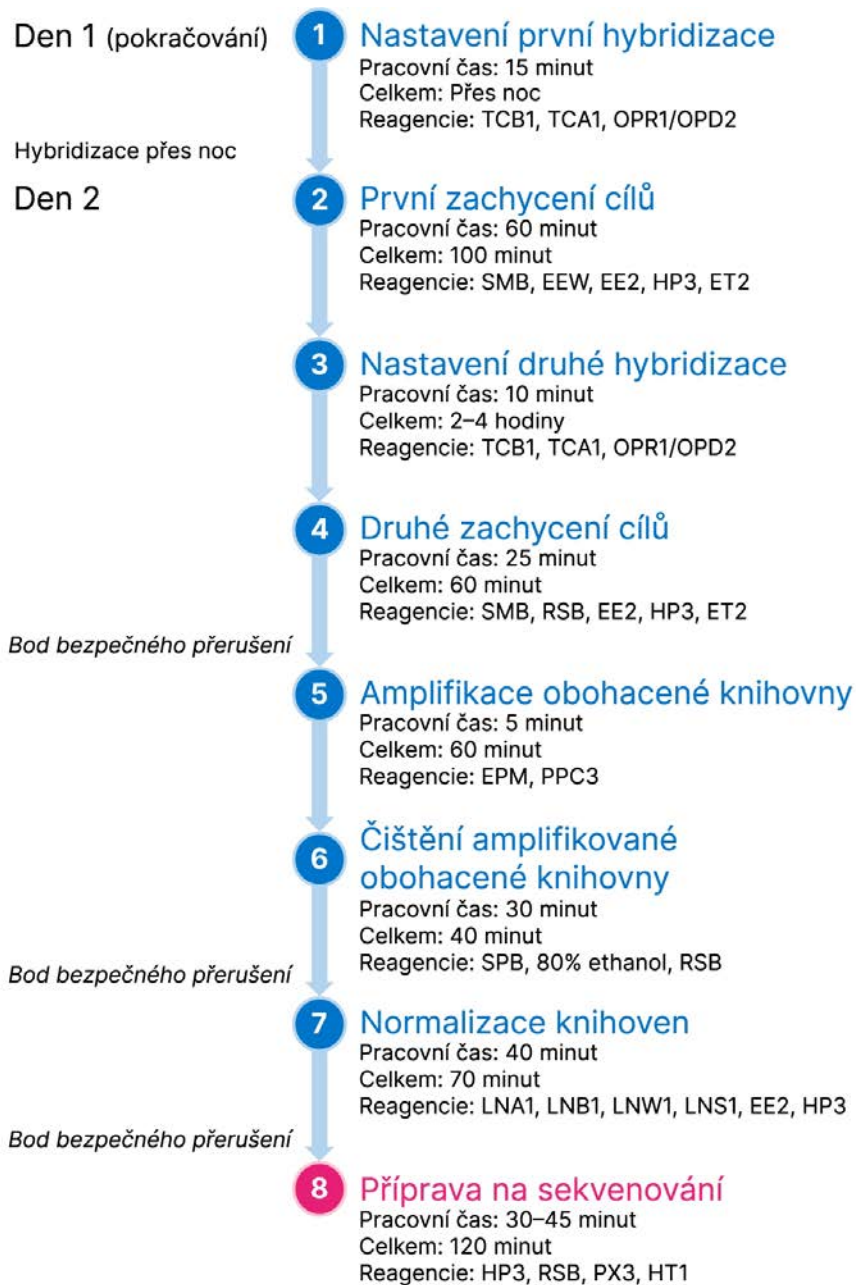
Obrázek 1 Pracovní postup TSO Comprehensive (část 1)



* Pracovní čas a celkový čas udává přibližné hodnoty.

Pracovní postup obohacení

Obrázek 2 Pracovní postup TSO Comprehensive (část 2)



● Obohacení ● Příprava sekvenace

Programování termocyklérů

- 1 Před zahájením rozboru uložte následující programy na termocyklér před amplifikací a termocyklér po amplifikaci.

Tabulka 1 Programy termocykléru před amplifikací

Krok postupu	Název programu	Teplota víčka	Objem reakce	Parametry termocykléru
Denaturace a žihání RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C po dobu 5 minut • 4 °C po dobu 1 minuty • Udržovat teplotu 4 °C
První syntetizace vláken cDNA	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25 °C po dobu 10 minut • 42 °C po dobu 15 minut • 70 °C po dobu 15 minut • 4 °C po dobu 1 minuty • Udržovat teplotu 4 °C
Druhá syntetizace vláken cDNA	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16 °C po dobu 25 minut • 4 °C po dobu 1 minuty • Udržovat teplotu 4 °C

Pokud teplotu víčka pro 2ndSS nelze nastavit na 30 °C, vypněte možnost přehřátí víčka.

Tabulka 2 Programy termocykléru po amplifikaci

Krok postupu	Název programu	Teplota víčka	Objem reakce	Parametry termocykléru
Indexace PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C po dobu 30 sekund • 15 cyklů: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C po dobu 10 sekund • 60 °C po dobu 30 sekund • 72 °C po dobu 30 sekund • 72 °C po dobu 5 minut • Udržovat teplotu 10 °C
Provedení první hybridizace	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C po dobu 10 minut • 85 °C po dobu 2 minut 30 sekund • 75 °C po dobu 2 minut 30 sekund • 65 °C po dobu 2 minut 30 sekund • Udržovat teplotu 57 °C po dobu 8 až 24 hodin
Provedení druhé hybridizace	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C po dobu 10 minut • 85 °C po dobu 2 minut 30 sekund • 75 °C po dobu 2 minut 30 sekund • 65 °C po dobu 2 minut 30 sekund • Udržovat teplotu 57 °C po dobu 1,5 až 4 hodin
Amplifikace obohacené knihovny	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C po dobu 30 s • 18 cyklů: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C po dobu 10 s • 60 °C po dobu 30 s • 72 °C po dobu 30 s • 72 °C po dobu 5 minut • Udržovat teplotu 10 °C

Zadání informací o bězích

Local Run Manager přístroje NextSeq 550Dx je software sloužící k nastavení běhu TSO Comprehensive. Další informace naleznete v *Průvodci pracovními postupy pro analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661)*.

Informace k nastavení běhu a vzorku můžete zadat přímo do analytického modulu TruSight Oncology Comprehensive.

Nastavení parametrů běhu

- 1 V přístroji nebo z počítače v síti se přihlaste do modulu Local Run Manager.
- 2 Vyberte možnost **Create Run** (Vytvořit běh) a poté **TSO Comp (EU)**.
- 3 Zadejte název běhu, kterým bude běh označen od sekvenování po analýzu, a to tak, aby splňoval následující kritéria.
 - ▶ 1–40 znaků.
 - ▶ Používejte alfanumerické znaky, pomlčky a podtržítka.
 - ▶ Před i za podtržítkem a pomlčkou musí být vždy alfanumerický znak.
 - ▶ Název musí být v rámci všech běhů v přístroji jedinečný.
- 4 **[Volitelné]** Pro usnadnění identifikace běhu zadejte jeho popis, který bude splňovat následující kritéria.
 - ▶ 1–150 znaků.
 - ▶ Pouze alfanumerické znaky nebo mezery.
 - ▶ Před i za mezerou musí být vždy alfanumerický znak.

Specifikace vzorků pro běh

Vzorky pro běh zadejte pomocí jedné z následujících možností.

- ▶ **Ruční zadání vzorků** – Použijte prázdnou tabulku na obrazovce Create Run (Vytvořit běh).
- ▶ **Importování vzorků** – Přejděte do externího souboru ve formátu .csv (čárkou oddělené údaje). Na obrazovce Create Run (Vytvoření běhu) je k dispozici šablona ke stažení.



UPOZORNĚNÍ

Rozdíly mezi vzorky a indexačními primery způsobí, že se z důvodu špatné identifikace pozitivních vzorků vykážou nesprávné výsledky. Než začnete připravovat knihovnu, zadejte ID vzorků a přiřadte indexy v modulu Local Run Manager. Při přípravě knihovny si pro referenci poznamenejte ID vzorků, indexy a orientaci jamek desky.



UPOZORNĚNÍ

Aby nedošlo ke ztrátě dat, ujistěte se, že před uložením běhu není spuštěna instalace znalostní báze.

Ruční zadání vzorků

- 1 Do pole Sample ID (ID vzorku) zadejte jedinečné ID vzorku tak, aby splňovalo následující kritéria. **Nejprve přidejte všechny kontrolní vzorky.** Další informace naleznete v části *Kontrolní vzorky na straně 6*.
 - ▶ 1–25 znaků.
 - ▶ Používejte alfanumerické znaky, pomlčky a podtržítka.
 - ▶ Před i za podtržítkem a pomlčkou musí být vždy alfanumerický znak.
- 2 **[Volitelné]** Do pole Sample Description (Popis vzorku) zadejte popis vzorku, který bude splňovat následující kritéria.
 - ▶ 1–50 znaků.
 - ▶ Používejte alfanumerické znaky, pomlčky, podtržítka a mezery.
 - ▶ Před i za mezerou, podtržítkem a pomlčkou musí být vždy alfanumerický znak.
- 3 Vyberte index pro knihovnu DNA, resp. knihovnu RNA připravenou ze vzorku. Dejte pozor, aby vzorky RNA a DNA byly v oddělených sloupcích.

Pole sekvence i7+i5 DNA se automaticky vyplní po výběru ID indexu DNA. Pole sekvence i7+i5 RNA se automaticky vyplní po výběru ID indexu RNA.

Kromě zde uvedeného přehledu naleznete další informace v *příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (dokument č. 200007789)*.

- ▶ Pro knihovnu vzorků DNA vyberte jedinečné ID indexu (indexy UPxx nebo CPxx) z rozevíracího seznamu ID indexů DNA.
- ▶ Pro knihovnu vzorků RNA vyberte jedinečné ID indexu (pouze UPxx) z rozevíracího seznamu ID indexů RNA.
- ▶ Pokud jsou v běhu celkem tři knihovny, postupujte podle pravidel pro výběr indexů v *příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200007789)*.

