

Laboratoriesporingsformular til TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

KUN TIL IN VITRO-DIAGNOSTIK
KUN TIL EKSPORT

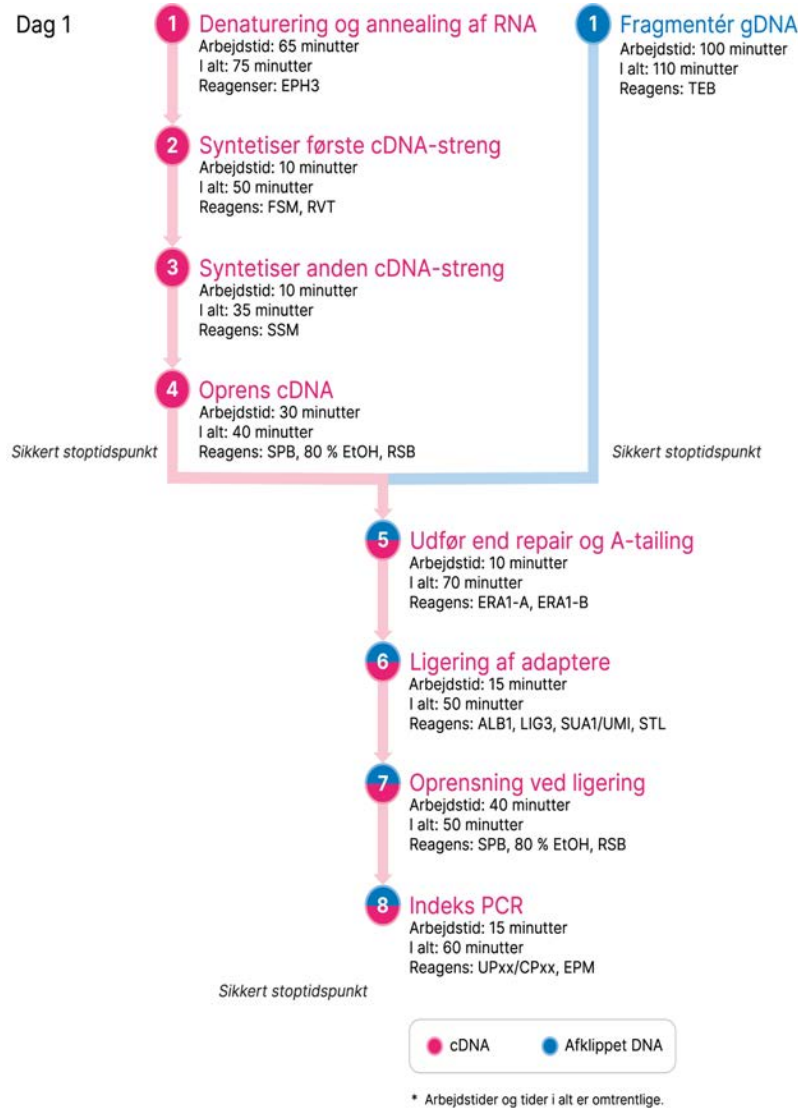
Brugervejledning

Der vises en oversigt over TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive)-arbejdsgangen i **Figur 1** og **Figur 2**.

Inden du påbegynder protokollen, skal du gennemgå de advarsler og forsigtighedsregler, der er angivet i *Indlægsseddel til TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200007789)*.

Arbejdsgang til klargøring af bibliotek

Figur 1 TSO Comprehensive-arbejdsgang (del 1)



Arbejdsgang for berigelse

Figur 2 TSO Comprehensive-arbejdsgang (del 2)



● Berigelse ● Klargøring til sekventering

Programmering af termocykler

- 1 Inden analysen startes, skal følgende programmer gemmes på termocykler præ og post amplifikation.

