

# Analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) labori jälgimisvorm

IN VITRO DIAGNOSTILISEKS KASUTAMISEKS  
AINULT EKSPORDIKS

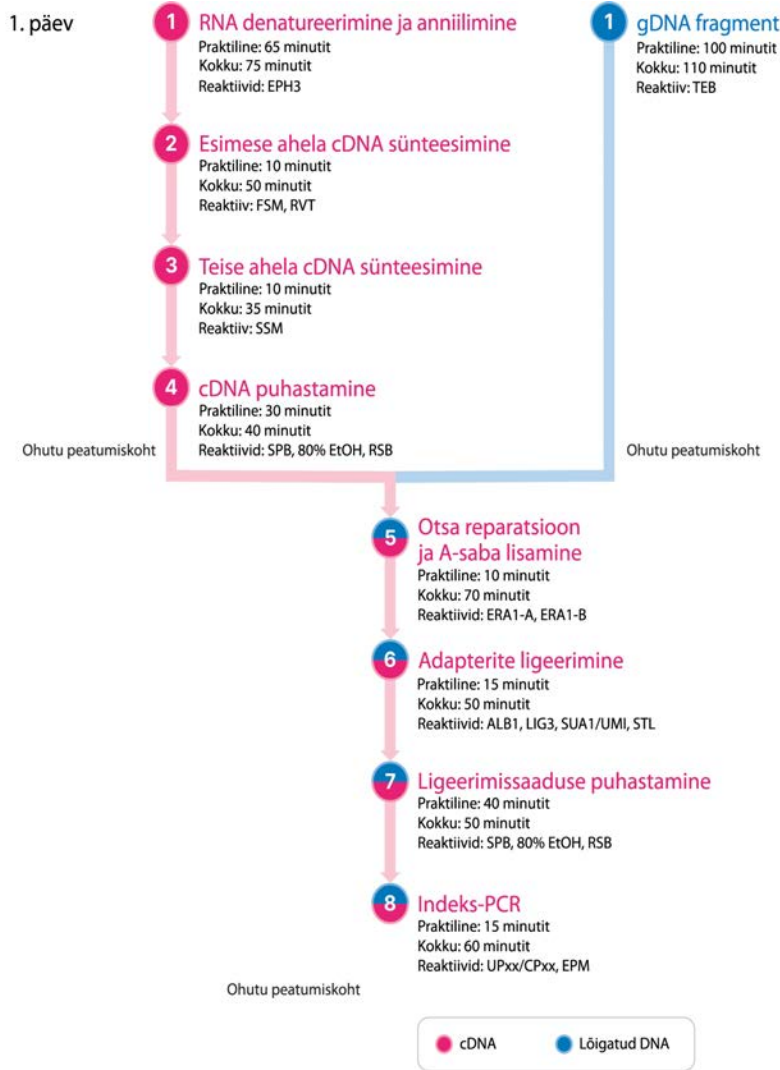
## Kasutusjuhised

Analüüsi TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) töövoo ülevaade on toodud **Joonis 1** ja **Joonis 2**.

Enne protokollide alustamist vaadake üle *Analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehes (dokument nr 200007789)* toodud hoiatused ja ettevaatusabinõud.

## Teekide valmistamise töövoog

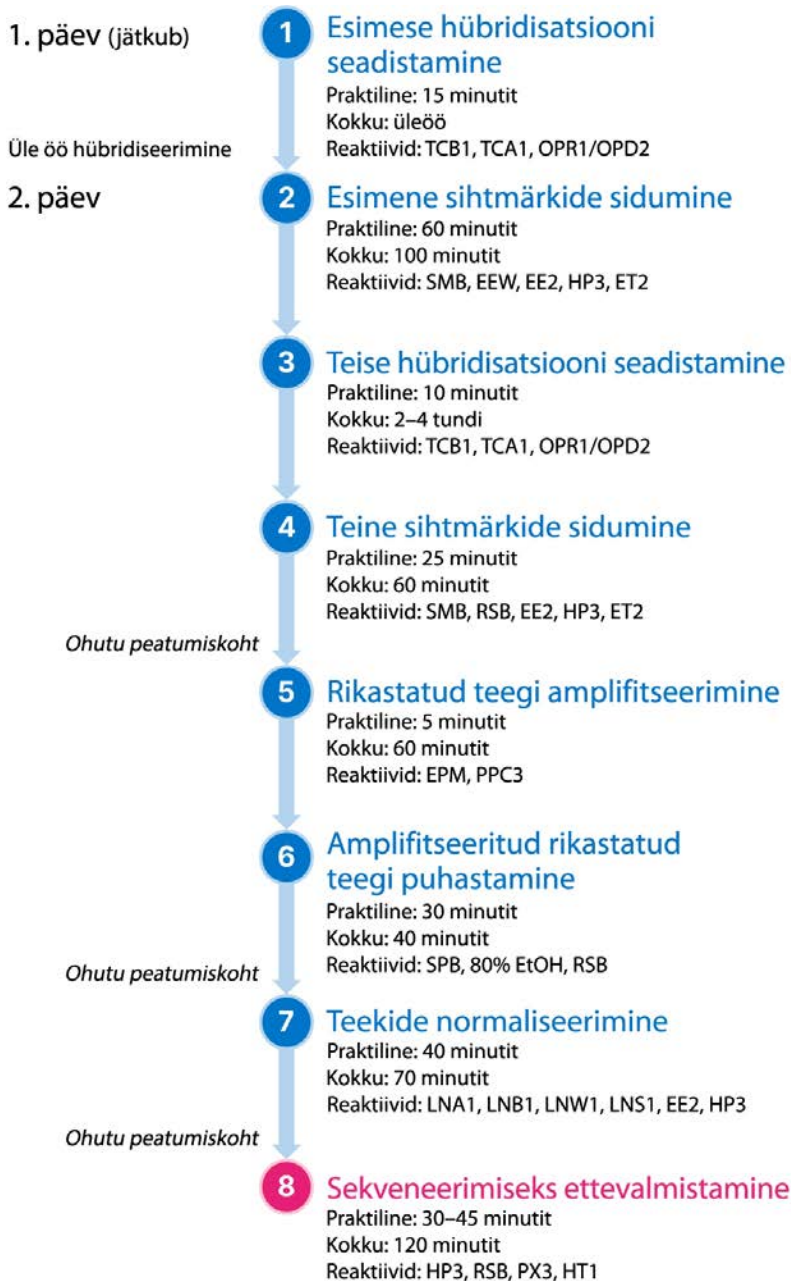
Joonis 1 Analüüsi TSO Comprehensive töövoog (1. osa)



\* Praktilised ja koguajad on ligikaudsed.

## Rikastamise töövoog

Joonis 2 Analüüsi TSO Comprehensive töövoog (2. osa)



● Rikastamine ● Sekveneerimise ettevalmistamine

## Termotsüklerite programmeerimine

- 1 Enne analüüsi alustamist salvestage amplifitseerimiseelsetesse ja -järgsetesse termotsükleritesse järgmised programmid.

Tabel 1 Amplifitseerimiseelse termotsükleri programmid

Protseduuri etapp	Programmi nimi	Kaane temperatuur	Reaktsioonimaht	Termotsükleri parameetrid
RNA denatureerimine ja noolutamine	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 65 °C 5 minutit</li> <li>• 4 °C 1 minut</li> <li>• 4 °C ootel</li> </ul>
cDNA esimese ahela sünteesimine	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 °C 10 minutit</li> <li>• 42 °C 15 minutit</li> <li>• 70 °C 15 minutit</li> <li>• 4 °C 1 minut</li> <li>• 4 °C ootel</li> </ul>
cDNA teise ahela sünteesimine	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 16 °C 25 minutit</li> <li>• 4 °C 1 minut</li> <li>• 4 °C ootel</li> </ul>

Kui etapis 2nd SS ei saa kaane temperatuuriks seada 30 °C, lülitage eelsoojendusega kaane soojendusfunktsioon välja.

Tabel 2 Amplifitseerimisjärgse termotsükleri programmid

Protseduuri etapp	Programmi nimi	Kaane temperatuur	Reaktsioonimaht	Termotsükleri parameetrid
PCR-i indekseerimine	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C 30 sekundit</li> <li>• 15 tsükliit: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C 10 sekundit</li> <li>• 60 °C 30 sekundit</li> <li>• 72 °C 30 sekundit</li> </ul> </li> <li>• 72 °C 5 minutit</li> <li>• 10 °C ootel</li> </ul>
Esimene hübridiseerimine	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C 10 minutit</li> <li>• 85 °C 2 min 30 s</li> <li>• 75 °C 2 min 30 s</li> <li>• 65 °C 2 min 30 s</li> <li>• 57 °C ootel 8–24 tundi</li> </ul>
Teine hübridiseerimine	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C 10 minutit</li> <li>• 85 °C 2 min 30 s</li> <li>• 75 °C 2 min 30 s</li> <li>• 65 °C 2 min 30 s</li> <li>• 57 °C ootel 1,5–4 tundi</li> </ul>
Rikastatud teekide amplifitseerimine	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C 30 s</li> <li>• 18 tsükliit: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C 10 s</li> <li>• 60 °C 30 s</li> <li>• 72 °C 30 s</li> </ul> </li> <li>• 72 °C 5 min</li> <li>• 10 °C ootel</li> </ul>

## Käituse teabe sisestamine

Seadme NextSeq 550Dx tarkvara Local Run Manager kasutatakse analüüsi TSO Comprehensive seadistamiseks. Lisateabe saamiseks vaadake *tarkvara Local Run Manager analüüsimooduli TruSight Oncology Comprehensive (EU) töövoogu juhendit (dokument nr 200008661)*.

Sisestage analüüsi ja proovi seadistuse teave otse analüüsimoodulisse TruSight Oncology Comprehensive.

### Käituse parameetrite määramine

- 1 Logige seadmes või võrguühendusega arvutis rakendusse Local Run Manager.
- 2 Valige suvand **Create Run** (Loo käitus), seejärel valige analüüs **TSO Comp (EU)**.
- 3 Sisestage käituse nimi, mis identifitseerib käituse sekveneerimisest analüüsini järgmiste kriteeriumidega.
  - ▶ 1–40 tähemärki.
  - ▶ Ainult tähtnumbrilised märgid, allkriipsud või sidekriipsud.
  - ▶ Allkriipsudele ja sidekriipsudele peavad eelnema ning järgnema tähtnumbrilised märgid.
  - ▶ Kordumatu seadme kõigi käituste lõikes.
- 4 **[Valikuline]** Sisestage käituse kirjeldus, et aidata käitust identifitseerida.
  - ▶ 1–150 tähemärki.
  - ▶ Ainult tähtnumbrilised märgid või tühikud.
  - ▶ Tühikutele peavad eelnema ning järgnema tähtnumbrilised märgid.

### Proovide määramine käituse jaoks

Määrake käituse proovid, kasutades üht järgmistest valikutest.

- ▶ **Proovide sisestamine käsitsi** – kasutage tühja tabelit kuval Create Run (Käituse loomine).
- ▶ **Proovide importimine** – liikuge komaeraldusega väärtuste (\*.csv) vormingus välise faili juurde. Malli saab alla laadida kuvalt Käituse loomine.