- 4 Pomocí pole Tumor Type (Typ nádoru) přiřadte jednotlivým vzorkům typ nádoru tak, že vyberete nejspecifičtější typ nádoru, který je k dispozici. Viz *Výběr typu nádoru na straně 7*.
- 5 Pomocí pole Tumor Type (Typ nádoru) přiřadte každému kontrolnímu vzorku jeden z následujících typů kontroly. Viz *Kontrolní vzorky na straně 6*.

- Externí kontrola DNA
- Externí kontrola RNA
- Kontrola DNA bez templátu
- Kontrola RNA bez templátu

Pokud používáte kontrolní vzorky Consumable Prefix DNA Control, typ kontroly je DNA External Control (Externí kontrola DNA). Pokud používáte kontrolní vzorky Consumable Prefix RNA Control, typ kontroly je RNA External Control (Externí kontrola RNA).

- 6 Přiřadte pohlaví.
- 7 **[Volitelné]** Pomocí funkce **Export to CSV** (Exportovat do CSV) můžete informace o vzorku exportovat do externího souboru.
- 8 Zkontrolujte informace na obrazovce Create Run (Vytvoření běhu). Nesprávné informace mohou mít vliv na výsledky.
- 9 Vyberte možnost **Save Run** (Uložit běh).

Importování vzorků

- 1 Vyberte možnost **Import CSV** (Importovat CSV) a přejděte na umístění informačního souboru vzorku. Můžete importovat dva typy souborů.
 - Na obrazovce Create Run (Vytvoření běhu) vyberte možnost **Download CSV** (Stáhnout CSV) a stáhněte si novou šablonu informací o vzorku. Soubor CSV obsahuje potřebná záhlaví sloupců a formát pro import. K vzorkům v běhu zadejte do každého sloupce informace o vzorku. Do sloupce Tumor Type (Typ nádoru) zadejte termín typu nádoru nebo přidružený kód (viz *Stažení typů nádorů na straně 1*). Pole Tumor Type (Typ nádoru) slouží i k určení vzorků jako kontrolních (viz *Kontrolní vzorky na straně 6*).
 - Použijte soubor informací o vzorku, který byl exportován z analytického modulu TSO Comprehensive pomocí funkce Export to CSV (Exportovat do CSV).
- 2 Na obrazovce Create Run (Vytvoření běhu) zkontrolujte importované informace. Nesprávné informace mohou mít vliv na výsledky.
- 3 **[Volitelné]** Pomocí funkce **Export to CSV** (Exportovat do CSV) můžete informace o vzorku exportovat do externího souboru.
- 4 Vyberte možnost **Save Run** (Uložit běh).

Kontrolní vzorky

Analytický modul TSO Comprehensive vyžaduje použití funkce Panel Control (Kontrola panelu). Označením vzorku za kontrolní vzorek se pohlaví vzorku automaticky nastavuje na Neznámé. Při označení vzorku za kontrolní vzorek vyberte v poli Tumor Type (Typ nádoru) jeden ze čtyř typů kontroly: DNA External Control (Externí kontrola DNA) (pozitivní kontrola DNA), DNA No-Template Control (Kontrola DNA bez templátu), RNA External Control (Externí kontrola RNA) (pozitivní kontrola RNA) a RNA No-Template Control (Kontrola RNA bez templátu). Další informace o nastavení typů nádorů pro všechny typy vzorků během nastavení běhu naleznete v části *Výběr typu nádoru na straně 7*.

V rámci běhu může být pro každý typ kontroly určen pouze jeden. Pro externí kontrolu DNA nebo kontrolu DNA bez templátu lze zadat pouze knihovnu DNA. Pro externí kontrolu RNA nebo kontrolu RNA bez templátu lze zadat pouze knihovnu RNA. Knihovny označené jako kontroly DNA nebo RNA bez templátu se nezapočítávají do maximálního počtu knihoven v běhu.

Výběr typu nádoru

Pro každý vzorek musí být specifikován typ nádoru. Kromě kontrolních typů jsou dostupné typy nádorů odvozené z nainstalované znalostní báze a s aktualizací verze znalostní báze se mohou změnit.

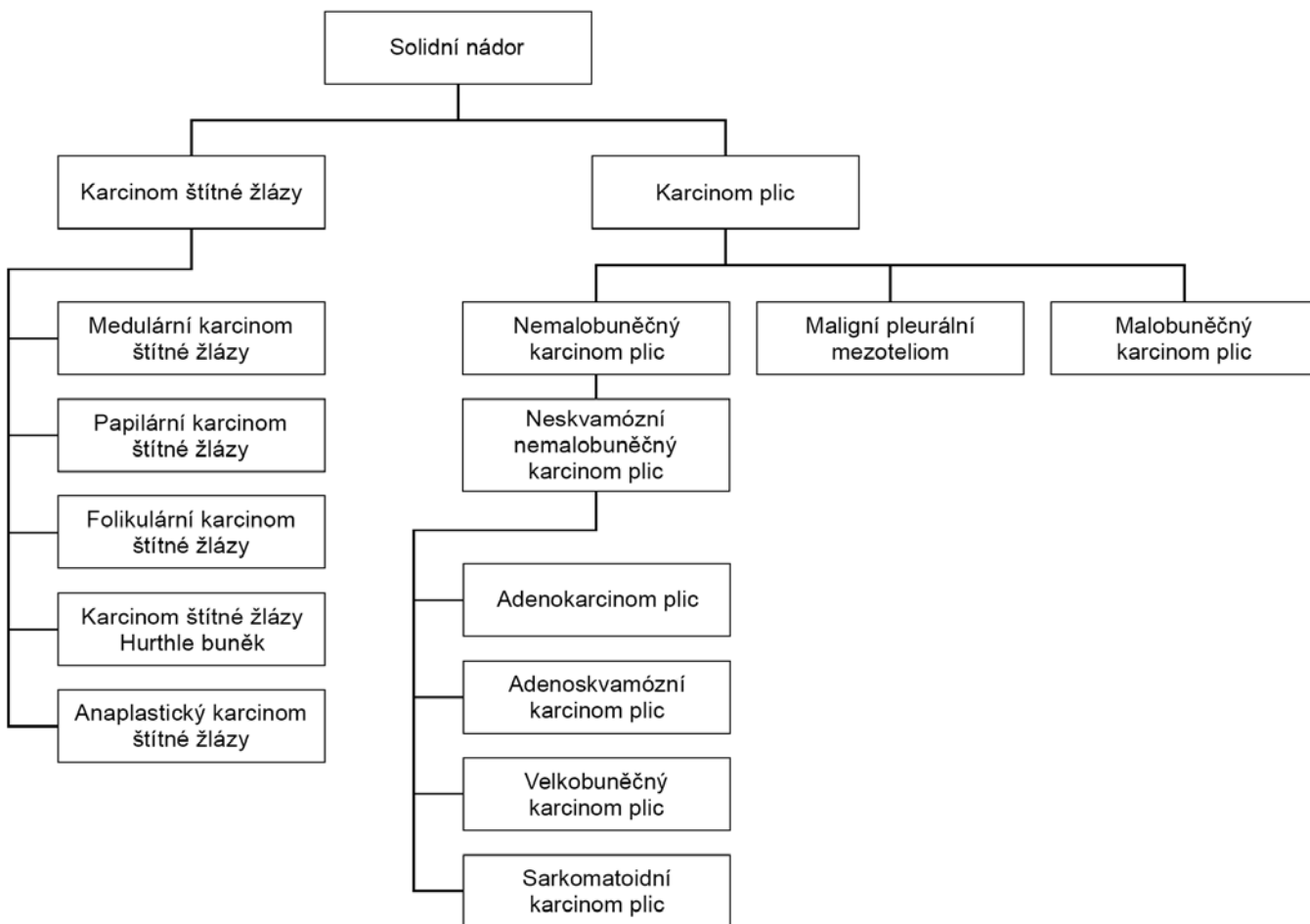


UPOZORNĚNÍ

Nesprávná volba typu nádoru může vést k nesprávným výsledkům. Vyřešte všechna varování, která se při zadávání typu nádoru objeví, abyste předešli selhání analýzy.

Výrazy pro typ nádoru jsou součástí hierarchické ontologie nemoci ve znalostní bázi, která je konstruována jako sada vztahů nadřazenosti a podřazenosti. Například výraz nemalobuněčný karcinom plic je podřízený výrazu karcinom plic, protože nemalobuněčný karcinom plic je typem karcinomu plic. **Obrázek 3** ukazuje podmnožinu příkladu ontologie nemoci zobrazující jako kořenový výraz „solidní nádor“ a termíny spojené s karcinomem plic a karcinomem štítné žlázy (další typy nádorů nejsou zobrazeny). Výraz propojený vztahem nadřazenosti a podřazenosti s termíny na nižší úrovni se nazývá předek. Připojené termíny na nižší úrovni jsou potomci tohoto předka. Například karcinom plic je předkem adenokarcinomu plic a malobuněčného karcinomu plic a medulární karcinom štítné žlázy je potomkem jak karcinomu štítné žlázy, tak solidního nádoru.

Obrázek 3 Podmnožina příkladu ontologie nemoci



Zvolený typ nádoru pro patientský vzorek ovlivňuje následující:

- ▶ Která zamýšlená použití doprovodné diagnostiky budou pro vzorek vyhodnocena. Pro toto tvrzení se vyhodnotí pouze patientské vzorky s typem nádoru, který je přesně roven typu nádoru pro zamýšlené použití doprovodné diagnostiky nebo je jeho potomkem.
- ▶ Které varianty profilování nádoru budou zahrnuty ve výkazu TSO Comprehensive.

Následující pokyny popisují proces výběru typu nádoru na obrazovce Create Run (Vytvoření běhu). Typ nádoru lze nastavit také prostřednictvím importu souboru CSV, který obsahuje typ nádoru (viz [Importování vzorků na straně 6](#)).

- 1 Poklikáním do buňky Tumor Type (Typ nádoru) v řádku vzorku si můžete zobrazit dostupné typy nádorů. Dostupné typy nádorů se zobrazí v hierarchickém seznamu v abecedním pořadí. Pole Tumor Type (Typ nádoru) slouží i k určení vzorků jako kontrolních (viz [Kontrolní vzorky na straně 6](#)).
- 2 Požadovaný typ nádoru můžete vyhledat a vybrat interaktivně v seznamu nebo pomocí lišty vyhledávání v horní části okna Tumor Type (Typ nádoru).