Tabel 1 Programmer på termocykler præ amplifikation

Proceduretrin	Programnavn	Lågets temperatur	Reaktionsvolumen	Parametre for termocykler
Denaturering og annealering af RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C i 5 minutter • 4 °C i 1 minut • 4 °C Oprethold
Syntetisering af første cDNA-streng	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25 °C i 10 minutter • 42 °C i 15 minutter • 70 °C i 15 minutter • 4 °C i 1 minut • 4 °C Oprethold
Syntetisering af anden cDNA-streng	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16 °C i 25 minutter • 4 °C i 1 minut • 4 °C Oprethold

Hvis lågets temperatur for 2ndSS ikke kan indstilles til 30 °C, skal du slå funktionen præopvarmning af låg fra.

Tabel 2 Programmer på termocykler post amplifikation

Proceduretrin	Programnavn	Lågets temperatur	Reaktionsvolumen	Parametre for termocykler
Indeksering af PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 30 sekunder • 15 cyklusser a: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 10 sekunder • 60 °C i 30 sekunder • 72 °C i 30 sekunder • 72 °C i 5 minutter • 10 °C Oprethold
Foretag første hybridisering	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 75 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 65 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 57 °C Oprethold i 8 til 24 timer
Foretag anden hybridisering	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C i 10 minutter • 85 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 75 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 65 °C i 2 minutter og 30 sekunder • 57 °C Oprethold i 1,5 til 4 timer
Amplificering af beriget bibliotek	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 30 s • 18 cyklusser a: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C i 10 s • 60 °C i 30 s • 72 °C i 30 s • 72 °C i 5 min • 10 °C Oprethold

Indtastning af kørselsoplysninger

NextSeq 550Dx instrument Local Run Manager er den software, der bruges til at konfigurere en TSO Comprehensive-kørsel. Se *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Vejledning til arbejdsgang (dokumentnr. 200008661)* for at få mere at vide.

Angiv konfigurationsoplysninger for kørsel og prøve direkte i TruSight Oncology Comprehensive-analysemodulet.

Konfiguration af kørselsparametre

- 1 Log ind på Local Run Manager på instrumentet eller fra en netværkscomputer.
- 2 Vælg **Create Run** (Opret kørsel), og vælg derefter **TSO Comp (EU)**.
- 3 Indtast et kørselsnavn, der identificerer kørslen fra sekventeringen til og med analysen, under hensyntagen til følgende kriterier.
 - ▶ 1-40 tegn.
 - ▶ Kun alfanumeriske tegn, understregningstegn og bindestreger.
 - ▶ Understregningstegn og bindestreger skal forudgås og efterfølges af et alfanumerisk tegn.
 - ▶ Unikt på tværs af alle kørsler på instrumentet.
- 4 **[Valgfrit]** Indtast en kørselsbeskrivelse, der gør det lettere at identificere kørslen, under hensyntagen til følgende kriterier.
 - ▶ 1-150 tegn.
 - ▶ Kun alfanumeriske tegn og mellemrum.
 - ▶ Mellemrum skal forudgås og efterfølges af et alfanumerisk tegn.

Angivelse af prøver til kørslen

Du angiver prøver til kørslen ved at anvende en af følgende muligheder.

- ▶ **Indtast prøverne manuelt** – Brug den tomme tabel på skærmen Create Run (Opret kørsel).
- ▶ **Importér prøver** – Gå til en ekstern fil i et kommasepareret værdiformat (*.csv). Du kan downloade en skabelon på skærmen Create Run (Opret kørsel).



FORSIGTIG

Uoverensstemmelser mellem prøverne og indeksprimerne kan resultere i ukorrekt resultatrapportering på grund af manglende positiv prøveidentifikation. Indtast prøve-ID'er, og tildel indekser i Local Run Manager, inden du begynder biblioteksklargøringen. Registrer prøve-ID'er, indekser og pladebrøndsorientering til senere brug i forbindelse med biblioteksklargøringen.



FORSIGTIG

For at undgå datatab skal du sørge for, at en videnbase ikke er ved at blive installeret, inden en kørsel gemmes.