#### ETTEVAATUST!

Proovide ja indekspraimerite mittevastavus põhjustab tulemuste valesti esitamist positiivse proovi puuduliku identifitseerimise tõttu. Sisestage proovide ID-d ja määrake indeksid rakenduses Local Run Manager enne teegi valmistamise alustamist. Märkige proovide ID-d, indeksid ja plaadi süvendite asetus üles teegi valmistamise viiteks.



#### ETTEVAATUST!

Andmekao ennetamiseks veenduge enne käituse salvestamist, et KB installimine poleks käimas.

Proovide sisestamine käsitsi

- 1 Sisestage väljale Sample ID (Proovi ID) kordumatu proovi ID järgmiste kriteeriumidega. **Esmalt tuleb lisada kõik kontrollproovid.** Lisateavet vt jaotisest *Kontrollproovid leheküljel 6*.
  - ▶ 1–25 tähemärki.
  - ▶ Ainult tähtnumbrilised märgid, allkriipsud või sidekriipsud.
  - ▶ Allkriipsudele ja sidekriipsudele peavad eelnema ning järgnema tähtnumbrilised märgid.
- 2 **[Valikuline]** Sisestage väljale Sample Description (Proovi kirjeldus) proovi kirjeldus järgmiste kriteeriumidega.
  - ▶ 1–50 tähemärki.
  - ▶ Ainult tähtnumbrilised märgid, sidekriipsud, allkriipsud või tühikud.
  - ▶ Tühikutele, allkriipsudele ja sidekriipsudele peavad eelnema ning järgnema tähtnumbrilised märgid.
- 3 Valige proovi põhjal valmistatud DNA teegi ja/või RNA teegi jaoks indeks. Veenduge, et RNA- ja DNA-proovid oleksid eri veergudes.

Väli DNA i7+i5 Sequence (DNA i7 + i5 järjestus) täitub automaatselt pärast suvandi DNA Index ID (DNA indeksi ID) valimist. Väli RNA i7+i5 Sequence (RNA i7 + i5 järjestus) täitub automaatselt pärast suvandi RNA Index ID (RNA indeksi ID) valimist.

Lisaks siinsele vaadake indeksi ID valimiseks *analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehte (dokument nr 200007789)*.

- ▶ Valige ripploendist DNA Index ID (DNA indeksi ID) DNA-proovi teegi jaoks kordumatu indeksi ID (UPxx- või CPxx-indeksid).
  - ▶ Valige ripploendist RNA Index ID (RNA indeksi ID) RNA-proovi teegi jaoks kordumatu indeksi ID (ainult UPxx).
  - ▶ Kui analüüsis on kokku kolm teeki, järgige indeksi valiku juhiseid *analüüsi TruSight Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehest (dokument nr 200007789)*.
- 4 Määrake väljal Tumor Type (Kasvaja tüüp) igale proovile kasvaja tüüp, valides saadaolevatest variantidest täpseima kasvaja tüübi. Vt jaotist *Kasvaja tüübi valimine leheküljel 7*.
- 5 Määrake väljal Tumor Type (Kasvaja tüüp) igale kontrollmaterjalile üks järgmistest kontrollmaterjali tüüpidest. Vt jaotist *Kontrollproovid leheküljel 6*.
- DNA External Control (DNA-väline kontrollmaterjal)
  - RNA External Control (RNA-väline kontrollmaterjal)
  - DNA No-Template Control (DNA-matriitsita kontrollmaterjal)
  - RNA No-Template Control (RNA-matriitsita kontrollmaterjal)
- Kui kasutate kontrollmaterjali Consumable Prefix DNA Control, siis on kontrollmaterjali tüüp DNA External Control (DNA-väline kontrollmaterjal). Kui kasutate kontrollmaterjali Consumable Prefix RNA Control, siis on kontrollmaterjali tüüp RNA External Control (RNA-väline kontrollmaterjal).
- 6 Määrake sugu.
- 7 **[Valikuline]** Valige suvand **Export to CSV** (Ekspordi CSV-ks), et eksportida proovide teave välisesse faili.
- 8 Vaadake teave üle kuval Create Run (Käituse loomine).  
Vale teave võib tulemusi mõjutada.
- 9 Valige suvand **Save Run** (Salvesta analüüs).

#### Proovide importimine

- 1 Valige suvand **Import CSV** (Impordi CSV) ja sirvige proovi teabefaili asukohta. Imporditavaid faile on kaht tüüpi.
- Valige kuval Create Run (Käituse loomine) suvand **Download CSV** (Laadi alla CSV), et laadida alla uus proovi teabemall. CSV-fail sisaldab importimiseks vajalikke veerupäiseid ja vormingut. Sisestage igas veerus käituses olevate proovide kohta proovi teave. Sisestage veerus Tumor Type (Kasvaja tüüp) kasvajatüübi termin või seotud kood (vt jaotist *Kasvajatüüpide allalaadimine lk 1*). Väljal Tumor Type (Kasvaja tüüp) saab proovid ka kontrollmaterjalideks määrata (vt jaotist *Kontrollproovid leheküljel 6*).
  - Kasutage proovi teabefaili, mis on eksporditud analüüsimoodulist TSO Comprehensive funktsiooniga Export to CSV (Ekspordi CSV-ks).
- 2 Vaadake eksporditud teave üle kuval Create Run (Käituse loomine).  
Vale teave võib tulemusi mõjutada.
- 3 **[Valikuline]** Valige suvand **Export to CSV** (Ekspordi CSV-ks), et eksportida proovide teave välisesse faili.
- 4 Valige suvand **Save Run** (Salvesta analüüs).

#### Kontrollproovid

Analüüsimooduliga TSO Comprehensive tuleb kasutada paneeli kontrollmaterjale Panel Control. Proovi määramisel kontrollmaterjalina seatakse proovi sooks automaatselt Unknown (Teadmata). Proovi määramiseks kontrollmaterjalina valige väljal Tumor Type (Kasvaja tüüp) üks neljast kontrollmaterjali tüübist: DNA External Control (DNA-väline kontrollmaterjal) (positiivne DNA kontrollmaterjal), DNA No-Template Control (DNA-matriitsita kontrollmaterjal), RNA External Control (RNA-väline kontrollmaterjal) (positiivne RNA kontrollmaterjal) või RNA No-Template Control (RNA-matriitsita kontrollmaterjal). Lisateavet käituse seadistamisel mis tahes proovitüübile kasvajatüübi määramise kohta vt jaotisest *Kasvaja tüübi valimine leheküljel 7*.

Ühe käituse jooksul saab määrata iga kontrollmaterjali tüübi ainult üks kord. Kontrollmaterjaliks DNA External Control (DNA-väline kontrollmaterjal) või DNA No-Template Control (DNA-matriitsita kontrollmaterjal) võib määrata ainult DNA-teege. Kontrollmaterjaliks RNA External Control (RNA-väline kontrollmaterjal) või RNA No-Template Control (RNA-matriitsita kontrollmaterjal) võib määrata ainult RNA teege. Teeke, mis on määratud DNA-või RNA-matriitsita kontrollmaterjalidena, ei loetleta käituse maksimaalse arvu teekide võrdluses.

Kasvaja tüübi valimine

Kasvaja tüüp tuleb valida iga proovi puhul. Saadaolevad kasvajatüübid saadakse installitud teabebaasist (KB) (välja arvatud kontrollmaterjali tüübid) ja need võivad muutuda KB versiooni uuendamisel.

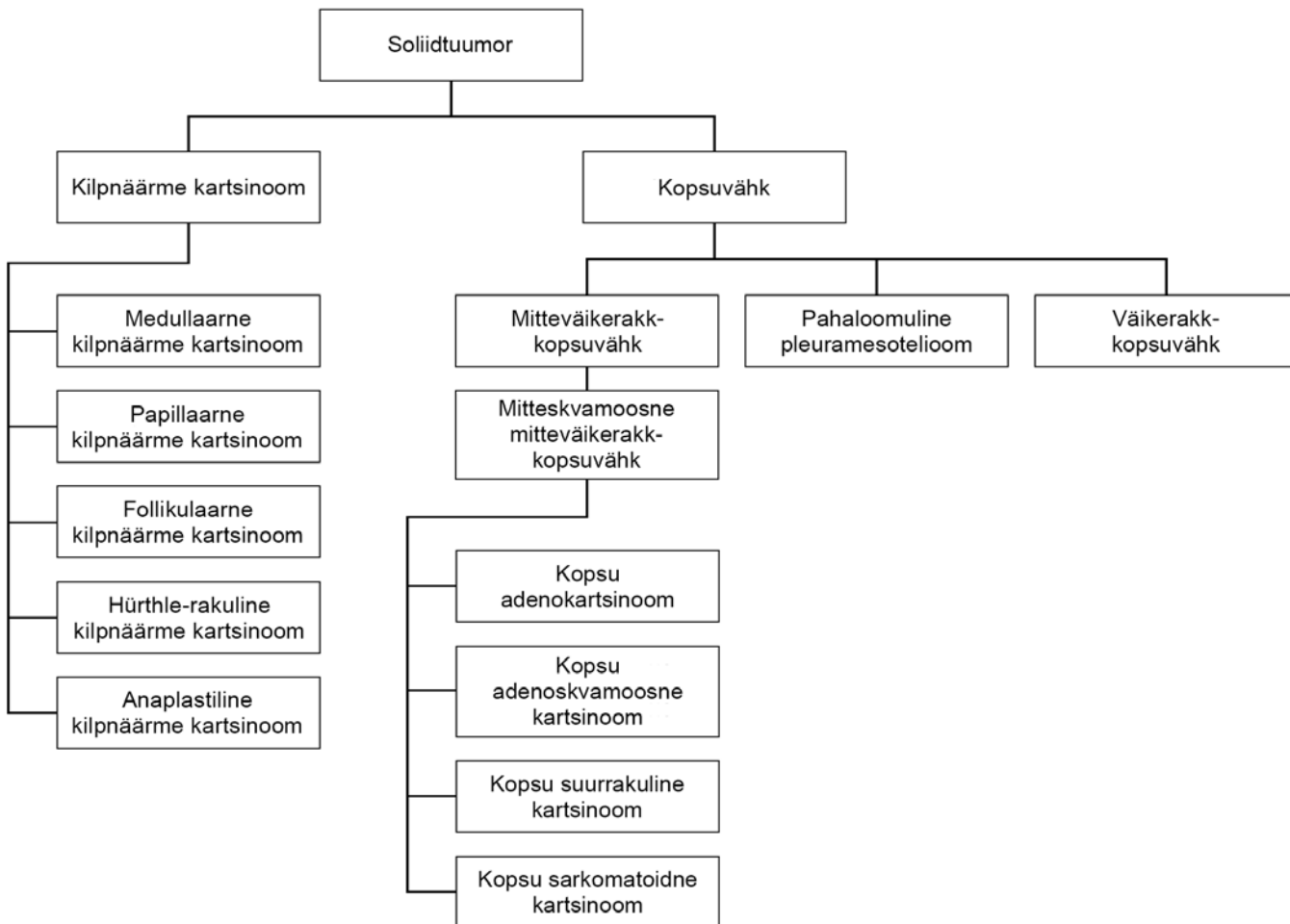


**ETTEVAATUST!**

Kasvaja tüübi valesti valimine võib põhjustada valesid tulemusi. Analüüsi nurjumise ennetamiseks lahendage kõik hoiatused, mis kuvatakse kasvaja tüüpide määramisel.