Příprava na kroky protokolu

- 1 Proveďte důkladnou dekontaminaci pracovních oblastí pomocí čisticího roztoku RNázu/DNázu.



UPOZORNĚNÍ

Všechny postupy v pracovním postupu vyžadují prostředí prosté RNáz/DNáz.

- 2 Nastavte programy termocykléru před amplifikací. Viz část [Programování termocyklérů na straně 4](#).
- 3 Nastavte ultrasonikátor podle pokynů od výrobce.
- 4 Pokud zpracováváte pouze vzorky DNA, přejděte přímo ke kroku [Fragmentace gDNA na straně 12](#).
- 5 Vyjměte kontroly RNA ze skladovacích prostor.
- 6 Vyjměte z krabice zkumavky s reagensy a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 3 Příprava knihovny RNA TruSight Oncology Comp (PN 20031127)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
EPH3	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Denaturace a žihání RNA
FSM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	První syntetizace vláken cDNA
RVT	-25 °C až -15 °C	Uložte na led.	První syntetizace vláken cDNA
SSM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Druhá syntetizace vláken cDNA

Tabulka 4 Příprava knihovny TruSight Oncology Comp (chlazení) (PN 20031119)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
SPB (světle zelený štítek)	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě na 30 minut.	Čištění cDNA
RSB	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Čištění cDNA

Denaturace a žihání RNA

Příprava

- 1 Připravte následující reagenty.
 - ▶ EPH3 – Odložte.
 - ▶ FSM – Promíchejte ve vortexové třepačce. Krátce odstředte a pipetováním promíchejte. Zkontrolujte, zda neobsahuje sraženiny. Pokud jsou přítomné, pipetováním promíchejte, dokud se sraženiny nerozpustí.
 - ▶ RVT – Krátce odstředte a pipetováním promíchejte. Uložte na led.

POZNÁMKA RVT je viskózní roztok. Pipetujte vždy pomalu, abyste předešli tvorbě bublin.

- 2 Ve zkumavce mikroodstředivky nakombinujte následující objemy, abyste si připravili hlavní směs FSM + RVT.

Tabulka 5 Hlavní směs FSM + RVT

Složka hlavní směsi	3 vzorky RNA (μl)	8 vzorků RNA (μl)	16 vzorků RNA (μl)	24 vzorků RNA (μl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části Nakládání s reagensiemi v příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200007789).

- 3 Pipetováním desetkrát promíchejte.
- 4 Umístěte hlavní směs FSM + RVT na led, dokud nepřejdete ke kroku *První syntetizace vláken cDNA* na straně 9.

Postup

- 1 Rozmrazte extrahované vzorky RNA a kontroly RNA na ledu.
Pro zbytek protokolu zpracovávejte kontroly RNA jako vzorky.
Informace o kvantifikaci vzorků naleznete v příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200007789).
- 2 Pipetováním každý vzorek RNA 10krát promíchejte.
- 3 Pro přípravu 40 ng každého vzorku RNA použijte vodu prostou RNáz/DNáz s konečným objemem 8,5 μl (4,7 ng/μl).
Pro kontroly RNA použijte koncentraci uvedenou na štítku zkumavky.
- 4 Označte novou 96jamkovou desku PCR jako CF (cDNA Fragments – Fragmenty cDNA).
- 5 Přidejte 8,5 μl z každého vzorku RNA do jediné jamky na desce CF PCR.
- 6 Zajistěte, aby rozložení desky se vzorky a indexy jednotlivých vzorků odpovídaly běhu naplánovanému v programu Local Run Manager během nastavení běhu.
- 7 Míchejte EPH3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 8 Přidejte 8,5 μl EPH3 do každé jamky vzorku.
- 9 Na desku CF PCR přilepte těsnění.



UPOZORNĚNÍ

Zajistěte, aby okraje a jamky byly důkladně utěsněné, a zabraňte tak odpařování.

- 10 Míchejte v třepačce při 1200 ot./min po dobu 1 minuty.
- 11 Odstředujte při 280 g po dobu 1 minuty.
- 12 Vložte na termocyklér a spusťte program LQ-RNA.
Viz část *Programování termocyklérů* na straně 4.
- 13 Když vzorky dosáhnou teploty 4 °C, vyčkejte jednu minutu a poté ihned pokračujte dalším krokem.

První syntetizace vláken cDNA

Postup

Datum a čas začátku _____

- 1 Odeberte desku CF PCR z termocykléru.
- 2 Pipetováním 5krát promíchejte hlavní směs FSM + RVT.
- 3 Přidejte 8 μl hlavní směsi FSM + RVT do každé jamky vzorku.
- 4 Pipetováním 5krát promíchejte.
- 5 Zlikvidujte zbývající hlavní směs FSM + RVT.
- 6 Na desku CF PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- 7 Míchejte v třepačce při 1200 ot./min po dobu 1 minuty.
- 8 Odstředujte při 280 g po dobu 1 minuty.
- 9 Vložte na termocyklér a spusťte program 1stSS.

Viz část *Programování termocyklérů na straně 4.*

- 10 Když vzorky dosáhnou teploty 4 °C, pokračujte ihned dalším krokem.
Vzorky prvních vláken lze uchovávat při teplotě 4 °C po dobu 5 minut.

Druhá syntetizace vláken cDNA

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Připravte následující reagensii.
 - ▶ SSM – Promíchejte 10krát v překlopné třepačce. Krátce odstředte.

Postup

- 1 Odeberte desku CF PCR z termocykléru.
- 2 Přidejte 25 µl SSM do každé vzorkové jamky.
- 3 Na desku CF PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- 4 Míchejte v třepačce při 1200 ot./min po dobu 1 minuty.
- 5 Odstředujte při 280 g po dobu 1 minuty.
- 6 Vložte na termocyklér a spusťte program 2ndSS.
Viz část *Programování termocyklérů na straně 4.*
- 7 Když vzorky dosáhnou teploty 4 °C, vyčkejte jednu minutu a poté ihned pokračujte dalším krokem.

Čištění cDNA

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Připravte následující reagensie.
 - ▶ SPB – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
 - ▶ RSB – Odložte pro účely postupu.
- 2 Připravte čerstvý 80% ethanol do 15ml nebo 50ml kónické zkumavky.

Reagencie	3 vzorky	8 vzorků	16 vzorků	24 vzorků
100% ethanol, čistý	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Voda prostá RNáz/DNáz	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Promíchejte čerstvý 80% ethanol ve vortexové třepačce.
- 4 Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako BIND1 (cDNA Binding – Pro vazbu cDNA).
- 5 Zakryjte a odložte.
- 6 Připravte magnet.

Postup

Vazba

- 1 Odeberte desku CF PCR z termocykléru.
- 2 Míchejte SPB ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic.
- 3 Ihned přidejte 90 µl SPB do každé jamky vzorku na desce BIND1 MIDI.
Pokud k dávkování SPB používáte žlab, započítejte při dávkování dostatečného množství materiálu na každý vzorek faktor přebytku 1,05. Po přidání SPB do každé jamky pro vzorek zlikvidujte veškerý zbývající materiál.
- 4 Přeneste celý objem (50 µl) jednotlivých vzorků z desky CF PCR do odpovídající jamky desky BIND1 MIDI.
- 5 Zlikvidujte prázdnou desku CF PCR.
- 6 Na desku BIND1 MIDI přilepte těsnění.

Důkladně utěsněte okraje a jamky.

- 7 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
- 8 Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.
- 9 Umístěte desku BIND1 MIDI na magnetický stojan na dobu 5 minut.
- 10 Pomocí pipety P200 nastavené na 200 µl odeberte z jednotlivých vzorkových jamek veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.

Mytí

- 1 Promyjte částice následujícím způsobem.
 - a Ponechte na magnetickém stojanu a přidejte do každé jamky 200 µl čerstvého 80% ethanolu.
 - b Počkejte 30 sekund.
 - c Z každé jamky odeberte supernatant a zlikvidujte jej.
- 2 Promyjte částice **podruhé**.
- 3 Odstraňte z jednotlivých jamek zbytek ethanolu.
Použijte pipetu P20 s jemnou špičkou.
- 4 Zlikvidujte nepoužitý 80% ethanol.

Eluování

- 1 Odeberte desku BIND1 MIDI z magnetického stojanu.
- 2 Promíchejte RSB v překlopné nebo vortexové třepačce.
- 3 Přidejte 22 µl RSB do každé vzorkové jamky.
- 4 Na desku BIND1 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 5 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
- 6 Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
- 7 Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
- 8 Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako PCF (Purified cDNA Fragments – Fragmenty vyčištěné cDNA).
Pokud končíte v bodě **BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ** na straně 11, použijte desku PCR.
- 9 Přeneste 20 µl eluátu z jednotlivých vzorkových jamek desky BIND1 MIDI do odpovídajících jamek na desce PCF.
- 10 Zlikvidujte prázdnou desku BIND1 MIDI.
- 11 Do každé vzorkové jamky na desce PCF přidejte 30 µl RSB.
- 12 Pipetováním 10krát promíchejte.
- 13 Přilepte na desku PCF těsnění a uložte ji na led.
- 14 Opět uskladněte EPH3, FSM, RVT a SSM.
- 15 Pokud zpracováváte vzorky derivované pouze z RNA (cDNA) a nezastavíte v bodě bezpečného přerušování, postupujte podle části **Provedení opravy konců a A-Tailing** na straně 14.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušování, odstředujte desku PCF PCR při 280 g po dobu 1 minuty a skladujte při teplotě od –25 °C do –15 °C až 7 dní.

Datum a čas ukončení _____

Příprava na kroky protokolu

- 1 Vyjměte kontroly DNA ze skladovacích prostor.
- 2 Vyjměte z krabice zkumavku s reagenty a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 6 Příprava knihovny TruSight Oncology Comp (chlazení) (PN 20031119)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
TEB	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Fragmentace gDNA

Fragmentace gDNA

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Při kvantifikaci vzorků dodržujte doporučení v *příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200007789)*.
- 2 Připravte následující reagencii.
 - ▶ TEB – Promíchejte v překlopné nebo vortexové třepačce.

Postup

Příprava desky

- 1 Pro přípravu desky zvolte jednu z následujících tří možností.
 - ▶ **Možnost č. 1:** Vzorky gDNA zpracovávejte současně se vzorky cDNA na desce PCF MIDI.
 - a Označte desku PCF MIDI jako LP (Library Preparation – Příprava knihovny).
 - b Umístěte do ledu a odložte pro použití v kroku *Přenos fragmentované DNA na straně 13*.
 - ▶ **Možnost č. 2:** Vzorky gDNA zpracovávejte současně se vzorky cDNA. Deska PCF PCR je zmrazená.
 - a Rozmrzte desku PCF PCR na pokojovou teplotu.
 - b Odstředíte při 280 g po dobu 1 minuty.
 - c Pipetováním 10krát promíchejte.
 - d Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako LP (Library Preparation – Příprava knihovny).
 - e Přeneste všech 50 µl každého vzorku z desky PCF PCR do odpovídající jamky na desce LP MIDI.
 - f Zlikvidujte desku PCF PCR.
 - g Přilepte těsnění a umístěte na led až do kroku *Přenos fragmentované DNA na straně 13*.
 - ▶ **Možnost č. 3:** Zpracujte vzorky pouze s gDNA.
 - a Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako LP (Library Preparation – Příprava knihovny).
 - b Pokud končíte v bodě *BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ na straně 13*, použijte desku PCR.
 - c Zakryjte a odložte pro použití v kroku *Přenos fragmentované DNA na straně 13*.

Ředění gDNA

- 1 Rozmrzte vzorky gDNA a kontroly DNA při pokojové teplotě.
Pro zbytek protokolu zpracovávejte kontroly DNA jako vzorky.
- 2 Pipetováním každý vzorek gDNA 10krát promíchejte.
- 3 Zkumavku krátce odstředíte, aby se shromáždily kapky.
- 4 Promíchejte TEB v překlopné nebo vortexové třepačce.
- 5 Pro přípravu 40 ng každého vzorku gDNA použijte TEB s konečným objemem 52 µl (0,77 ng/µl).
Rozbor vyžaduje minimální koncentraci extrakce 3,33 ng/µl, aby bylo možné použít alespoň 40 µl TEB z objemu 52 µl. Pro kontroly DNA použijte koncentraci uvedenou na štítku zkumavky. Aby se předešlo ztrátě vzorku, nepipetujte do tohoto ředění méně než 2 µl vzorku.

Fragmentace

- 1 Přidejte 52 µl z každého vzorku gDNA do samostatné jamky zkumavky ultrasonikátoru.
- 2 Zaznamenejte orientaci proužku.

- 3 Pomocí ultrasonikátoru fragmentujte gDNA na fragmenty.

Přenos fragmentované DNA

- 1 Zajistěte, aby rozložení desky se vzorky a indexy jednotlivých vzorků odpovídaly běhu naplánovanému v programu Local Run Manager během nastavení běhu.
- 2 Obnovte vzorek podle pokynů od výrobce ultrasonikátoru.
U některých typů zkumavek ultrasonikátoru může být vyžadována centrifugace za účelem konsolidace vzorku ve zkumavce.
- 3 Pro každý fragmentovaný vzorek gDNA použijte pipetu P20 s jemnými špičkami k provedení 3 transferů 16,7 µl do prázdné jamky na desce LP MIDI.
- 4 Na desku LP MIDI přilepte těsnění.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, přilepte na desku LP MIDI těsnění a odstředujte při 280 g po dobu 1 minuty. Skladujte při teplotě -25 °C až -15 °C maximálně 7 dní.

Datum a čas ukončení _____

Příprava na kroky protokolu

- 1 Připravte nádobu s ledem.
- 2 Vyjměte z krabice zkumavku s reagensy a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 7 Krabice přípravy knihovny TruSight Oncology Comp (mrazení) (PN 20031118)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
ERA1-A	-25 °C až -15 °C	Uložte na led.	Provedení opravy konců a A-Tailing
ERA1-B	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Provedení opravy konců a A-Tailing
ALB1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Ligace adaptérů
LIG3	-25 °C až -15 °C	Uložte na led.	Ligace adaptérů
SUA1 (modré víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Ligace adaptérů
UMI (bílé víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Ligace adaptérů
STL	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Ligace adaptérů
EPM	-25 °C až -15 °C	Uložte na led.	Indexace PCR

Tabulka 8 Krabice přípravy knihovny TruSight Oncology Comp (chlazení) (PN 20031119)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
SPB (světle zelený štítek)	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě na 30 minut.	Čištění ligace
RSB	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Čištění ligace

Tabulka 9 Krabice indexačních primerů TruSight Oncology Comp UP (PN 20031120)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
UPxx	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte příslušné zkumavky s indexačním primerem na pokojovou teplotu.	Indexace PCR

Tabulka 10 Krabice indexačních primerů TruSight Oncology Comp CP (PN 20031126)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
CPxx	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte příslušné zkumavky s indexačním primerem na pokojovou teplotu.	Indexace PCR

Provedení opravy konců a A-Tailing

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Předehřejte 2 mikrovzorkové inkubátory s vyhřívacími vložkami MIDI následujícím způsobem.
 - ▶ Předehřejte mikrovzorkový inkubátor na 30 °C.
 - ▶ Předehřejte mikrovzorkový inkubátor na 72 °C.
- 2 Připravte následující reagenty.
 - ▶ ERA1-A – Krátce odstředte a pipetováním promíchejte. Uložte na led.
 - ▶ ERA1-B – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte. Zkontrolujte, zda neobsahuje sraženiny. Pokud jsou přítomné, zahřejte zkumavku na 37 °C a následně pipetováním promíchejte, dokud se sraženiny nerozpustí.
- 3 Připravte hlavní směs ERA1 v mikrocentrifugační zkumavce.

Tabulka 11 Hlavní směs ERA1

Složka hlavní směsi	3 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části Nakládání s reagenty v příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200007789).

- 4 Pomalým pipetováním 10krát promíchejte, krátce odstředte a poté umístěte hlavní směs ERA1 na led.
- 5 Pro přípravu desky zvolte odpovídající možnost z následujících dvou možností.
 - ▶ **Možnost č. 1:** Když jsou vzorky na desce MIDI.
 - a Změňte označení desky MIDI na LP2 (Library Preparation 2 – Příprava knihovny 2). Pokud se některé vzorky nacházejí na samostatných deskách MIDI, přesuňte všechny vzorky do samostatných jamek na stejné MIDI desce na základě rozložení desky.
 - ▶ **Možnost č. 2:** Když je deska zmrazená.
 - a Rozmrazte desku PCF PCR nebo LP PCR na pokojovou teplotu.
 - b Odstředujte desku při 280 g po dobu 1 minuty.
 - c Pipetováním 10krát promíchejte.
 - d Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako LP2 (Library Preparation 2 – Příprava knihovny 2).
 - e Přeneste všech 50 µl každého vzorku z desky PCF PCR nebo LP PCR do odpovídající jamky na desce LP2 MIDI.
 - f Zlikvidujte desku PCF PCR nebo LP PCR.

Postup

- 1 Přidejte 10 µl hlavní směsi ERA1 do každé vzorkové jamky na desce LP2 MIDI.
- 2 Zlikvidujte zbývající hlavní směs ERA1.
- 3 Na desku LP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- 4 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
- 5 Inkubujte v předehřátém mikrovzorkovém inkubátoru při teplotě 30 °C po dobu 30 minut.
- 6 Ihned přeneste na druhý předehřátý mikrovzorkový inkubátor a inkubujte při 72 °C po dobu 20 minut.
- 7 Uložte desku LP2 MIDI na led na dobu 5 minut.

Ligace adaptérů

Tento proces liguje adaptéry na konce fragmenůcDNA nebo gDNA.

Rozbor TSO Comprehensive obsahuje adaptéry SUA1 a adaptéry UMI.

- ▶ Adaptéry SUA1 používejte se vzorky RNA.
- ▶ Adaptéry UMI používejte se vzorky DNA.

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Připravte následující reagensie.
 - ▶ ALB1 – Míchejte 10 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ LIG3 – Krátce odstředte a pipetováním promíchejte. Uložte na led.
 - ▶ SUA1 – Míchejte 10 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ UMI – Míchejte 10 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ STL – Odložte pro účely postupu.

Postup

- 1 Odeberte desku LP2 MIDI z ledu.
- 2 Přidejte 60 µl ALB1 do každé jamky vzorku na desce LP2 MIDI. Pipetování provádějte pomalu.
- 3 Přidejte 5 µl LIG3 do každé jamky vzorku.
- 4 Přidejte adaptéry.

Nekombinujte různé typy adaptérů.

 - Jamky vzorku RNA – 10 µl SUA1 (modré víčko) do každého vzorku odvozeného z RNA.
 - Jamky vzorku DNA – 10 µl UMI (bílé víčko) do každého vzorku odvozeného z DNA.
- 5 Na desku LP2 MIDI přilepte těsnění. Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 6 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
- 7 Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě.
- 8 Promíchejte STL ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 9 Přidejte 5 µl STL do každé jamky vzorku na desce LP2 MIDI.
- 10 Na desku LP2 MIDI přilepte těsnění. Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- 11 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.

Čištění ligace

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Připravte následující reagensie.
 - ▶ SPB – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
 - ▶ RSB – Odložte pro účely postupu.
- 2 Připravte čerstvý 80% ethanol do 15ml nebo 50ml kónické zkumavky.

Reagensie	3 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
100% ethanol, čistý	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Voda prostá RNáz/DNáz	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Promíchejte čerstvý 80% ethanol ve vortexové třepačce.
- 4 Připravte magnet.

Postup

Vazba

- 1 Míchejte SPB ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic.
- 2 Ihned přidejte 112 µl SPB do každé jamky vzorku na desce LP2 MIDI.
Pokud k dávkování SPB používáte žlab, započítejte při dávkování dostatečného množství materiálu na každý vzorek faktor přebytku 1,05. Po přidání SPB do každé jamky pro vzorek zlikvidujte veškerý zbývající materiál.
- 3 Na desku LP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 4 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
- 5 Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.
- 6 Umístěte desku LP2 MIDI na magnetický stojan na dobu 10 minut.
- 7 Pomocí pipety P200 nastavené na 200 µl odeberte z jednotlivých vzorkových jamek veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.