Kasvaja tüübi terminid on osa haiguse olemuse hierarhiast KB-s, mis on struktureeritud ülema-alama suhtekogumitena. Nt termin „mitteväikerakk-kopsuvähk“ kuulub alamterminina kopsuvähi alla, sest mitteväikerakk-kopsuvähk on kopsuvähi tüüp. **Joonis 3** on kujutatud haiguse olemuse alamrühmad, kus soliidtuumor on peatermin ning lisaks on toodud kopsuvähi ja kilpnäärmevähiga seotud terminid (muid kasvaja tüüpe pole näidatud). Terminit, mis on seotud ülema-alama tüüpi suhte kaudu madalama taseme terminitega, nimetatakse eellasterminiks. Seotud madalama taseme terminid on tuletatud eellasterminist. Nt kopsuvähk on kopsu adenokartsinoomi ja väikerakk-kopsuvähi eellastermin ja kilpnäärme medullaarne kartsinoom on tuletatud nii kilpnäärmevähi kui ka soliidtuumori terminitest.

Joonis 3 Haiguse olemuse näite alamrühm



Patsiendiproovi jaoks valitud kasvaja tüüp mõjutab järgmist.

- ▶ Proovi puhul hinnatavad kaasdiagnostika sihtotstarbed. Selle nõude suhtes hinnatakse ainult neid patsiendiproove, mille kasvajatüüp on kaasdiagnostika sihtotstarbe kasvajatüübi täpne vaste või järglane.
- ▶ Millised kasvajaprofiili variandid lisatakse analüüsi TSO Comprehensive aruandesse.

Järgmisena on kirjeldatud kasvaja tüübi valimisprotsessi kuval Create Run (Käituse loomine). Kasvaja tüüpi saab määrata ka seda sisaldava CSV-faili importimisega (vt jaotist *Proovide importimine leheküljel 6*).

- 1 Kuvage saadaolevad kasvajatüübid, topeltklõpsates proovi reas lahtrit Tumor Type (Kasvaja tüüp). Saadaolevad kasvaja tüübid kuvatakse hierarhilises loendis tähestikulises järjekorras. Väljal Tumor Type (Kasvaja tüüp) saab ka proovid kontrollmaterjalideks määrata (vt jaotist *Kontrollproovid leheküljel 6*).
- 2 Leidke soovitud kasvaja tüüp ja valige see, klõpsates loendis või kasutades akna Tumor Type (Kasvaja tüüp) ülaosas paiknevat otsinguriba.

### Ettevalmistamine protokollide etappideks

- 1 Dekontamineerige tööalad põhjalikult RNAasi/DNaasi inhibeeriva puhastusvahendiga.



#### ETTEVAATUST!

Kõik töövoo protseduurid nõuavad RNAasi/DNaasi-vaba keskkonda.



- 2 Määrake amplifitseerimiseelse termotsükleri programmid. Vt jaotist *Termotsüklerite programmeerimine* leheküljel 4.
- 3 Ultraheliaparaadi seadistamiseks järgige tootja juhiseid.
- 4 Ainult DNA-proovide töötlemisel jätkake otse toiminguga *gDNA fragmentimine* leheküljel 12.
- 5 Võtke RNA kontrollmaterjalid hoiult.
- 6 Võtke reaktiivikatsutid karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 3 RNA teegivalmistuskomplekt TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (osa nr 20031127)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
EPH3	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	RNA denatureerimine ja noolutamine
FSM	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	cDNA esimese ahela sünteesimine
RVT	-25 °C kuni -15 °C	Hoidke jääl.	cDNA esimese ahela sünteesimine
SSM	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	cDNA teise ahela sünteesimine

Tabel 4 Teegivalmistuskomplekt TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (osa nr 20031119)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
SPB (helerohelise etiketiga)	2 °C kuni 8 °C	Hoidke 30 minutit toatemperatuuril.	cDNA puhastamine
RSB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	cDNA puhastamine

## RNA denatureerimine ja noolutamine

### Ettevalmistamine

- 1 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
  - ▶ EPH3 – pange kõrvale.
  - ▶ FSM – keerutage segamiseks. Tsentrifugeerige lühidalt ja seejärel pipettige segamiseks. Kontrollige võimaliku sademe suhtes. Sademe olemasolul pipettige segamiseks, kuni sade lahustub.
  - ▶ RVT – tsentrifugeerige lühidalt ja seejärel pipettige segamiseks. Hoidke jääl.

**MÄRKUS.** RVT on viskoosne lahus. Mullide vältimiseks pipettige alati aeglaselt.

- 2 Ühendage mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et valmistada ette põhisegu FSM + RVT.

Tabel 5 Põhisegu FSM + RVT

Põhisegu komponent	3 RNA-proovi (µl)	8 RNA-proovi (µl)	16 RNA-proovi (µl)	24 RNA-proovi (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vaadake *analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehte (dokument nr 200007789)* jaotisest „Reaktiivide käsitlemine“.

- 3 Pipettige segamiseks 10 korda.
- 4 Asetage põhisegu FSM + RVT jääle kuni *cDNA esimese ahela sünteesimine* leheküljel 10.

### Protseduur

- 1 Sulatage eraldatud RNA-proovid ja RNA kontrollmaterjalid jääl.  
Protokolli ülejäänud osa puhul töödelge RNA kontrollmaterjale proovidena.  
Proovide kvantifitseerimiseks vaadake *analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehte (dokument nr 200007789)*.
- 2 Pipettige igat RNA-proovi segamiseks 10 korda.
- 3 Valmistage RNAasi-/DNAasivaba vee abil 40 ng igat RNA-proovi lõpliku mahuga 8,5 µl (4,7 ng/µl).

RNA kontrollmaterjalide puhul kasutage katsuti etiketil näidatud kontsentratsiooni.

- 4 Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga CF (cDNA Fragments (cDNA fragmendid))
- 5 Lisage CF-i PCR-plaadi eraldi süvenditesse 8,5 µl igat RNA-proovi.
- 6 Veenduge, et prooviplaadi paigutus ja iga proovi indeksid vastaksid rakenduses Local Run Manager käituse seadistamise ajal kavandatud käitusele.
- 7 Keerutage EPH3 segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
- 8 Lisage igasse proovisüvendisse 8,5 µl EPH3.
- 9 Pange CF-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.



#### ETTEVAATUST!

Sulgege servad ja süvendid kindlasti tihedalt, et vältida aurustumist.

- 10 Raputage 1 minut kiirusel 1200 p/min.
- 11 Tsentrifugeerige 280 × g juures 1 minut.
- 12 Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm LQ-RNA.  
Vt jaotist *Termotsüklerite programmeerimine* leheküljel 4.
- 13 Kui proovid jõuavad temperatuurile 4 °C, oodake üks minut ja seejärel jätkake kohe järgmise etapiga.

## cDNA esimese ahela sünteesimine

### Protseduur

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Eemaldage CF-i PCR-plaat termotsüklerist.
- 2 Pipettige 5 korda põhisegu FSM + RVT segamiseks.
- 3 Lisage igasse proovisüvendisse 8 µl põhisegu FSM + RVT.
- 4 Pipettige segamiseks 5 korda.
- 5 Kõrvaldage ülejäänud põhisegu FSM + RVT.
- 6 Pange CF-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
- 7 Raputage 1 minut kiirusel 1200 p/min.
- 8 Tsentrifugeerige 280 × g juures 1 minut.
- 9 Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm 1stSS.  
Vt jaotist *Termotsüklerite programmeerimine* leheküljel 4.
- 10 Kui proovid jõuavad temperatuurile 4 °C, jätkake kohe järgmise etapiga.  
Esimese ahela proove võib hoida temperatuuril 4 °C kuni 5 minutit.

## cDNA teise ahela sünteesimine

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Valmistage järgmine reaktiiv.
  - ▶ SSM – pöörake segamiseks 10 korda. Tsentrifugeerige lühidalt.

### Protseduur

- 1 Eemaldage CF-i PCR-plaat termotsüklerist.
- 2 Lisage igasse proovisüvendisse 25 µl SSM-i.
- 3 Pange CF-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
- 4 Raputage 1 minut kiirusel 1200 p/min.
- 5 Tsentrifugeerige 280 × g juures 1 minut.

- 6 Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm 2ndSS.  
Vt jaotist *Termotsüklerite programmeerimine* leheküljel 4.
- 7 Kui proovid jõuavad temperatuurile 4 °C, oodake üks minut ja seejärel jätkake kohe järgmise etapiga.

## cDNA puhastamine

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
  - ▶ SPB – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril.
  - ▶ RSB – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
- 2 Valmistage 15 ml või 50 ml koonilisse katsutisse värsket 80% EtOH.

Reaktiiv	3 proovi	8 proovi	16 proovi	24 proovi
100% etanoolalkohol, puhas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNAasi-/DNAasivaba vesi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Keerutage värsket 80% EtOH-d segamiseks.
- 4 Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga BIND1 (cDNA Binding (cDNA sidumine)).
- 5 Katke ja pange kõrvale.
- 6 Pange valmis magnet.

### Protseduur

#### Sidumine

- 1 Eemaldage CF-i PCR-plaat termotsüklerist.
- 2 Keerutage SPB-d 1 minut kerakeste resuspendeerimiseks.
- 3 Lisage 90 µl SPB-d kohe igasse BIND1 MIDI-plaadi proovisüvendisse.  
Kui kasutate SPB väljutamiseks vanni, arvestage proovi kohta piisava materjali alikvootimisel ülejäägiteguriga 1,05. Kui SPB on kõigisse proovisüvenditesse lisatud, kõrvaldage ülejäänud materjal.
- 4 Kandke iga proovi tervikmaht (50 µl) CF-i PCR-plaadilt BIND1 MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
- 5 Kõrvaldage tühi CF-i PCR-plaat.
- 6 Pange BIND1 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 7 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 8 Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
- 9 Asetage BIND1 MIDI-plaat 5 minutiks magnetlusele.
- 10 Eemaldage tasemele 200 µl seatud pipeti P200 abil kõigist proovisüvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ja kõrvaldage.

#### Pesemine

- 1 Peske kerakesi järgmiselt.
  - a Hoidke magnetlusele ja lisage igasse süvendisse 200 µl värsket 80% EtOH-d.
  - b Oodake 30 sekundit.
  - c Eemaldage kõigist süvenditest kogu supernatant ja kõrvaldage.
- 2 Peske kerakesi **teist** korda.
- 3 Eemaldage EtOH jääk kõigist süvenditest.  
Kasutage peenotsakuga pipette P20.
- 4 Kõrvaldage kasutamata 80% EtOH.