Mytí

- 1 Promyjte částice následujícím způsobem.
 - a Ponechte na magnetickém stojanu a přidejte do každé vzorkové jamky 200 µl čerstvého 80% ethanolu.
 - b Počkejte 30 sekund.
 - c Odeberte z jednotlivých jamek veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.
- 2 Promyjte částice **podruhé**.
- 3 Odstraňte z jednotlivých jamek zbytek ethanolu.
Použijte pipetu P20 s jemnou špičkou.
- 4 Zlikvidujte nepoužitý 80% ethanol.

Eluování

- 1 Odeberte desku LP2 MIDI z magnetického stojanu.
- 2 Promíchejte RSB v překlopné nebo vortexové třepačce.
- 3 Přidejte 27,5 µl RSB do každé vzorkové jamky.
- 4 Na desku LP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 5 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
- 6 Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
- 7 Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
- 8 Označte novou 96jamkovou desku PCR jako LS (Library Samples – Vzorky knihovny).
- 9 Přeneste 25 µl každého eluátu z desky LP2 MIDI do odpovídající jamky na desce LS PCR.
- 10 Zlikvidujte prázdnou desku LP2 MIDI.
- 11 Na desku LS PCR přilepte těsnění.

Indexace PCR

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Připravte následující reagenty.
 - ▶ EPM – Uložte na led.
 - ▶ UPxx – Promíchejte ve vortexové třepačce a krátce odstředte. UPxx je indexační primer vybraný na obrazovce Create Run (Vytvořit běh) v programu Local Run Manager při nastavení běhu.

- ▶ CPxx – Promíchejte ve vortexové třepačce a krátce odstředte. CPxx je indexační primer vybraný na obrazovce Create Run (Vytvořit běh) v programu Local Run Manager při nastavení běhu.
- 2 Zajistěte, aby indexy jednotlivých vzorků odpovídaly běhu naplánovanému v programu Local Run Manager během nastavení běhu. Při výběru indexu dodržujte pokyny uvedené v *příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200007789)*.

**UPOZORNĚNÍ**

Rozdíly mezi vzorky a indexačními primery způsobí, že se z důvodu špatné identifikace pozitivních vzorků vykážou nesprávné výsledky.

Postup

- 1 Přidejte 5 µl příslušného indexačního primeru (UPxx nebo CPxx) do odpovídající jamky vzorku na desce LS PCR v souladu s indexy vybranými na obrazovce Create Run (Vytvořit běh) v programu Local Run Manager při nastavení běhu.

**UPOZORNĚNÍ**

V jednu chvíli pracujte a mějte otevřenou pouze jednu zkumavku s indexačním primerem. Indexační zkumavku po použití ihned znovu uzavřete. Indexační primery nekombinujte dohromady.

- 2 Míchejte EPM 5 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 3 Přidejte 20 µl EPM do každé vzorkové jamky.
- 4 Na desku LS PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- 5 Míchejte v třepačce při 1200 ot./min po dobu 1 minuty.
- 6 Opět uskladněte reagenty před amplifikací.

**UPOZORNĚNÍ**

Provedte všechny následné kroky v postamplifikační oblasti, abyste zabránili přenosu amplifikačního produktu.

- 7 Odstředujte desku LS PCR při 280 g po dobu 1 minuty.
- 8 Umístěte ji na předem naprogramovaný postamplifikační termocyklér a spusťte program I-PCR.
Viz část *Programování termocyklérů na straně 4*.

POZNÁMKA V návaznosti na *Nastavení první hybridizace na straně 18* postupujte dle pokynů k rozmrazování reagentů v části Příprava na kroky protokolu.

- 9 Po dokončení programu I-PCR odstředujte desku LS PCR při 280 g po dobu 1 minuty.
- 10 Změňte označení desky na ALS (Amplified Library Samples – Vzorky z amplifikovaných knihoven).

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, uskladněte desku ALS PCR při teplotě od –25 °C do –15 °C až 30 dní.

Datum a čas ukončení _____

Příprava na kroky protokolu

- 1 Zkontrolujte, že jsou nastaveny programy termocykléru po amplifikaci. Viz část *Programování termocyklérů na straně 4*.
- 2 Vyjměte z krabice zkumavku s reagenty a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 12 Krabice obohacení TruSight Oncology Comp (chlazení) (PN 20031123)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
TCB1	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Nastavení první hybridizace

Tabulka 13 Krabice obohacení TruSight Oncology Comp (mrazení) (PN 20031121)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
TCA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení první hybridizace

Tabulka 14 Krabice sady obsahu TruSight Oncology Comp (PN 20031122)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
OPR1 (červené víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení první hybridizace
OPD2 (bílé víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení první hybridizace

Nastavení první hybridizace

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Připravte následující reagencie.
 - ▶ TCB1 – Zahřívejte zkumavku při teplotě 37 °C po dobu 5 minut. Míchejte 10 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ TCA1 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ OPR1 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ OPD2 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 2 Pokud byla deska ALS PCR skladována, rozmrazte ji na pokojovou teplotu a odstředte při 280 g po dobu 1 minuty. Následně pipetováním promíchejte.
- 3 Označte novou 96jamkovou desku PCR jako HYB1 (Hybridization 1 – Hybridizace 1).

Postup

- 1 Přeneste 20 µl z každé knihovny cDNA nebo gDNA z desky ALS PCR do odpovídající jamky na desce HYB1 PCR.
- 2 Na desku ALS PCR přilepte těsnění a odložte.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 3 Zkontrolujte, že se v TCB1 nenacházejí sraženiny. Pokud jsou přítomny, zahřejte zkumavku znovu a promíchejte ji ve vortexové třepačce, dokud se krystaly nerozpustí.
- 4 Přidejte 15 µl TCB1 do každé jamky knihovny na desce HYB1 PCR.
- 5 Přidejte 10 µl TCA1 do každé jamky knihovny na desce HYB1 PCR.
- 6 Přidejte sondy.
Nekombinujte různé typy sond.
 - ▶ Jamky knihovny RNA – 5 µl OPR1 do každé knihovny odvozené z RNA.
 - ▶ Jamky knihovny DNA – 5 µl OPD2 do každé knihovny odvozené z DNA.
- 7 Na desku HYB1 PCR přilepte těsnění.



UPOZORNĚNÍ

Zajistěte, aby okraje a jamky byly důkladně utěsněné, a zabraňte tak odpařování.

- 8 Míchejte v třepačce při 1200 ot./min po dobu 2 minut.
- 9 Vložte na termocyklér a spusťte program HYB1.
Viz část *Programování termocyklérů na straně 4*.
- 10 Hybridizujte při 57 °C po dobu minimálně 8 hodin a maximálně 24 hodin.
- 11 Opět uskladněte hybridizační reagencie.
- 12 Desku ALS PCR skladujte při teplotě od -25 °C do -15 °C po dobu až 30 dní.

Příprava na kroky protokolu

- 1 Na začátku 2. dne vyjměte z krabice zkumavku s reagensy a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 15 Krabice obohacení TruSight Oncology Comp (chlazení) (PN 20031123)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
SMB (tmavě modrý štítek)	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě na 30 minut.	První zachycení cílů Druhé zachycení cílů
ET2	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	První zachycení cílů Druhé zachycení cílů
HP3	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	První zachycení cílů Druhé zachycení cílů Normalizace knihoven
TCB1	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Nastavení druhé hybridizace
RSB	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Druhé zachycení cílů Čištění amplifikované obohacené knihovny

Tabulka 16 Krabice obohacení TruSight Oncology Comp (mrazení) (PN 20031121)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
EE2	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	První zachycení cílů Druhé zachycení cílů Normalizace knihoven
EEW	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	První zachycení cílů
TCA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení druhé hybridizace

Tabulka 17 Krabice sady obsahu TruSight Oncology Comp (PN 20031122)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
OPR1 (červené víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení druhé hybridizace
OPD2 (bílé víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení druhé hybridizace

První zachycení cílů

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Předehřejte mikrozorkový inkubátor s vyhřívací vložkou MIDI na 57 °C.
- 2 Připravte následující reagensy.
- ▶ EEW – Míchejte ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty.
 - ▶ EE2 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ HP3 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ SMB – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
 - ▶ Ujistěte se, že pro tento postup používáte **SMB**, nikoliv SPB.
 - ▶ ET2 – Odložte pro účely postupu.
- 3 Připravte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve zkumavce mikroodstředivky.

Tabulka 18 Eluční směs EE2 + HP3 pro první zachycení cílů

Složka eluční směsi	3 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části Nakládání s reagensiemi v příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200007789).

- 4 Promíchejte eluční směs EE2 + HP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte. Odložte pro účely kroku *Eluování*.
- 5 Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako CAP1 (Capture 1 – Zachycení 1).
- 6 Připravte magnet.

Postup

Vazba

- 1 Odeberte desku HYB1 PCR z termocykléru.
- 2 Odstředujte desku HYB1 PCR při 280 g po dobu 1 minuty.
- 3 Míchejte SMB ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic.
- 4 Ihned přidejte 150 µl SMB do každé jamky knihovny na desce CAP1 MIDI.
Pokud k dávkování SMB používáte žlab, započítejte při dávkování dostatečného množství materiálu na každý vzorek faktor přebytku 1,15. Po přidání SMB do každé jamky pro vzorek zlikvidujte veškerý zbývající materiál.
- 5 Nastavte pipetu na 50 µl a přeneste celý objem každé knihovny z desky HYB1 PCR do odpovídající jamky na desce CAP1 MIDI.
- 6 Zlikvidujte prázdnou desku HYB1 PCR.
- 7 Na desku CAP1 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- 8 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
- 9 Inkubujte v předehřátém mikrovzorkovém inkubátoru při teplotě 57 °C po dobu 25 minut.
- 10 Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
- 11 Ponechte desku CAP1 MIDI na magnetickém stojanu a pomocí pipety P200 nastavené na 200 µl odeberte veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.



UPOZORNĚNÍ

Přejděte ihned k dalšímu kroku (*Mytí*). Shluk částic se nesmí odstavit na delší dobu, pokud není přítomna kapalina.

Mytí

- 1 Promyjte částice následujícím způsobem.
 - a Odeberte desku CAP1 MIDI z magnetického stojanu.
 - b Přidejte 200 µl EEW do každé jamky.
 - c Nastavte pipetovací objem 150 µl a pipetováním minimálně 10krát promíchejte. Zajistěte resuspendaci všech částic.



UPOZORNĚNÍ

Pečlivým nasátím celého roztoku částic z jamek do špičky zajistěte, aby nebyly přítomny žádné shluky částic. Poté se podívejte na dno u všech jamek, zda neobsahují shluk. Během kroků mytí naklánějte špičku pipety ke shluku částic, aby se shluk uvolnil. Zajistěte, aby se celý shluk částic dostal do roztoku. Roztok by měl mít tmavě hnědou barvu a homogenní konzistenci.

- d Na desku CAP1 MIDI přilepte těsnění.
- e Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- f Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 4 minut.
- g Inkubujte v mikrovzorkovém inkubátoru při teplotě 57 °C po dobu 5 minut.
- h Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.

- i Ponechte na magnetickém stojanu a odeberte z jednotlivých jamek veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.
- 2 Promyjte částice **podruhé**.
- 3 Promyjte částice **potřetí**.
- 4 Odstraňte z jednotlivých jamek zbytek supernatantu.
Použijte pipetu P20 s jemnou špičkou.

Eluování

- 1 Odeberte desku CAP1 MIDI z magnetického stojanu.
- 2 Promíchejte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 3 Opatrně přidejte 17 µl eluční směsi EE2 + HP3 do každé jamky knihovny na desce CAP1 MIDI.
- 4 Zlikvidujte zbývající eluční směs EE2 + HP3.
- 5 Na desku CAP1 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 6 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
- 7 Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
- 8 Označte novou 96jamkovou desku PCR jako ELU1 (Elution 1 – Eluce 1).
- 9 Promíchejte ET2 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 10 Přidejte 5 µl ET2 do každé odpovídající jamky knihovny na desce ELU1 PCR.
- 11 Opatrně přeneste 15 µl eluátu z jednotlivých jamek knihovny na desce CAP1 MIDI do odpovídajících jamek na desce ELU1 PCR.
- 12 Zlikvidujte prázdnou desku CAP1 MIDI.
- 13 Na desku ELU1 PCR přilepte těsnění.
- 14 Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- 15 Míchejte v třepačce při 1200 ot./min po dobu 2 minut.
- 16 Opět uskladněte EEW.

Nastavení druhé hybridizace

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Připravte následující reagenty.
 - ▶ TCB1 – Zahřívejte zkumavku při teplotě 37 °C po dobu 5 minut. Míchejte 10 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ TCA1 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ OPR1 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ OPD2 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.

Postup

- 1 Zkontrolujte, že se v TCB1 nenacházejí sraženiny. Pokud jsou přítomny, zahřejte zkumavku znovu a promíchejte ve vortexové třepačce, dokud se krystaly nerozpustí.
- 2 Přidejte 15 µl TCB1 do každé jamky knihovny na desce ELU1 PCR.
- 3 Přidejte 10 µl TCA1 do každé jamky knihovny.
- 4 Přidejte sondy.

Nekombinujte různé typy sond.

 - ▶ Jamky knihovny RNA – 5 µl OPR1 do každé knihovny odvozené z RNA.
 - ▶ Jamky knihovny DNA – 5 µl OPD2 do každé knihovny odvozené z DNA.
- 5 Na desku ELU1 PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.

- 6 Míchejte v třepačce při 1200 ot./min po dobu 2 minut.
- 7 Vložte na termocyklér a spusťte program HYB2.
Viz část *Programování termocyklérů na straně 4*.
- 8 Hybridizujte při 57 °C po dobu minimálně 1,5 hodiny a maximálně 4 hodin.
- 9 Opět uskladněte TCA1, TCB1, OPR1 a OPD2.

Druhé zachycení cílů

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Předehřejte mikrovzorkový inkubátor s vyhřívací vložkou MIDI na 57 °C.
- 2 Připravte následující reagensie.
 - ▶ EE2 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ HP3 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ SMB – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
 - ▶ Ujistěte se, že pro tento postup používáte **SMB**, nikoliv SPB.
 - ▶ RSB – Odložte pro účely postupu.
 - ▶ ET2 – Odložte pro účely postupu.
- 3 Připravte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve zkumavce mikroadstředivky.

Tabulka 19 Eluční směs EE2 + HP3 pro druhé zachycení cílů

Složka eluční směsi	3 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části Nakládání s reagensiemi v příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200007789).

- 4 Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte. Odložte pro účely kroku *Eluování*.
- 5 Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako CAP2 (Capture 2 – Zachycení 2).
- 6 Připravte magnet.

Postup

Vazba

- 1 Odeberte desku ELU1 PCR z termocykléru.
- 2 Odstředujte desku ELU1 PCR při 280 g po dobu 1 minuty.
- 3 Míchejte SMB ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic.
- 4 Ihned přidejte 150 µl SMB do každé jamky knihovny na desce CAP2 MIDI.
Pokud k dávkování SMB používáte žlab, započítejte při dávkování dostatečného množství materiálu na každý vzorek faktor přebytku 1,15. Po přidání SMB do každé jamky pro vzorek zlikvidujte veškerý zbývající materiál.
- 5 Nastavte pipetu na 50 µl a přeneste celý objem každé knihovny z desky ELU1 PCR do odpovídající jamky na desce CAP2 MIDI.
- 6 Zlikvidujte prázdnou desku ELU1 PCR.
- 7 Na desku CAP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- 8 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
- 9 Inkubujte v mikrovzorkovém inkubátoru při teplotě 57 °C po dobu 25 minut.

POZNÁMKA Pokud pokračujete krokem *Amplifikace obohacené knihovny na straně 24*, postupujte dle pokynů k rozmrazování reagensů v části Příprava na kroky protokolu.

- 10 Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
- 11 Ponechte desku CAP2 MIDI na magnetickém stojanu a pomocí pipety P200 nastavené na 200 µl odeberte z jednotlivých jamek knihovny veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.



UPOZORNĚNÍ

Přejděte ihned k dalšímu kroku (*Mytí*). Shluk částic se nesmí odstavit na delší dobu, pokud není přítomna kapalina.

Mytí

- 1 Odeberte desku CAP2 MIDI z magnetického stojanu.
- 2 Promíchejte RSB v překlopné nebo vortexové třepačce.
- 3 Přidejte 200 µl RSB do každé jamky.
- 4 Na desku CAP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 5 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 4 minut.
- 6 Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
- 7 Ponechte desku CAP2 MIDI na magnetickém stojanu a odeberte veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.
- 8 Odstraňte z jednotlivých jamek zbytek supernatantu.
Použijte pipetu P20 s jemnou špičkou.

Eluování

- 1 Odeberte desku CAP2 MIDI z magnetického stojanu.
- 2 Promíchejte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 3 Přidejte 22 µl eluční směsi EE2 + HP3 do každé jamky knihovny na desce CAP2 MIDI.
- 4 Zlikvidujte zbývající eluční směs EE2 + HP3.
- 5 Na desku CAP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 6 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
- 7 Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
- 8 Označte novou 96jamkovou desku PCR jako ELU2 (Elution 2 – Eluce 2).
- 9 Promíchejte ET2 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 10 Přidejte 5 µl ET2 do každé odpovídající jamky knihovny na desce ELU2 PCR.
- 11 Opatrně přeneste 20 µl eluátu z jednotlivých jamek knihovny na desce CAP2 MIDI do odpovídajících jamek na desce ELU2 PCR.
- 12 Zlikvidujte prázdnou desku CAP2 MIDI.
- 13 Na desku ELU2 PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- 14 Míchejte v třepačce při 1200 ot./min po dobu 2 minut.
- 15 Opět uskladněte SMB, EE2, HP3 a ET2.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, odstředte desku ELU2 PCR při 280 g po dobu 1 minuty a skladujte při teplotě od -25 °C do -15 °C až 7 dní. Opět uskladněte RSB.

Datum a čas ukončení _____

Příprava na kroky protokolu

- 1 Připravte nádobu s ledem.
- 2 Vyjměte z krabice zkumavku s reagensí a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 20 Krabice obohacení TruSight Oncology Comp (mrazení) (PN 20031121)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
PPC3	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Amplifikace obohacené knihovny
EPM	-25 °C až -15 °C	Uložte na led.	Amplifikace obohacené knihovny

Tabulka 21 Krabice obohacení TruSight Oncology Comp (chlazení) (PN 20031123)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
SPB (světle zelený štítek)	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě na 30 minut.	Čištění amplifikované obohacené knihovny
RSB	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Čištění amplifikované obohacené knihovny Příprava na sekvenování

Amplifikace obohacené knihovny

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Pokud byla deska ELU2 skladována, rozmrazte ji na pokojovou teplotu a následně odstředíte při 280 g po dobu 1 minuty.

Postup

- 1 Promíchejte PPC3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 2 Přidejte 5 µl PPC3 do každé jamky knihovny na desce ELU2 PCR.
- 3 Míchejte EPM 5 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 4 Přidejte 20 µl EPM do každé jamky knihovny.
- 5 Na desku ELU2 PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- 6 Míchejte v třepačce při 1200 ot./min po dobu 2 minut.
- 7 Vložte na termocyklér a spusťte program EL-PCR.
Viz část *Programování termocyklérů na straně 4*.

POZNÁMKA Pokud pokračujete krokem *Normalizace knihoven na straně 26*, postupujte dle pokynů k rozmrazování v části Příprava na kroky protokolu.

- 8 Opět uskladněte PPC3 a EPM.

Čištění amplifikované obohacené knihovny

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Připravte následující reagensie.
 - ▶ SPB – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
 - ▶ Ujistěte se, že pro tento postup používáte **SPB**, nikoliv **SMB**.
 - ▶ RSB – Odložte pro účely postupu.

- 2 Připravte čerstvý 80% ethanol do 15ml nebo 50ml kónické zkumavky.

Reagencie	3 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
100% ethanol, čistý	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Voda prostá RNáz/DNáz	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Promíchejte čerstvý 80% ethanol ve vortexové třepačce.
 4 Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako BIND2 (Clean Up Binding – Čisticí vazba).
 5 Připravte magnet.