## Elueerimine

- 1 Eemaldage BIND1 MIDI-plaat magnetaluselt.
- 2 Pöörake või keerutage RSB-d segamiseks.
- 3 Lisage igasse proovisüvendisse 22 µl RSB-d.
- 4 Pange BIND1 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend. Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 5 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 6 Inkubeerige 2 minutit toatemperatuuril.
- 7 Asetage 2 minutiks magnetalusale.
- 8 Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga PCF (Purified cDNA Fragments (Puhastatud cDNA fragmendid)).  
Kui peatute **OHUTU PEATUMISKOHT** leheküljel 12), kasutage PCR-plaati.
- 9 Kandke 20 µl eluaati igast BIND1 MIDI-plaadi proovisüvendist PCF-plaadi vastavasse süvendisse.
- 10 Kõrvaldage tühi BIND1 MIDI-plaat.
- 11 Lisage 30 µl RSB-d igasse PCF-plaadi proovisüvendisse.
- 12 Pipettige segamiseks 10 korda.
- 13 Pange PCF-plaadile adhesiivne plaaditihend ja hoidke seda jääl.
- 14 Pange EPH3, FSM, RVT ja SSM tagasi hoiule.
- 15 Kui töötlete ainult RNA-st (cDNA-st) saadud proove ega peatu ohutus peatumiskohas, jätkake toiminguga **Lõplik reparatsioon ja A-saba lisamine** leheküljel 14).

**OHUTU PEATUMISKOHT**

Peatumisel tsentrifuugige PCF-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril –25 °C kuni –15 °C kuni 7 päeva.

Lõppkuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

## Ettevalmistamine protokolliga etappideks

- 1 Võtke DNA kontrollmaterjalid hoiult.
- 2 Võtke reaktiivikatsuti karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 6 Teegivalmistuskomplekt TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (osa nr 20031119)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolliga etapp
TEB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	gDNA fragmentimine

## gDNA fragmentimine

## Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Proovide kvantifitseerimiseks järgige kindlasti *analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehes (dokument nr 200007789)* toodud soovitusi.
- 2 Valmistage järgmine reaktiiv.
  - ▶ TEB – pöörake või keerutage segamiseks.

## Protseduur

## Plaadi valmistamine

- 1 Valmistage plaat ette ühel kolmest järgmisest meetodist.
  - ▶ **1. võimalus:** töödelge gDNA-proove samaaegselt cDNA-proovidega PCF-i MIDI-plaadil.

- a Märgistage PCF-i MIDI-plaat etiketiga LP (Library Preparation (Teegi valmistamine)).
  - b Asetage jääle ja pange kõrvale toimingus *Fragmenditud DNA ülekandmine leheküljel 13*) kasutamiseks.
- ▶ **2. võimalus:** tödelge gDNA-proove samaaegselt cDNA-proovidega, nii et PCF-i MIDI-plaat on külmutatud.
- a Sulatage PCF-i PCR-plaat toatemperatuurile.
  - b Tsentrifugeerige 280 × g juures 1 minut.
  - c Pipettige segamiseks 10 korda.
  - d Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga LP (Library Preparation (Teegi valmistamine)).
  - e Kandke iga proovi tervikmaht (50 µl) PCF-i PCR-plaadilt LP MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
  - f Kõrvaldage PCF-i PCR-plaat.
  - g Pange peale adhesiivne plaaditihend ja asetage jääle kuni toiminguni *Fragmenditud DNA ülekandmine leheküljel 13*).
- ▶ **3. võimalus:** tödelge ainult gDNA-proove.
- a Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga LP (Library Preparation (Teegi valmistamine)).
  - b Kui peatute *OHUTU PEATUMISKOHT leheküljel 13*), kasutage PCR-plaati.
  - c Katke ja pange kõrvale toimingus *Fragmenditud DNA ülekandmine leheküljel 13*) kasutamiseks.

## gDNA lahjendamine

- 1 Sulatage gDNA-proovid ja DNA kontrollmaterjalid toatemperatuuril.  
Protokollile ülejäänud osa puhul tödelge DNA kontrollmaterjale proovidenä.
- 2 Pipettige iga gDNA-proovi segamiseks 10 korda.
- 3 Tsentrifugeerige katsuti lühidalt, et tilgad kokku koguda.
- 4 Pöörake või keerutage TEB-d segamiseks.
- 5 Kasutage TEB-d 40 ng iga gDNA-proovi valmistamiseks lõpliku mahuga 52 µl (0,77 ng/µl).  
Analüüsi jaoks on nõutav minimaalne eraldamiskontsentratsioon 3,33 ng/µl, et võimaldada 52 µl mahust eraldada vähemalt 40 µl TEB-d. DNA kontrollmaterjalide puhul kasutage katsuti etiketil näidatud kontsentratsiooni. Proovi kao vältimiseks ärge pipettige sellesse lahusesse vähem kui 2 µl proovi.

## Fragmentimine

- 1 Lisage 52 µl iga gDNA-proovi ultraheliaparaadi katsuti eraldi süvendisse.
- 2 Märkige üles riba asend.
- 3 Fragmentige gDNA ultraheliaparaadi abil.

## Fragmenditud DNA ülekandmine

- 1 Veenduge, et prooviplaadi paigutus ja iga proovi indeksid vastaksid rakenduses Local Run Manager käituse seadistamise ajal kavandatud käitusele.
- 2 Proovi kogumiseks järgige ultraheliaparaadi tootja juhiseid.  
Mõne ultraheliaparaadi katsutiübi puhul võib proovi katsutis tihendamiseks olla vajalik tsentrifugeerimine.
- 3 Kandke iga fragmenditud gDNA-proovi puhul peenotsakuga pipeti P20 abil LP MIDI plaadi tühja süvendisse 3 korda 16,7 µl.
- 4 Pange LP MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.

**OHUTU PEATUMISKOHT**

Peatumisel pange LP PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend ja tsentrifugeerige 280 × g juures 1 minut. Säilitage temperatuuril –25 °C kuni –15 °C kuni 7 päeva.

Lõppkuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

## Ettevalmistamine protokollide etappideks

- 1 Valmistage ette jäänõu.
- 2 Võtke reaktiivikatsuti karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 7 Teegivalmistuskomplekti TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) karp (osa nr 20031118)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
ERA1-A	-25 °C kuni -15 °C	Hoidke jääl.	Lõplik reparatsioon ja A-saba lisamine
ERA1-B	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Lõplik reparatsioon ja A-saba lisamine
ALB1	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Adapterite ligeerimine
LIG3	-25 °C kuni -15 °C	Hoidke jääl.	Adapterite ligeerimine
SUA1 (sinise korgiga)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Adapterite ligeerimine
UMI (valge korgiga)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Adapterite ligeerimine
STL	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Adapterite ligeerimine
EPM	-25 °C kuni -15 °C	Hoidke jääl.	PCR-i indekseerimine

Tabel 8 Teegivalmistuskomplekti TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) karp (osa nr 20031119)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
SPB (helerohelise etiketiga)	2 °C kuni 8 °C	Hoidke 30 minutit toatemperatuuril.	Ligaasi puhastamine
RSB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Ligaasi puhastamine

Tabel 9 Indekspraimerite TruSight Oncology Comp UP Index Primers karp (osa nr 20031120)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
UPxx	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage sobivad indekspraimeride katsutid toatemperatuurile.	PCR-i indekseerimine

Tabel 10 Indekspraimerite TruSight Oncology Comp CP Index Primers karp (osa nr 20031126)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
CPxx	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage sobivad indekspraimeride katsutid toatemperatuurile.	PCR-i indekseerimine

## Lõplik reparatsioon ja A-saba lisamine

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Eelsoojendage 2 MIDI soojendusploki insertidega mikroproovide inkubaatorit järgmiselt.
  - ▶ Eelsoojendage mikroproovide inkubaator temperatuurini 30 °C.
  - ▶ Eelsoojendage mikroproovide inkubaator temperatuurini 72 °C.
- 2 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
  - ▶ ERA1-A – tsentrifugeerige lühidalt ja seejärel pipettige segamiseks. Hoidke jääl.
  - ▶ ERA1-B – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt. Kontrollige võimaliku sademe suhtes. Sademe olemasolul soojendage katsuti temperatuurini 37 °C ja seejärel pipettige segamiseks, kuni sade lahustub.
- 3 Valmistage mikrotsentrifuugi katsutis põhisegu ERA1.

Tabel 11 Põhisegu ERA1

Põhisegu komponent	3 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vaadake *analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehe (dokument nr 200007789)* jaotisest „Reaktiivide käsitlemine“.

- 4 Pipettige segamiseks aeglaselt 10 korda, tsentrifuugige lühidalt ja seejärel pange põhisegu ERA1 jääle.
- 5 Valmistage plaat ette ühel kahest järgmisest meetodist.
  - ▶ **1. võimalus:** kui proovid on MIDI-plaadil.
    - a Märgistage uuesti MIDI-plaat etiketiga LP2 (Library Preparation 2 (Teegi valmistamine 2)). Kui mõned proovid asuvad eraldi MIDI-plaadidel, viige kõik proovid sama MIDI-plaadi eraldi süvenditesse vastavalt plaadi paigutusele.
    - ▶ **2. võimalus:** kui plaat on külmutatud.
      - a Sulatage PCF-i PCR-plaat või LP PCR-plaat toatemperatuurile.
      - b Tsentrifugeerige plaati 280 × g juures 1 minut.
      - c Pipettige segamiseks 10 korda.
      - d Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga LP2 (Library Preparation 2 (Teegi valmistamine 2)).
      - e Kandke iga proovi tervikmaht (50 µl) PCF-i PCR-plaadilt või LP PCR-plaadilt LP2 MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
      - f Kõrvaldage PCF-i PCR-plaat või LP PCR-plaat.

### Protseduur

- 1 Lisage LP2 MIDI-plaadi igasse proovisüvendisse 10 µl põhisegu ERA1.
- 2 Kõrvaldage ülejäänud põhisegu ERA1.
- 3 Pange LP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend. Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
- 4 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 5 Inkubeerige eelsoojendatud mikroproovide inkubaatoris 30 minutit temperatuuril 30 °C.
- 6 Kandke kohe üle teise eelsoojendatud mikroproovide inkubaatorisse ja inkubeerige 20 minutit temperatuuril 72 °C.
- 7 Pange LP2 MIDI-plaat 5 minutiks jääle.

### Adapterite ligeerimine

See protsess ligeerib adapterid cDNA ja/või gDNA fragmentide otstes.

Analüüs TSO Comprehensive sisaldab adaptereid SUA1 ja UMI.

- ▶ Adaptereid SUA1 kasutage RNA-proovidega.
- ▶ Adaptereid UMI kasutage DNA-proovidega.

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
  - ▶ ALB1 – keerutage segamiseks vähemalt 10 sekundit ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ LIG3 – tsentrifuugige lühidalt ja seejärel pipettige segamiseks. Hoidke jääl.
  - ▶ SUA1 – keerutage segamiseks vähemalt 10 sekundit ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ UMI – keerutage segamiseks vähemalt 10 sekundit ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ STL – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.

### Protseduur

- 1 Eemaldage LP2 MIDI-plaat jäält.
- 2 Lisage LP2 MIDI-plaadi igasse proovisüvendisse aeglaselt pipettides 60 µl ALB1.
- 3 Lisage igasse proovisüvendisse 5 µl LIG3.
- 4 Lisage adapterid.
  - Ärge** kasutage korraga eri tüüpi adaptereid.
    - **RNA-proovi süvendid** – 10 µl SUA1 (sinise korgiga) igale RNA-st saadud proovile.
    - **DNA-proovi süvendid** – 10 µl UMI-d (valge korgiga) igale DNA-st saadud proovile.
- 5 Pange LP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend. Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 6 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 7 Inkubeerige 30 minutit toatemperatuuril.
- 8 Keerutage STL-i segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 9 Lisage LP2 MIDI-plaadi igasse proovisüvendisse 5 µl STL-i.
- 10 Pange LP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend. Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
- 11 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.