Postup

Vazba

- 1 Odeberte desku ELU2 PCR z termocykléru.
 2 Odstředujte desku ELU2 PCR při 280 g po dobu 1 minuty.
 3 Míchejte SPB ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic.
 4 Ihned přidejte 110 µl SPB do každé jamky knihovny na desce BIND2 MIDI.
 5 Přeneste 50 µl z každé knihovny z desky ELU2 PCR do odpovídající jamky na desce BIND2 MIDI.
 6 Zlikvidujte prázdnou desku ELU2 PCR.
 7 Na desku BIND2 MIDI přilepte těsnění.
 Důkladně utěsněte okraje a jamky.
 8 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
 9 Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.
 10 Umístěte na magnetický stojan na dobu 5 minut.
 11 Pomocí pipety P200 nastavené na 200 µl odeberte z jednotlivých jamek knihovny **veškerý** supernatant, aniž byste narušili shluk částic.

Mytí

- 1 Promyjte částice následujícím způsobem.
- a Ponechte na magnetickém stojanu a přidejte do každé jamky 200 µl čerstvého 80% ethanolu.
 - b Počkejte 30 sekund.
 - c Odeberte z jednotlivých vzorkových jamek veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.
- 2 Promyjte částice **podruhé**.
 3 Odstraňte z jednotlivých jamek zbytek ethanolu.
 Použijte pipetu P20 s jemnou špičkou.
 4 Zlikvidujte nepoužitý 80% ethanol.

Eluování

- 1 Odeberte desku BIND2 MIDI z magnetického stojanu.
 2 Promíchejte RSB v překlopné nebo vortexové třepačce.
 3 Přidejte 32 µl RSB do každé jamky knihovny.
 4 Na desku BIND2 MIDI přilepte těsnění.
 Důkladně utěsněte okraje a jamky.
 5 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
 6 Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
 7 Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
 8 Označte novou 96jamkovou desku PCR jako PL (Purified Libraries – Vyčištěné knihovny).
 9 Přeneste 30 µl každého eluátu z desky BIND2 MIDI do odpovídající jamky na desce PL PCR.
 10 Zlikvidujte prázdnou desku BIND2 MIDI.

- 11 Na desku PL PCR přilepte těsnění.
- 12 Opět uskladněte SPB.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, odstředíte desku PL PCR při 280 g po dobu 1 minuty a skladujte při teplotě od -25 °C do -15 °C až 30 dní. Opět uskladněte RSB.

Datum a čas ukončení _____

Příprava na kroky protokolu

- 1 Vyjměte z krabice zkumavku s reagensy a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 22 Krabice obohacení TruSight Oncology Comp (mrazení) (PN 20031121)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
LNA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Normalizace knihoven
EE2	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Normalizace knihoven

Tabulka 23 Krabice obohacení TruSight Oncology Comp (chlazení) (PN 20031123)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
LNB1	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě na 30 minut.	Normalizace knihoven
HP3	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Normalizace knihoven Příprava na sekvenování
LNW1	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Normalizace knihoven
LNS1	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Normalizace knihoven

- 2 Pokud stejný den pokračujete krokem *Příprava na sekvenování na straně 29*, postupujte dle pokynů k rozmrazování v části Příprava na kroky protokolu.

Normalizace knihoven

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Připravte následující reagensy.
 - ▶ LNB1 – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
 - ▶ LNA1 – Promíchejte ve vortexové třepačce.
 - ▶ EE2 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ HP3 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
 - ▶ LNW1 – Promíchejte ve vortexové třepačce. Odložte pro účely postupu.
 - ▶ LNS1 – Promíchejte ve vortexové třepačce. Odložte pro účely postupu.
- 2 Míchejte LNB1 ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic. Promíchejte LNB1 v překlopné třepačce, abyste zajistili resuspendaci částic.
- 3 Pomocí pipety P1000 nastavené na 800 μl desetkrát nasajte a vypusťte LNB1, čímž zajistíte resuspendaci.
- 4 Ihned připravte čerstvou hlavní směs LNA1 + LNB1 v kónické zkumavce.



UPOZORNĚNÍ

Proveďte úplnou resuspendaci shluku částic LNB1 v dolní části zkumavky, aby se zabránilo nekonzistentní hustotě klastru.

Tabulka 24 Hlavní směs LNA1 + LNB1

Složka hlavní směsi	3 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
LNA1	229 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části Nakládání s reagensiemi v příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200007789).

- 5 Promíchejte hlavní směs LNA1 + LNB1 ve vortexové třepačce. Odložte pro účely kroku *Vazba*.
- 6 Připravte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve zkumavce mikroodstředivky.

Tabulka 25 Eluční směs EE2 + HP3 k normalizaci knihoven

Složka eluční směsi	3 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části Nakládání s reagensiemi v příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200007789).

- 7 Promíchejte čerstvou eluční směs ve vortexové třepačce a poté krátce odstředíte. Odložte pro účely kroku *Eluování*.
- 8 Pokud byla deska PL PCR skladována, rozmrazte ji na pokojovou teplotu, odstředíte při 280 g po dobu 1 minuty a následně pipetováním promíchejte.
- 9 Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako BBN (Bead Based Normalization – Normalizace na základě částic).
- 10 Připravte magnet.

Postup

Vazba

- 1 Promíchejte hlavní směs LNA1 + LNB1 ve vortexové třepačce.
- 2 Ihned přidejte 45 µl hlavní směsi LNA1 + LNB1 do každé jamky knihovny na desce BBN MIDI.
- 3 Zlikvidujte zbývající hlavní směs LNA1 + LNB1.
- 4 Přidejte 20 µl z každé knihovny z desky PL PCR do odpovídající jamky na desce BBN MIDI.
- 5 Na desku BBN MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 6 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 30 minut.
- 7 Na desku PL PCR přilepte těsnění a opět ji uskladněte.
- 8 Umístěte desku na magnetický stojan na 2 minuty.
- 9 Ponechte ji na magnetickém stojanu a pomocí pipety P200 odeberte z jednotlivých jamek veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.

Mytí

- 1 Promyjte částice následujícím způsobem.
 - a Odeberte desku BBN MIDI z magnetického stojanu.
 - b Přidejte 45 µl LNW1 do každé jamky knihovny.
 - c Na desku BBN MIDI přilepte těsnění.
 - d Důkladně utěsněte okraje a jamky.
 - e Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 5 minut.
 - f Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
 - g Odeberte z jednotlivých jamek veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.
- 2 Promyjte částice *podruhé*.
- 3 Odstraňte z jednotlivých jamek zbytek supernatantu.

Použijte pipetu P20 s jemnou špičkou.

Eluování

- 1 Odeberte desku BBN MIDI z magnetického stojanu.
- 2 Promíchejte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 3 Přidejte 32 µl roztoku EE2 + HP3 do každé jamky knihovny na desce BBN MIDI.
- 4 Zlikvidujte zbývající eluční směs.
- 5 Na desku BBN MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 6 Míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
- 7 Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
- 8 Označte novou 96jamkovou desku PCR jako NL (Normalized Libraries – Normalizované knihovny).
- 9 Opatrně přeneste 30 µl eluátu z jednotlivých jamek knihovny na desce BBN MIDI do odpovídajících jamek na desce NL PCR.



UPOZORNĚNÍ

Pokud dojde k nasátí částic do pipetových špiček, vypustte částice zpět na desku na magnetickém stojanu, a předtím, než budete pokračovat dalším krokem postupu, vyčkejte, dokud kapalina nebude čirá (cca 2 minuty).

- 10 Zlikvidujte prázdnou desku BBN MIDI.
- 11 Promíchejte LNS1 ve vortexové třepačce.
- 12 Přidejte 30 µl LNS1 do každé jamky knihovny na nové desce NL PCR.
- 13 Pipetováním 5krát promíchejte.
- 14 Na desku NL PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 15 Opět uskladněte LNB1, LNA1, EE2, LNW1 a LNS1.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, odstředujte desku NL PCR při 280 g po dobu 1 minuty a skladujte při teplotě od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ až 30 dní.

Datum a čas ukončení _____

Příprava na kroky protokolu

S přípravou spotřebního materiálu pro sekvenování ze sady NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) (PN 20028871) začněte nejméně hodinu před použitím.

- 1 Vyjměte pufr pro ředění knihoven (HT1) ze skladovacích prostor s teplotou $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, rozmrazte na pokojovou teplotu a umístěte na led.
- 2 Při přípravě dalšího spotřebního materiálu v sadě postupujte dle pokynů k přípravě v *Referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.
 - ▶ Zásobník s reagenty NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklů)
 - ▶ Zásobník s pufrem NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklů)
 - ▶ Zásobník s průtokovou kyvetou NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklů)
- 3 Vyjměte z krabice zkumavku s reagenty a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 26 Krabice obohacení TruSight Oncology Comp (mrazení) (PN 20031121)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
PhiX Internal Control (Vnitřní kontrola PhiX) (PhiX)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu. Uložte na led.	Příprava na sekvenování

Tabulka 27 Krabice obohacení TruSight Oncology Comp (chlazení) (PN 20031123)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
HP3	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Příprava na sekvenování
RSB (růžový štítek)	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Příprava na sekvenování

Příprava na sekvenování

Příprava

Datum a čas začátku _____

- 1 Pokyny pro určení počtu knihoven a výběr indexů naleznete v *příbalovém letáku k modulu TruSight Oncology Comprehensive (dokument č. 200007789)*.
- 2 Označte zkumavku mikroodstředivky jako dHP3 (diluted HP3 – zředěné HP3).
- 3 Označte zkumavku mikroodstředivky jako dPhiX (diluted PhiX – zředěné PhiX).
- 4 Předehřejte tepelný blok pro zkumavky mikroodstředivky na 96 °C.
- 5 Připravte nádobu s ledem.

Kontrola ředění a denaturace PhiX

- 1 Promíchejte HP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 2 Nakombinujte následující objemy ve zkumavce mikroodstředivky dHP3.
 - ▶ 10 µl HP3
 - ▶ 190 µl vody prosté RNáz/DNáz
- 3 Promíchejte dHP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 4 Promíchejte RSB v překlopné nebo vortexové třepačce.
- 5 Promíchejte kontrolu PhiX ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 6 Nakombinujte následující objemy ve zkumavce mikroodstředivky dPhiX.
 - ▶ 8 µl RSB
 - ▶ 2 µl kontroly Phix
- 7 Přidejte 10 µl dHP3 do zkumavky dPhiX.
- 8 Zlikvidujte zkumavku dHP3.
- 9 Promíchejte zkumavku dPhiX ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 10 Inkubujte dPhiX 5 minut při pokojové teplotě kvůli denaturaci.
- 11 Promíchejte HT1 ve vortexové třepačce.
- 12 Ihned přidejte 980 µl předchlazeného HT1 do dPhiX.
- 13 Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 14 Umístěte dPhiX do ledu, dokud nebude použito v přípravě druhého ředění. Cílová koncentrace je 20 pM dPhiX.
- 15 Znovu uskladněte PhiX, HP3 a RSB.