## Ligaasi puhastamine

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
  - ▶ SPB – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril.
  - ▶ RSB – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
- 2 Valmistage 15 ml või 50 ml koonilisse katsutisse värsket 80% EtOH.

Reaktiiv	3 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
100% etanoolalkohol, puhas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNAasi-/DNAasivaba vesi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Keerutage värsket 80% EtOH-d segamiseks.
- 4 Pange valmis magnet.

### Protseduur

#### Sidumine

- 1 Keerutage SPB-d 1 minut kerakeste resuspendeerimiseks.
- 2 Lisage 112 µl SPB-d kohe igasse LP2 MIDI-plaadi proovisüvendisse. Kui kasutate SPB väljutamiseks vanni, arvestage proovi kohta piisava materjali alikvootimisel ülejäägiteguriga 1,05. Kui SPB on kõigisse proovisüvenditesse lisatud, kõrvaldage ülejäänud materjal.
- 3 Pange LP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend. Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 4 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 5 Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
- 6 Asetage LP2 MIDI-plaat 10 minutiks magnetlusele.
- 7 Eemaldage tasemele 200 µl seatud pipeti P200 abil kõigist proovisüvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ning kõrvaldage see.



## Pesemine

- 1 Peske kerakesi järgmiselt.
  - a Hoidke magnetalusel ja lisage igasse proovisüvendisse 200 µl värsket 80% EtOH-d.
  - b Oodake 30 sekundit.
  - c Eemaldage kõigist süvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ning kõrvaldage see.
- 2 Peske kerakesi **teist** korda.
- 3 Eemaldage EtOH jääk kõigist süvenditest.  
Kasutage peenotsakuga pipette P20.
- 4 Kõrvaldage kasutamata 80% EtOH.

## Elueerimine

- 1 Eemaldage LP2 MIDI-plaat magnetaluselt.
- 2 Pöörake või keerutage RSB-d segamiseks.
- 3 Lisage igasse proovisüvendisse 27.5 µl RSB-d.
- 4 Pange LP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 5 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 6 Inkubeerige 2 minutit toatemperatuuril.
- 7 Asetage 2 minutiks magnetalusele.
- 8 Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga LS (Library Samples (Teegiproovid)).
- 9 Kandke 25 µl igat eluaati LP2 MIDI-plaadilt LS-i PCR-plaadi vastavasse süvendisse.
- 10 Kõrvaldage tühi LP2 MIDI-plaat.
- 11 Pange LS-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.

## PCR-i indekseerimine

## Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
  - ▶ EpM – hoidke jääl.
  - ▶ UPxx – keerutage segamiseks ja tsentrifuugige lühidalt. UPxx on rakenduses Local Run Manager käituse seadistamise ajal kuval Create Run (Käituse loomine) valitud indekspraimer.
  - ▶ CPxx – keerutage segamiseks ja tsentrifuugige lühidalt. CPxx on rakenduses Local Run Manager käituse seadistamise ajal kuval Create Run (Käituse loomine) valitud indekspraimer.
- 2 Veenduge, et iga proovi indeksid vastaksid rakenduses Local Run Manager käituse seadistamise ajal kavandatud käitusele. Indeksi valimiseks järgige kindlasti *analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehes (dokument nr 200007789)* toodud juhiseid.

**ETTEVAATUST!**

Proovide ja indekspraimerite mittevastavus põhjustab tulemuste valesti esitamist positiivse proovi puuduliku identifitseerimise tõttu.

## Protseduur

- 1 Lisage 5 µl sobivat indekspraimerit (UPxx või CPxx) LS-i PCR-plaadi vastavasse proovisüvendisse vastavalt rakenduses Local Run Manager käituse seadistamise ajal kuval Create Run (Käituse loomine) valitud indeksitele.

**ETTEVAATUST!**

Käsitsege ja avage korraga ainult üks indekspraimerit katsuti. Sulgege kõik indeksikatsutid korgiga kohe pärast kasutamist. Ärge kasutage erinevaid indekspraimereid korraga.

- 2 Keerutage EPM-i segamiseks 5 sekundit ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 3 Lisage igasse proovisüvendisse 20 µl EPM-i.
- 4 Pange LS-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
- 5 Raputage 1 minut kiirusel 1200 p/min.
- 6 Pange amplifitseerimiseelsed reaktiivid tagasi hoiule.



**ETTEVAATUST!**

Tehke kõik järgmised toimingud amplifitseerimisjärgses alas, et vältida amplifitseerimisprodukti ülekandumist.

- 7 Tsentrifuge LS-i PCR-plaati 280 x g juures 1 minut.
- 8 Asetage eelprogrammeeritud amplifitseerimisjärgsesse termotsüklerisse ja käivitage programm I-PCR.  
Vt jaotist *Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 4.*

**MÄRKUS.** Kui jätkate toiminguga *Esimese hübriidsatsiooni seadistamine leheküljel 19*), järgige reaktiivide sulatamisjuhiseid jaotises „Ettevalmistamine protokoll etappideks“.

- 9 Kui programm I-PCR on lõppenud, tsentrifuugige LS-i PCR-plaati 280 x g juures 1 minut.
- 10 Märgistage plaat uuesti etiketiga ALS (Amplified Library Samples (Amplifitseeritud teegiproovid)).

**OHUTU PEATUMISKOHT**

Peatumisel säilitage ALS-i PCR-plaati temperatuuril –25 °C kuni –15 °C kuni 30 päeva.

Lõppkuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

**Ettevalmistamine protokoll etappideks**

- 1 Veenduge, et amplifitseerimisjärgse termotsükleri programmid oleksid määratud. Vt jaotist *Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 4.*
- 2 Võtke reaktiivikatsuti karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 12 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) karp (osa nr 20031123)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
TCB1	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Esimese hübriidsatsiooni seadistamine

Tabel 13 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) karp (osa nr 20031121)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
TCA1	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Esimese hübriidsatsiooni seadistamine

Tabel 14 Sisukomplekti TruSight Oncology Comp Content Set karp (osa nr 20031122)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
OPR1 (punase korgiga)	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Esimese hübriidsatsiooni seadistamine
OPD2 (valge korgiga)	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Esimese hübriidsatsiooni seadistamine

## Esimese hübridisatsiooni seadistamine

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
  - ▶ TCB1 – soojendage katsutit 5 minutit temperatuuril 37 °C. Keerutage segamiseks 10 sekundit ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
  - ▶ TCA1 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
  - ▶ OPR1 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
  - ▶ OPD2 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
- 2 Hoiustatud ALS-i PCR-plaat sulatage toatemperatuurile ja seejärel tsentrifugeerige 280 x g juures 1 minut. Seejärel pipettige segamiseks.
- 3 Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga HYB1 (Hybridization 1 (Hübridiseerimine 1))

### Protseduur

- 1 Kandke 20 µl igat cDNA ja/või gDNA teeki ALS-i PCR-plaadilt HYB1 PCR-plaadi vastavasse süvendisse.
- 2 Pange ALS-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend ja asetage plaat kõrvale. Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 3 Kontrollige TCB1 võimaliku sademe suhtes. Sademe olemasolul soojendage katsutit uuesti ja keerutage seda, kuni kristallid lahustuvad.
- 4 Lisage HYB1 PCR-plaadi igasse teegisüvendisse 15 µl TCB1.
- 5 Lisage HYB1 PCR-plaadi igasse teegisüvendisse 10 µl TCA1.
- 6 Lisage sondid.
  - ▶ **Ärge** kasutage korraga eri tüüpi sonde.
  - ▶ **RNA teegi süvendid** – 5 µl OPR1 igale RNA-st saadud teegile.
  - ▶ **DNA teegi süvendid** – 5 µl OPD2 igale DNA-st saadud teegile.
- 7 Pange HYB1 PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.



#### ETTEVAATUST!

Sulgege servad ja süvendid kindlasti tihedalt, et vältida aurustumist.

- 8 Raputage 2 minutit kiirusel 1200 p/min.
- 9 Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm HYB1.  
Vt jaotist *Termotsüklerite programmeerimine* leheküljel 4.
- 10 Hübridiseerige temperatuuril 57 °C vähemalt 8 tundi ja kuni 24 tundi.
- 11 Pange hübridiseerimisreaktiivid tagasi hoiule.
- 12 Säilitage ALS-i PCR-plaati temperatuuril –25 °C kuni –15 °C kuni 30 päeva.

## Ettevalmistamine protokolliga etappideks

- 1 2. päeva alguses võtke reaktiivikatsuti karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 15 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) karp (osa nr 20031123)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolliga etapp
SMB (tumesinise etiketiga)	2 °C kuni 8 °C	Hoidke 30 minutit toatemperatuuril.	Esimese sihtmärkide kinnistamine Teine sihtmärkide kinnistamine
ET2	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Esimese sihtmärkide kinnistamine Teine sihtmärkide kinnistamine

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
HP3	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Esimene sihtmärkide kinnistamine Teine sihtmärkide kinnistamine Teekide normaliseerimine
TCB1	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Teise hübridisatsiooni seadistamine
RSB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Teine sihtmärkide kinnistamine Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine

Tabel 16 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) karp (osa nr 20031121)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
EE2	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Esimene sihtmärkide kinnistamine Teine sihtmärkide kinnistamine Teekide normaliseerimine
EEW	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Esimene sihtmärkide kinnistamine
TCA1	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Teise hübridisatsiooni seadistamine

Tabel 17 Sisu komplekti TruSight Oncology Comp Content Set karp (osa nr 20031122)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
OPR1 (punase korgiga)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Teise hübridisatsiooni seadistamine
OPD2 (valge korgiga)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Teise hübridisatsiooni seadistamine

## Esimene sihtmärkide kinnistamine

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Eelsoojendage MIDI soojendusploki inserdiga mikroproovide inkubaator temperatuurini 57 °C.
- 2 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
  - ▶ EEW – keerutage segamiseks 1 minut.
  - ▶ EE2 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ HP3 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ SMB – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril.
    - ▶ Kasutage selleks protseduuriks kindlasti **SMB-d**, mitte SPB-d.
  - ▶ ET2 – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
- 3 Valmistage mikrotsentrifuugi katsutisse värske elueerimisseguga EE2 + HP3.

Tabel 18 Elueerimisseguga EE2 + HP3 esimeseks sihtmärkide kinnistamiseks

Elueerimisseguga komponent	3 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vaadake analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehe (dokument nr 200007789) jaotisest „Reaktiivide käsitlemine“.

- 4 Keerutage elueerimisseguga EE2 + HP3 ja seejärel tsentrifuugige lühidalt. Pange kõrvale *Elueerimine* etapiks.
- 5 Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga CAP1 (Capture 1 (Kinnistamine 1)).
- 6 Pange valmis magnet.