Vložení do fondu a denaturace knihoven

- 1 Pokud byla deska NL PCR skladována, rozmrazte ji na pokojovou teplotu a následně odstředte při 280 g po dobu 1 minuty.

- 2 Pomocí sady vícekanálové pipety nastavené na 30 µl opatrně 5krát pipetováním promíchejte knihovny na desce NL PCR.
Pro každou knihovnu použijte čerstvé špičky.

**UPOZORNĚNÍ**

Optimální výkon zajistíte řádným promícháním knihoven.

- 3 Pro vložení do fondu, denaturaci a ředění knihoven zvolte jednu z následujících možností.
 - ▶ **Možnost č. 1:** Současná sekvenace knihoven odvozených ze vzorků RNA a vzorků DNA. Viz část *Možnost č. 1: Knihovny DNA a RNA společně na straně 30.*
 - ▶ **Možnost č. 2:** Sekvenace knihoven odvozených pouze ze vzorků DNA. Viz část *Možnost č. 2: Pouze knihovny DNA na straně 31.*
 - ▶ **Možnost č. 3:** Sekvenace knihoven odvozených pouze ze vzorků RNA. Viz část *Možnost č. 3: Pouze knihovny RNA na straně 31.*

Možnost č. 1: Knihovny DNA a RNA společně

- 1 Označte zkumavku mikroodstředivky jako PRL (Pooled RNA Libraries – Knihovny RNA ve fondu).
- 2 Označte zkumavku mikroodstředivky jako PDL (Pooled DNA Libraries – Knihovny DNA ve fondu).
- 3 Přeneste 10 µl z každé normalizované knihovny RNA (cDNA) z desky NL do zkumavky PRL.
Nedávejte do fondu dvě knihovny se stejným indexačním primerem.
- 4 Přeneste 10 µl z každé normalizované knihovny DNA z desky NL do zkumavky PDL.
Nedávejte do fondu dvě knihovny se stejným indexačním primerem.
- 5 Na desku NL PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 6 Promíchejte obě zkumavky PRL a PDL ve vortexové třepačce.
- 7 Zkumavky PRL a PDL krátce odstředte.
- 8 Inkubujte zkumavky PRL a PDL na tepelném bloku při 96 °C po dobu 2 minut.
- 9 Umístěte PRL a PDL do ledu na dobu 5 minut.
- 10 Promíchejte PRL a PDL ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 11 Umístěte zkumavky PRL a PDL do ledu.

Příprava prvního ředění

- 1 Označte 1,7ml zkumavku mikroodstředivky jako DIL1 (Dilution 1 – Ředění 1).
- 2 Přeneste 20 µl PDL do prázdné zkumavky DIL1.
- 3 Přidejte 5 µl PRL do DIL1.
- 4 Zlikvidujte zkumavky PDL a PRL.
- 5 Přidejte 475 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL1 (ředění 1 : 20).
- 6 Promíchejte zkumavku DIL1 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.

Příprava druhého ředění

- 1 Označte 2,0ml zkumavku mikroodstředivky jako DIL2 (Dilution 2 – Ředění 2).
- 2 Přeneste 40 µl DIL1 do prázdné zkumavky DIL2.
- 3 Zlikvidujte zkumavku DIL1.
- 4 Přidejte 1660 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL2 (ředění 1 : 850).
- 5 Promíchejte připravený 20pM dPhiX ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 6 Přidejte 2,5 µl připraveného 20pM dPhiX do zkumavky DIL2.
- 7 Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 8 Vložte 1300 µl DIL2 do rozmrazeného zásobníku s reagensy NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklů).
Další informace naleznete v *Referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.
- 9 Zlikvidujte zkumavku DIL2.

- 10 Odstředíte desku NL PCR při 280 g po dobu 1 minuty a skladujete při teplotě od –25 °C do –15 °C až 30 dní.
- 11 Pokračujte v sekvenaci.
Další informace naleznete v *Referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.

Možnost č. 2: Pouze knihovny DNA

- 1 Označte zkumavku mikroodstředivky jako PDL (Pooled DNA Libraries – Knihovny DNA ve fondu).
- 2 Přeneste 10 µl z každé normalizované knihovny DNA z desky NL do zkumavky PDL.
Nedávejte do fondu dvě knihovny se stejným indexačním primerem.
- 3 Na desku NL PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 4 Promíchejte zkumavku PDL ve vortexové třepačce.
- 5 Zkumavku PDL krátce odstředte.
- 6 Inkubujte zkumavku PDL na tepelném bloku při 96 °C po dobu 2 minut.
- 7 Umístěte PDL do ledu na dobu 5 minut.
- 8 Promíchejte zkumavku PDL ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 9 Umístěte zkumavku PDL do ledu.

Příprava prvního ředění

- 1 Označte 1,7ml zkumavku mikroodstředivky jako DIL1 (Dilution 1 – Ředění 1).
- 2 Přeneste 10 µl PDL do prázdné zkumavky DIL1.
- 3 Zlikvidujte zkumavku PDL.
- 4 Přidejte 190 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL1 (ředění 1 : 20).
- 5 Promíchejte DIL1 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.

Příprava druhého ředění

- 1 Označte 2,0ml zkumavku mikroodstředivky jako DIL2 (Dilution 2 – Ředění 2).
- 2 Přeneste 40 µl DIL1 do prázdné zkumavky DIL2.
- 3 Zlikvidujte zkumavku DIL1.
- 4 Přidejte 1660 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL2 (ředění 1 : 850).
- 5 Promíchejte připravený 20pM dPhiX ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 6 Přidejte 2,5 µl připraveného 20pM dPhiX do zkumavky DIL2.
- 7 Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 8 Vložte 1300 µl DIL2 do rozmrazeného zásobníku s reagensy NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklů).
Další informace naleznete v *Referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.
- 9 Zlikvidujte zkumavku DIL2.
- 10 Odstředíte desku NL PCR při 280 g po dobu 1 minuty a poté skladujete při teplotě od –25 °C do –15 °C až 30 dní.
- 11 Pokračujte v sekvenaci.
Další informace naleznete v *Referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.

Možnost č. 3: Pouze knihovny RNA

- 1 Označte zkumavku mikroodstředivky jako PRL (Pooled RNA Libraries – Knihovny RNA ve fondu).
- 2 Přeneste 10 µl z každé normalizované knihovny RNA (cDNA) z desky NL do zkumavky PRL.
Nedávejte do fondu dvě knihovny se stejným indexačním primerem.
- 3 Na desku NL PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- 4 Promíchejte zkumavku PRL ve vortexové třepačce.
- 5 Zkumavku PRL krátce odstředte.
- 6 Inkubujte zkumavku PRL na tepelném bloku při 96 °C po dobu 2 minut.
- 7 Umístěte PRL do ledu na dobu 5 minut.

- 8 Promíchejte zkumavku PRL ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 9 Umístěte zkumavku PRL do ledu.

Příprava prvního ředění

- 1 Označte 1,7ml zkumavku mikroodstředivky jako DIL1 (Dilution 1 – Ředění 1).
- 2 Přeneste 10 µl PRL do prázdné zkumavky DIL1.
- 3 Zlikvidujte zkumavku PRL.
- 4 Přidejte 190 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL1 (ředění 1 : 20).
- 5 Promíchejte DIL1 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.

Příprava druhého ředění

- 1 Označte 2,0ml zkumavku mikroodstředivky jako DIL2 (Dilution 2 – Ředění 2).
- 2 Přeneste 40 µl DIL1 do prázdné zkumavky DIL2.
- 3 Zlikvidujte zkumavku DIL1.
- 4 Přidejte 1646 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL2 (ředění 1 : 843).
- 5 Promíchejte připravený 20pM dPhiX ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 6 Přidejte 16,7 µl připraveného 20pM dPhiX do zkumavky DIL2.
- 7 Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- 8 Vložte 1300 µl DIL2 do rozmrazeného zásobníku s reagenziemi NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklů).

Další informace naleznete v *Referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.

- 9 Zlikvidujte zkumavku DIL2.
- 10 Odstřeďte desku NL PCR při 280 g po dobu 1 minuty a skladujte při teplotě od -25 °C do -15 °C až 30 dní.
- 11 Pokračujte v sekvenaci.

Další informace naleznete v *Referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah je vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. a jejích přidružených společností (dále jen „Illumina“). Slouží výlučně zákazníkovi ke smluvním účelům v souvislosti s použitím zde popsaných produktů a k žádnému jinému účelu. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen za žádným jiným účelem ani jinak sdělován, zveřejňován či rozmnožován bez předchozího písemného souhlasu společnosti Illumina. Společnost Illumina nepředává tímto dokumentem žádnou licenci na svůj patent, ochrannou známku, autorské právo či práva na základě zvykového práva ani žádná podobná práva třetích stran.

Pokyny v tomto dokumentu musí být důsledně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a řádně proškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaných produktů. Veškerý obsah tohoto dokumentu musíte před použitím takových produktů beze zbytku přečíst a pochopit.

NEDODRŽENÍ POŽADAVKU NA PŘEČTENÍ CELÉHO TEXTU A NA DŮSLEDNÉ DODRŽOVÁNÍ ZDE UVEDENÝCH POKYŇŮ MŮŽE VÉST K POŠKOZENÍ PRODUKTŮ, PORANĚNÍ OSOB, AŤ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A POVEDE KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.

SPOLEČNOST ILLUMINA NA SEBE NEBERE ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽITÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ DÍLŮ TĚCHTO PRODUKTŮ NEBO SOFTWARE).

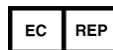
© 2022 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejich příslušných vlastníků. Informace o konkrétních ochranných známkách naleznete na adrese www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktní údaje



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornie 92122 U.S.A.
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Štítky na produktech

Úplné vysvětlení symbolů, které se mohou objevit na balení a označení produktů, naleznete v přehledu symbolů pro vaši sadu na adrese support.illumina.com.