## Protseduur

### Sidumine

- 1 Eemaldage HYB1 PCR-plaat termotsüklerist.
- 2 Tsentrifugeerige HYB1 PCR-plaati 280 × g juures 1 minut.
- 3 Keerutage SMB-d 1 minut kerakeste resuspendeerimiseks.
- 4 Lisage 150 µl SMB-d kohe igasse CAP1 MIDI-plaadi teegisüvendisse.  
Kui kasutate SMB väljutamiseks mahutit, arvestage proovi kohta piisava materjali alikvootimisel ülejäägiteguriga 1,15. Kui SMB on kõigisse proovisüvenditesse lisatud, kõrvaldage ülejäänud materjal.
- 5 Seadke pipett tasemele 50 µl ja kandke kõigi teekide kogumaht HYB1 PCR-plaadilt CAP1 MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
- 6 Kõrvaldage tühi HYB1 PCR-plaat.
- 7 Pange CAP1 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
- 8 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 9 Inkubeerige eelsoojendatud mikroproovide inkubaatoris 25 minutit temperatuuril 57 °C.
- 10 Asetage 2 minutiks magnetalusel.
- 11 Hoidke CAP1 MIDI-plaati magnetalusel ja eemaldage tasemele 200 µl seatud pipeti P20 abil kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ning kõrvaldage see.



#### ETTEVAATUST!

Jätkake kohe järgmise etapiga (*Pesemine*). Ärge laske kerakestegraanulil seista pikka aega ilma vedelikuta.

### Pesemine

- 1 Peske kerakesi järgmiselt.
  - a Eemaldage CAP1 MIDI-plaat magnetaluselt.
  - b Lisage igasse süvendisse 200 µl EEW-d.
  - c Seadke pipetimaht tasemele 150 µl ja pipettige segamiseks vähemalt 10 korda. Veenduge, et kõik kerakesed resuspendeeruksid.



#### ETTEVAATUST!

Veenduge, et ühtki kerakestegraanulit ei jääks alles, aspireerides ettevaatlikult kogu süvendis oleva kerakestelahuse otsakusse. Seejärel kontrollige iga süvendi põhja graanulite suhtes. Pesuetappide ajal kallutage pipetiotsakut kerakestegraanuli suhtes, et graanul vabastada. Veenduge, et kerakestegraanul oleks täielikult lahuses. Lahus peab olema tumepruun ja homogeenne.

- d Pange CAP1 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
  - e Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
  - f Raputage 4 minutit kiirusel 1800 p/min.
  - g Inkubeerige mikroproovide inkubaatoris 5 minutit temperatuuril 57 °C.
  - h Asetage 2 minutiks magnetalusel.
  - i Hoidke plaati magnetalusel ja eemaldage kõigist süvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ning kõrvaldage see.
- 2 Peske kerakesi **teist** korda.
  - 3 Peske kerakesi **kolmandat** korda.
  - 4 Eemaldage supernatandi jääk kõigist süvenditest.  
Kasutage peenotsakuga pipette P20.

### Elueerimine

- 1 Eemaldage CAP1 MIDI-plaat magnetaluselt.
- 2 Keerutage värsket elueerimisseguga EE2 + HP3 ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 3 Lisage igasse CAP1 MIDI-plaadi teegisüvendisse ettevaatlikult 17 µl elueerimisseguga EE2 + HP3.
- 4 Kõrvaldage järelejäänud elueerimisseguga EE2 + HP3.
- 5 Pange CAP1 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 6 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 7 Asetage 2 minutiks magnetaluselt.
- 8 Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga ELU1 (Elution 1 (Elueerimine 1)).
- 9 Keerutage ET2 segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 10 Lisage uue ELU1 PCR-plaadi igasse vastavasse teegisüvendisse 5 µl ET2.
- 11 Kandke 15 µl eluaati CAP1 MIDI-plaadi igast teegisüvendist ettevaatlikult ELU1 PCR-plaadi vastavasse süvendisse.
- 12 Kõrvaldage tühi CAP1 MIDI-plaat.
- 13 Pange ELU1 PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
- 14 Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
- 15 Raputage 2 minutit kiirusel 1200 p/min.
- 16 Pange EEW tagasi hoiule.

## Teise hübriidisatsiooni seadistamine

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
  - ▶ TCB1 – soojendage katsutit 5 minutit temperatuuril 37 °C. Keerutage segamiseks 10 sekundit ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ TCA1 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ OPR1 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ OPD2 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.

### Protseduur

- 1 Kontrollige TCB1 võimaliku sademe suhtes. Sademe olemasolul soojendage katsutit uuesti ja keerutage seda, kuni kristallid lahustuvad.
- 2 Lisage ELU1 PCR-plaadi igasse teegisüvendisse 15 µl TCB1.
- 3 Lisage igasse teegisüvendisse 10 µl TCA1.
- 4 Lisage sondid.  
**Ärge** kasutage korraga eri tüüpi sonde.
  - ▶ **RNA teegi süvendid** – 5 µl OPR1 igale RNA-st saadud teegile.
  - ▶ **DNA teegi süvendid** – 5 µl OPD2 igale DNA-st saadud teegile.
- 5 Pange ELU1 PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
- 6 Raputage 2 minutit kiirusel 1200 p/min.
- 7 Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm HYB2.  
Vt jaotist *Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 4*.
- 8 Hübriidiseerige temperatuuril 57 °C vähemalt 1,5 tundi ja kuni 4 tundi.
- 9 Pange TCA1, TCB1, OPR1 ja OPD2 tagasi hoiule.

## Teine sihtmärkide kinnistamine

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Eelsoojendage MIDI soojendusploki inserdiga mikroproovide inkubaator temperatuurini 57 °C.
- 2 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
  - ▶ EE2 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ HP3 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ SMB – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril.
    - ▶ Kasutage selleks protseduuriks kindlasti **SMB-d**, mitte SPB-d.
  - ▶ RSB – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
  - ▶ ET2 – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
- 3 Valmistage mikrotsentrifuugi katsutisse värske elueerimisseguga EE2 + HP3.

Tabel 19 Elueerimisseguga EE2 + HP3 teiseks sihtmärkide kinnistamiseks

Elueerimisseguga komponent	3 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vaadake analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehe (dokument nr 200007789) jaotisest „Reaktiivide käsitlemine“.

- 4 Keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt. Pange kõrvale *Elueerimine* etapiks.
- 5 Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga CAP2 (Capture 2 (Kinnistamine 2)).
- 6 Pange valmis magnet.

### Protseduur

#### Sidumine

- 1 Eemaldage ELU1 PCR-plaat termotsüklerist.
- 2 Tsentrifuugige ELU1 PCR-plaati 280 × g juures 1 minut.
- 3 Keerutage SMB-d 1 minut kerakeste resuspendeerimiseks.
- 4 Lisage 150 µl SMB-d kohe igasse CAP2 MIDI-plaadi teegisüvendisse.  
Kui kasutate SMB väljutamiseks mahutit, arvestage proovi kohta piisava materjali alikvootimisel ülejäägiteguriga 1,15. Kui SMB on kõigisse proovisüvenditesse lisatud, kõrvaldage ülejäänud materjal.
- 5 Seadke pipett tasemele 50 µl ja kandke kõigi teekide kogumaht ELU1 PCR-plaadilt CAP2 MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
- 6 Kõrvaldage tühi ELU1 PCR-plaat.
- 7 Pange CAP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
- 8 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 9 Inkubeerige mikroproovide inkubaatoris 25 minutit temperatuuril 57 °C.

**MÄRKUS.** Kui jätkate toiminguga *Rikastatud teekide amplifitseerimine leheküljel 25*), järgige reaktiivide sulatamisjuhiseid jaotisest „Ettevalmistamine protokollis etappideks“.

- 10 Asetage 2 minutiks magnetilusele.
- 11 Hoidke CAP2 MIDI-plaati magnetilusel ja eemaldage tasemele 200 µl seatud pipeti P200 abil kõigist teegisüvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ning kõrvaldage see.



**ETTEVAATUST!**

Jätkake kohe järgmise etapiga (*Pesemine*). Ärge laske kerakestegraanulil seista pikka aega ilma vedelikuta.

**Pesemine**

- 1 Eemaldage CAP2 MIDI-plaat magnetaluselt.
- 2 Pöörake või keerutage RSB-d segamiseks.
- 3 Lisage igasse süvendisse 200 µl RSB-d.
- 4 Pange CAP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 5 Raputage 4 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 6 Asetage 2 minutiks magnetalusale.
- 7 Hoidke CAP2 MIDI-plaati magnetalusel ning eemaldage ja kõrvaldage kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit.
- 8 Eemaldage supernatandi jääk kõigist süvenditest.  
Kasutage peenotsakuga pipette P20.

**Elueerimine**

- 1 Eemaldage CAP2 MIDI-plaat magnetaluselt.
- 2 Keerutage värsket elueerimisseguga EE2 + HP3 ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 3 Lisage igasse CAP2 MIDI-plaadi teegisüvendisse 22 µl elueerimisseguga EE2 + HP3.
- 4 Kõrvaldage järelejäänud elueerimisseguga EE2 + HP3.
- 5 Pange CAP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 6 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 7 Asetage 2 minutiks magnetalusale.
- 8 Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga ELU2 (Elution 2 (Elueerimine 2)).
- 9 Keerutage ET2 segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 10 Lisage uue ELU2 PCR-plaadi igasse vastavasse teegisüvendisse 5 µl ET2.
- 11 Kandke 20 µl eluaati CAP2 MIDI-plaadi igast teegisüvendist ettevaatlikult ELU2 PCR-plaadi vastavasse süvendisse.
- 12 Kõrvaldage tühi CAP2 MIDI-plaat.
- 13 Pange ELU2 PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
- 14 Raputage 2 minutit kiirusel 1200 p/min.
- 15 Pange SMB, EE2, HP3 ja ET2 tagasi hoiule.

**OHUTU PEATUMISKOHT**

Peatumisel tsentrifuugige ELU2 PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril –25 °C kuni –15 °C kuni 7 päeva. Pange RSB tagasi hoiule.

Lõppkuupäev ja -kellaaeg \_\_\_\_\_

**Ettevalmistamine protokollide etappideks**

- 1 Valmistage ette jäänoõ.
- 2 Võtke reaktiivikatsuti karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.



Tabel 20 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) karp (osa nr 20031121)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
PPC3	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Rikastatud teekide amplifitseerimine
EPM	-25 °C kuni -15 °C	Hoidke jääl.	Rikastatud teekide amplifitseerimine

Tabel 21 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) karp (osa nr 20031123)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
SPB (helerohelise etiketiga)	2 °C kuni 8 °C	Hoidke 30 minutit toatemperatuuril.	Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine
RSB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine Ettevalmistamine sekveneerimiseks

## Rikastatud teekide amplifitseerimine

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Hoiustatud ELU2 plaat sulatage toatemperatuurile ja seejärel tsentrifuugige 280 x g juures 1 minut.

### Protseduur

- 1 Keerutage PPC3 segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 2 Lisage ELU2 PCR-plaadi igasse teegisüvendisse 5 µl PPC3.
- 3 Keerutage EPM-i segamiseks 5 sekundit ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 4 Lisage igasse teegisüvendisse 20 µl EPM-i.
- 5 Pange ELU2 PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
- 6 Raputage 2 minutit kiirusel 1200 p/min.
- 7 Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm EL-PCR.  
Vt jaotist *Termotsüklerite programmeerimine* leheküljel 4.

**MÄRKUS.** Kui jätkate toiminguga *Teekide normaliseerimine* leheküljel 27), järgige sulatamisjuhiseid jaotises „Ettevalmistamine protokollide etappideks“.

- 8 Pange PPC3 ja EPM tagasi hoiule.

## Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
- ▶ SPB – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril.
    - ▶ Kasutage selleks protseduuriks kindlasti **SPB-d**, mitte **SMB-d**.
    - ▶ RSB – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
- 2 Valmistage 15 ml või 50 ml koonilisse katsutisse värske 80% etanool.

Reaktiiv	3 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
100% etanoolalkohol, puhas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNAasi-/DNAasivaba vesi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Keerutage värsket 80% EtOH-d segamiseks.
- 4 Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga BIND2 (Clean Up Binding (Sideme puhastamine)).
- 5 Pange valmis magnet.

## Protseduur

### Sidumine

- 1 Eemaldage ELU2 PCR-plaat termotsüklerist.
- 2 Tsentrifuge ELU2 PCR-plaati 280 × g juures 1 minut.
- 3 Keerutage SPB-d 1 minut kerakeste resuspendeerimiseks.
- 4 Lisage 110 µl SPB-d kohe igasse BIND2 MIDI-plaadi teegisüvendisse.
- 5 Kandke 50 µl igat teeki ELU2 PCR-plaadilt BIND2 MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
- 6 Kõrvaldage tühi ELU2 PCR-plaat.
- 7 Pange BIND2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 8 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 9 Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
- 10 Asetage plaat 5 minutiks magnetlusele.
- 11 Eemaldage ja kõrvaldage tasemele 200 µl seatud pipeti P200 abil kõigist teegisüvenditest **kogu** supernatant, häirimata kerakestegraanulit.

### Pesemine

- 1 Peske kerakesi järgmiselt.
  - a Hoidke magnetlusele ja lisage igasse süvendisse 200 µl värsket 80% EtOH-d.
  - b Oodake 30 sekundit.
  - c Eemaldage ja kõrvaldage kõigist proovisüvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit.
- 2 Peske kerakesi **teist** korda.
- 3 Eemaldage EtOH jääk kõigist süvenditest.  
Kasutage peenotsakuga pipette P20.
- 4 Kõrvaldage kasutamata 80% EtOH.

### Elueerimine

- 1 Eemaldage BIND2 MIDI-plaat magnetlusele.
- 2 Pöörake või keerutage RSB-d segamiseks.
- 3 Lisage igasse teegisüvendisse 32 µl RSB-d.
- 4 Pange BIND2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 5 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 6 Inkubeerige 2 minutit toatemperatuuril.
- 7 Asetage 2 minutiks magnetlusele.
- 8 Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga PL (Purified Libraries (Puhastatud teegid)).
- 9 Kandke 30 µl igat eluaati BIND2 MIDI-plaadilt PL-i PCR-plaadi vastavasse süvendisse.
- 10 Kõrvaldage tühi BIND2 MIDI-plaat.
- 11 Pange PL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
- 12 Pange SPB tagasi hoiule.

**OHUTU PEATUMISKOHT**

Peatumisel tsentrifuugige PL-i PCR-plaati 280 x g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril –25 °C kuni –15 °C kuni 30 päeva. Pange RSB tagasi hoiule.

Lõppkuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

**Ettevalmistamine protokolliga etappideks**

- 1 Võtke reaktiivikatsuti karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 22 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) karp (osa nr 20031121)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
LNA1	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Teekide normaliseerimine
EE2	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Teekide normaliseerimine

Tabel 23 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) karp (osa nr 20031123)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
LNB1	2 °C kuni 8 °C	Hoidke 30 minutit toatemperatuuril.	Teekide normaliseerimine
HP3	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Teekide normaliseerimine Ettevalmistamine sekveneerimiseks
LNW1	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Teekide normaliseerimine
LNS1	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Teekide normaliseerimine

- 2 Kui jätkate samal päeval toiminguga *Ettevalmistamine sekveneerimiseks leheküljel 30*), järgige sulatamisjuhiseid jaotises „Ettevalmistamine protokolliga etappideks“.

**Teekide normaliseerimine****Ettevalmistamine**

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Valmistage ette järgmised reaktiivid.
- ▶ LNB1 – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril.
  - ▶ LNA1 – keerutage segamiseks.
  - ▶ EE2 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ HP3 – keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
  - ▶ LNW1 – keerutage segamiseks. Pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
  - ▶ LNS1 – keerutage segamiseks. Pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
- 2 Keerutage LNB1 kerakeste resuspendeerimiseks 1 minut.  
Pöörake LNB1 katsutit, et tagada kõigi kerakeste resuspendeerumine.
- 3 Kasutades P1000 komplekti mahuga 800 µl, pipettige LNB1 10 korda üles ja alla, et tagada resuspendeerumine.
- 4 Valmistage koonilisse katsutisse kohe värske põhisegu LNA1 + LNB1.

**ETTEVAATUST!**

Resuspendeerige täielikult katsuti põhjas olev LNB1 kerakestegraanul, et vältida klasteri ebaühtlast tihedust.

Tabel 24 Põhisegu LNA1 + LNB1

Põhisegu komponent	3 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
LNA1	229 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vaadake *analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehe (dokument nr 200007789)* jaotisest „Reaktiivide käsitlemine“.

- 5 Keerutage põhisegu LNA1 + LNB1. Pange kõrvale *Sidumine* etapiks.
- 6 Valmistage mikrotsentrifuugi katsutisse värske elueerimisseguga EE2 + HP3.

Tabel 25 Elueerimisseguga EE2 + HP3 teekide normaliseerimiseks

Elueerimisseguga komponent	3 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vaadake *analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehe (dokument nr 200007789)* jaotisest „Reaktiivide käsitlemine“.

- 7 Keerutage värsket elueerimisseguga ja seejärel tsentrifuugige lühidalt. Pange kõrvale *Elueerimine* etapiks.
- 8 Hoiustatud PL-i PCR-plaat sulatage toatemperatuuril, tsentrifuugige 280 × g juures 1 minut ja seejärel pipettige segamiseks.
- 9 Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga BBN (Bead Based Normalization (Kerakestepõhine normaliseerimine)).
- 10 Pange valmis magnet.

## Protseduur

### Sidumine

- 1 Keerutage põhisegu LNA1 + LNB1.
- 2 Lisage 45 µl põhisegu LNA1 + LNB1 kohe igasse BBN-i MIDI-plaadi teegisüvendisse.
- 3 Kõrvaldage ülejäänud põhisegu LNA1 + LNB1.
- 4 Lisage 20 µl igat teeki PL-i PCR-plaadilt BBN-i MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
- 5 Pange BBN-i MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend. Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 6 Raputage 30 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 7 Pange PL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend ja pange plaat tagasi hoiule.
- 8 Asetage plaat 2 minutiks magnetilusele.
- 9 Hoidke plaati magnetilusel ja eemaldage pipeti P200 abil kõigist süvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ning kõrvaldage see.

### Pesemine

- 1 Peske kerakesi järgmiselt.
  - a Eemaldage BBN-i MIDI-plaat magnetiluselt.
  - b Lisage igasse teegisüvendisse 45 µl LNW1.
  - c Pange BBN-i MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
  - d Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
  - e Raputage 5 minutit kiirusel 1800 p/min.
  - f Asetage 2 minutiks magnetilusele.
  - g Eemaldage kõigist süvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ning kõrvaldage see.
- 2 Peske kerakesi **teist** korda.
- 3 Eemaldage supernatandi jääk kõigist süvenditest. Kasutage peenotsakuga pipette P20.

### Elueerimine

- 1 Eemaldage BBN-i MIDI-plaat magnetiluselt.
- 2 Keerutage värsket elueerimisseguga EE2 + HP3 ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.

- 3 Lisage igasse BBN-i MIDI-plaadi teegisüvendisse 32 µl EE2 + HP3 lahust.
- 4 Kõrvaldage järelejäänud elueerimisseguga.
- 5 Pange BBN-i MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 6 Raputage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
- 7 Asetage 2 minutiks magnetilusele.
- 8 Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga NL (Normalized Libraries (Normaliseeritud teegid)).
- 9 Kandke 30 µl eluaati BBN-i MIDI-plaadi igast teegisüvendist ettevaatlikult NL-i PCR-plaadi vastavasse süvendisse.

**ETTEVAATUST!**

Kui kerakesed on aspireeritud pipetiotsakutesse, väljutage kerakesed tagasi magnetilusel olevale plaadile ja oodake, kuni vedelik on selge (~2 minutit), enne kui jätkate protseduuri järgmise etapiga.

- 10 Kõrvaldage tühi BBN-i MIDI-plaat.
- 11 Keerutage LNS1 segamiseks.
- 12 Lisage uue NL-i PCR-plaadi igasse teegisüvendisse 30 µl LNS1.
- 13 Pipettige segamiseks 5 korda.
- 14 Pange NL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 15 Pange LNB1, LNA1, EE2, LNW1 ja LNS1 tagasi hoiule.

**OHUTU PEATUMISKOHT**

Peatumisel tsentrifuugige NL-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril –25 °C kuni –15 °C kuni 30 päeva.

Lõppkuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

**Ettevalmistamine protokollide etappideks**

Alustage sekveneerimise kulutarvikute ettevalmistamist reaktiivikomplektist NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (osa nr 20028871) vähemalt tund aega enne kasutamist.

- 1 Võtke teegilahenduspuhver (HT1) hoiult (–25 °C kuni –15 °C), sulatage toatemperatuurile ja asetage jääle.
- 2 Komplekti ülejäänud kulutarvikute puhul järgige ettevalmistusjuhiseid dokumendist *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend) (dokument nr 1000000009513)*.
  - ▶ Reaktiivikassett NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
  - ▶ Puhvrikassett NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
  - ▶ Läbivooluküvett NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
- 3 Võtke reaktiivikatsuti karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 26 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) karp (osa nr 20031121)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
Sisemine kontrollmaterjal PhiX Internal Control (PhiX)	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage toatemperatuurile. Hoidke jääl.	Ettevalmistamine sekveneerimiseks

Tabel 27 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) karp (osa nr 20031123)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
HP3	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Ettevalmistamine sekveneerimiseks
RSB (roosa etiketiga)	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile.	Ettevalmistamine sekveneerimiseks

## Ettevalmistamine sekveneerimiseks

### Ettevalmistamine

Alguskuupäev ja -kellaeg \_\_\_\_\_

- 1 Vaadake üle *analüüsi TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) pakendi infolehes (dokument nr 200007789)* toodud juhised teekide arvu ja indekse valimise kohta.
- 2 Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga dHP3 (diluted HP3 (lahjendatud HP3)).
- 3 Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga dPhiX (diluted PhiX (lahjendatud PhiX)).
- 4 Soojendage soojendusplakk mikrotsentrifuugi katsutite jaoks temperatuurile 96 °C.
- 5 Valmistage ette jäänõu.

### Kontrollmaterjali PhiX Control lahjendamine ja denatureerimine

- 1 Keerutage HP3 segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 2 Ühendage dHP3 mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud.
  - ▶ 10 µl HP3
  - ▶ 190 µl RNAasi-/DNAasivaba vett
- 3 Keerutage dHP3 segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 4 Pöörake või keerutage RSB-d segamiseks.
- 5 Keerutage kontrollmaterjali PhiX segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 6 Ühendage dPhiX-i mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud.
  - ▶ 8 µl RSB-d
  - ▶ 2 µl kontrollmaterjali PhiX
- 7 Lisage dPhiX-i katsutisse 10 µl dHP3.
- 8 Kõrvaldage dHP3 katsuti.
- 9 Keerutage dPhiX-i katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 10 Inkubeerige dPhiX-i denatureerimiseks 5 minutit toatemperatuuril.
- 11 Keerutage HT1 segamiseks.
- 12 Lisage dPhiX-i kohe 980 µl eeljahutatud HT1.
- 13 Keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 14 Asetage PhiX jääle kuni selle kasutamiseni teise lahjenduse valmistamisel. Lõplik kontsentratsioon on 20 pM dPhiX-i.
- 15 Pange PhiX, HP3 ja RSB tagasi hoiule.

### Teekide kogumisse lisamine ja denatureerimine

- 1 Hoiustatud NL-i PCR-plaat sulatage toatemperatuurile ja seejärel tsentrifuugige 280 × g juures 1 minut.
- 2 Kasutades tasemele 30 µl seatud mitmekanalilist pipetti, pipettige teeke NL-i PCR-plaadil segamiseks 5 korda. Kasutage iga teegi puhul uusi otsakuid.



#### ETTEVAATUST!

Optimaalse toimivuse tagamiseks peavad teegid olema põhjalikult segatud.

- 3 Valige teekide kogumisse lisamiseks, denatureerimiseks ja lahjendamiseks üks järgmistest võimalustest.
  - ▶ **1. võimalus:** RNA-proovidest ja DNA-proovidest saadud teekide samaaegne sekveneerimine. Vt jaotist **1. võimalus: DNA ja RNA teegid koos leheküljel 31.**
  - ▶ **2. võimalus:** ainult DNA-proovidest saadud teekide sekveneerimine. Vt jaotist **2. võimalus: ainult DNA teegid leheküljel 31.**
  - ▶ **3. võimalus:** ainult RNA-proovidest saadud teekide sekveneerimine. Vt jaotist **3. võimalus: ainult RNA teegid leheküljel 32.**

**1. võimalus: DNA ja RNA teegid koos**

- 1 Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga PRL (Pooled RNA Libraries (Kogumisse lisatud RNA teegid)).
- 2 Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga PDL (Pooled DNA Libraries (Kogumisse lisatud DNA teegid)).
- 3 Kandke 10 µl igat normaliseeritud RNA (cDNA) teeki NL-i plaadilt PRL-i katsutisse.  
Ärge lisage kaht teeki kogumisse sama indekspraimeriga.
- 4 Kandke 10 µl igat normaliseeritud DNA teeki NL-i plaadilt PDL-i katsutisse.  
Ärge lisage kaht teeki kogumisse sama indekspraimeriga.
- 5 Pange NL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 6 Keerutage igat PRL-i ja PDL-i katsutit segamiseks.
- 7 Tsentrifugeerige PRL-i ja PDL-i katsuteid lühidalt.
- 8 Inkubeerige PRL-i ja PDL-i katsuteid soojendusplokkis 2 minutit temperatuuril 96 °C.
- 9 Asetage PRL ja PDL 5 minutiks jääle.
- 10 Keerutage PRL-i ja PDL-i katsuteid segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
- 11 Pange PRL-i ja PDL-i katsutid tagasi jääle.

## Esimese lahjenduse valmistamine

- 1 Märgistage 1,7 ml mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL1 (Dilution 1 (Lahjendus 1)).
- 2 Kandke 20 µl PDL-i tühja DIL1 katsutisse.
- 3 Lisage DIL1-le 5 µl PRL-i.
- 4 Kõrvaldage PDL-i ja PRL-i katsutid.
- 5 Lisage DIL1 katsutisse 475 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 20).
- 6 Keerutage DIL1 katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.

## Teise lahjenduse valmistamine

- 1 Märgistage 2,0 ml mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL2 (Dilution 2 (Lahjendus 2)).
- 2 Kandke 40 µl DIL1 tühja DIL2 katsutisse.
- 3 Kõrvaldage DIL1 katsuti.
- 4 Lisage DIL2 katsutisse 1660 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 850).
- 5 Keerutage valmistatud 20 pM dPhiX-i segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
- 6 Lisage DIL2 katsutisse 2,5 µl valmistatud 20 pM dPhiX-i.
- 7 Keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
- 8 Sisestage 1300 µl DIL2 reaktiivikassetti NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).  
Lisateavet vt dokumendist *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend)* (dokument nr 100000009513).
- 9 Kõrvaldage DIL2 katsuti.
- 10 Tsentrifugeerige NL-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril –25 °C kuni –15 °C kuni 30 päeva.
- 11 Jätkake sekveneerimisega.  
Lisateavet vt dokumendist *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend)* (dokument nr 100000009513).

**2. võimalus: ainult DNA teegid**

- 1 Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga PDL (Pooled DNA Libraries (Kogumisse lisatud DNA teegid)).
- 2 Kandke 10 µl igat normaliseeritud DNA teeki NL-i plaadilt PDL-i katsutisse.  
Ärge lisage kaht teeki kogumisse sama indekspraimeriga.
- 3 Pange NL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 4 Keerutage PDL-i katsutit segamiseks.

- 5 Tsentrifuugige PDL-i katsutit lühidalt.
- 6 Inkubeerige PDL-i katsutit soojendusplokis 2 minutit temperatuuril 96 °C.
- 7 Asetage PDL 5 minutiks jääle.
- 8 Keerutage PDL-i katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 9 Pange PDL-i katsuti tagasi jääle.

#### Esimese lahjenduse valmistamine

- 1 Märgistage 1,7 ml mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL1 (Dilution 1 (Lahjendus 1)).
- 2 Kandke 10 µl PDL-i tühja DIL1 katsutisse.
- 3 Kõrvaldage PDL-i katsuti.
- 4 Lisage DIL1 katsutisse 190 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 20).
- 5 Keerutage DIL1 katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.

#### Teise lahjenduse valmistamine

- 1 Märgistage 2,0 ml mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL2 (Dilution 2 (Lahjendus 2)).
- 2 Kandke 40 µl DIL1 tühja DIL2 katsutisse.
- 3 Kõrvaldage DIL1 katsuti.
- 4 Lisage DIL2 katsutisse 1660 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 850).
- 5 Keerutage valmistatud 20 pM dPhiX-i ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 6 Lisage DIL2 katsutisse 2,5 µl valmistatud 20 pM dPhiX-i.
- 7 Keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 8 Sisestage 1300 µl DIL2 reaktiivikassetti NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).  
Lisateavet vt dokumendist *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend) (dokument nr 1000000009513)*.
- 9 Kõrvaldage DIL2 katsuti.
- 10 Tsentrifuugige NL-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril –25 °C kuni –15 °C kuni 30 päeva.
- 11 Jätkake sekveneerimisega.  
Lisateavet vt dokumendist *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend) (dokument nr 1000000009513)*.

### 3. võimalus: ainult RNA teegid

- 1 Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga PRL (Pooled RNA Libraries (Kogumisse lisatud RNA teegid)).
- 2 Kandke 10 µl igat normaliseeritud RNA (cDNA) teeki NL-i plaadilt PRL-i katsutisse.  
Ärge lisage kaht teeki kogumisse sama indekspraimeriga.
- 3 Pange NL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.  
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- 4 Keerutage PRL-i katsutit segamiseks.
- 5 Tsentrifuugige PRL-i katsutit lühidalt.
- 6 Inkubeerige PRL-i katsutit soojendusplokis 2 minutit temperatuuril 96 °C.
- 7 Asetage PRL 5 minutiks jääle.
- 8 Keerutage PRL-i katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
- 9 Pange PRL-i katsuti tagasi jääle.

#### Esimese lahjenduse valmistamine

- 1 Märgistage 1,7 ml mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL1 (Dilution 1 (Lahjendus 1)).
- 2 Kandke 10 µl PRL-i tühja DIL1 katsutisse.
- 3 Kõrvaldage PRL-i katsuti.
- 4 Lisage DIL1 katsutisse 190 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 20).
- 5 Keerutage DIL1 katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.



## Teise lahjenduse valmistamine

- 1 Märgistage 2,0 ml mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL2 (Dilution 2 (Lahjendus 2)).
- 2 Kandke 40 µl DIL1 tühja DIL2 katsutisse.
- 3 Kõrvaldage DIL1 katsuti.
- 4 Lisage DIL2 katsutisse 1646 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 843).
- 5 Keerutage valmistatud 20 pM dPhiX-i ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
- 6 Lisage DIL2 katsutisse 16,7 µl valmistatud 20 pM dPhiX-i.
- 7 Keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
- 8 Sisestage 1300 µl DIL2 reaktiivikassetti NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).  
Lisateavet vt dokumendist *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend)* (dokument nr 1000000009513).
- 9 Kõrvaldage DIL2 katsuti.
- 10 Tsentrifugeerige NL-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril –25 °C kuni –15 °C kuni 30 päeva.
- 11 Jätkake sekveneerimisega.  
Lisateavet vt dokumendist *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend)* (dokument nr 1000000009513).

## Patendid ja kaubamärgid

See dokument ja selle sisu kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. ja selle tütarettevõtetele („Illumina“) ning on mõeldud kasutamiseks ainult ettevõtte lepingulistele klientidele seoses selles dokumendis kirjeldatud toote (toodete) kasutamisega ega ole mõeldud mitte mingiks muuks otstarbeks. Seda dokumenti ega selle sisu ei tohi mis tahes viisil kasutada ega muul eesmärgil levitada ja/või edastada, avaldada või reprodutseerida ilma Illumina eelneva kirjaliku nõusolekuta. Illumina ei anna selle dokumendiga kolmandale isikule oma patendi-, kaubamärgi-, autori-, tava- või muu sarnase õiguse alusel mitte ühtegi litsentsi.

Kvalifitseeritud ja asjakohase koolituse saanud töötajad peavad selles dokumendis kirjeldatud juhiseid järgima rangelt ja üksikasjalikult, et tagada siin kirjeldatud toote (toodete) õige ja ohutu kasutusviis. Siinse dokumendi sisu tuleb enne nimetatud toote (toodete) kasutamist täies ulatuses läbi lugeda ja endale selgeks teha.

**SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD JUHISTE MITTE LUGEMINE JA MITTE ÜKSIKASJALIKULT JÄRGIMINE VÕIB KAHJUSTADA TOODET (TOOTEID), VIGASTADA INIMESI (SH KASUTAJAJAID VÕI TEISI) JA KAHJUSTADA MUUD VARA. NIMETATUD JUHUL EI KEHTI ÜKSKI TOOTELE (TOODETELE) ANTUD GARANTII.**

**ILLUMINA EI VASTUTA SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD TOOTE (TOODETE) (SEALHULGAS TOOTE OSAD VÕI TARKVARA) VÄÄRKASUTUSE EEST.**

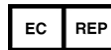
© 2022 Illumina, Inc. Kõik õigused kaitstud.

Kõik kaubamärgid kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. või nende vastavatele omanikele. Teavet konkreetsete kaubamärkide kohta vaadake veebilehelt [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktteave



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 USA  
+ 1 800 809 ILMN (4566)  
+1 85 8202 4566 (väljaspool Põhja-Ameerikat)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

## Toote märgistus

Toote pakendil ja etikettidel olevate sümbolite täieliku kirjelduse leiате, kui külastate veebisaiti [support.illumina.com](http://support.illumina.com) ja otsite oma komplekti.