Manuel indtastning af prøver

- 1 Indtast et unikt prøve-ID i feltet Sample ID (Prøve-ID) under hensyntagen til følgende kriterier. **Alle kontrolprøver skal tilsættes først.** Se *Kontrolprøver på side 6* for at få mere at vide.
 - ▶ 1-25 tegn.
 - ▶ Kun alfanumeriske tegn, understregningstegn og bindestreger.
 - ▶ Understregningstegn og bindestreger skal forudgås og efterfølges af et alfanumerisk tegn.
- 2 **[Valgfrit]** Indtast en prøvebeskrivelse i feltet Sample Description (Prøvebeskrivelse) under hensyntagen til følgende kriterier.
 - ▶ 1-50 tegn.
 - ▶ Kun alfanumeriske tegn, bindestreger, understregningstegn og mellemrum.

- ▶ Mellemrum, understregningstegn og bindestreger skal forudgås og efterfølges af et alfanumerisk tegn.
- 3 Vælg et indeks til det DNA-bibliotek og/eller RNA-bibliotek, du har klargjort fra prøven.
Sørg for, at RNA- og DNA-prøverne er i separate kolonner.
Feltet DNA i7+i5 Sequence (DNA i7+i5-sekvens) bliver automatisk udfyldt efter valg af et DNA-indeks-ID. Feltet RNA i7+i5 Sequence (RNA i7+i5-sekvens) bliver automatisk udfyldt efter valg af et RNA-indeks-ID.
Ud over resuméet her kan du finde yderligere oplysninger om valg af indeks-ID i Indlægsseddel til *TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789).
 - ▶ DNA-prøvebibliotek: Vælg et unikt indeks-ID (UPxx- eller CPxx-indeks) på rullelisten DNA Index ID (DNA-indeks-ID).
 - ▶ RNA-prøvebibliotek: Vælg et unikt indeks-ID (kun UPxx-indeks) på rullelisten RNA Index ID (RNA-indeks-ID).
 - ▶ Hvis der er tre biblioteker i alt i kørslen, skal du følge retningslinjerne for indeksvalg i *Indlægsseddel til TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789).
- 4 I feltet Tumor Type (Tumortype) tildeler du en tumortype til hver prøve, idet du vælger den mest specifikke af de tilgængelige tumortyper. Se [Valg af tumortype på side 7](#).
- 5 I feltet Tumor Type (Tumortype) tildeler du en af følgende kontroltyper til hver kontrol. Se [Kontrolprøver på side 6](#).
 - DNA External Control (DNA, ekstern kontrol)
 - RNA External Control (RNA, ekstern kontrol)
 - DNA No-Template Control (DNA, ingen skabelonkontrol)
 - RNA No-Template Control (RNA, ingen skabelonkontrol)
 Hvis materialepræfikset DNA-kontrol anvendes, er kontroltypen DNA, ekstern kontrol. Hvis materialepræfikset RNA-kontrol anvendes, er kontroltypen RNA, ekstern kontrol.
- 6 Tildel køn.
- 7 **[Valgfrit]** Vælg **Export to CSV** (Eksportér til CSV) for at eksportere prøveoplysningerne til en ekstern fil.
- 8 Gennemse oplysningerne på skærmen Create Run (Opret kørsel).
Forkerte oplysninger kan påvirke resultaterne.
- 9 Vælg **Save Run** (Gem kørsel).

Import af prøver

- 1 Vælg **Import CSV** (Importér CSV), og gå til den placering, hvor prøveoplysningsfilen ligger. Der er to typer filer, du kan importere.
 - Vælg **Download CSV** på skærmen Create Run (Opret kørsel) for at downloade en ny prøveoplysningssskabelon. CSV-filen indeholder de påkrævede kolonneoverskrifter og det påkrævede format til import. Indtast prøveoplysninger i hver kolonne om prøverne i kørslen. I kolonnen Tumor Type (Tumortype) skal du indtaste termen for tumortypen eller den tilhørende kode (se [Download tumortyper på side 1](#)). Feltet Tumor Type (Tumortype) anvendes også til at angive prøver som kontroller (se [Kontrolprøver på side 6](#)).
 - Brug en fil med prøveoplysninger, der blev eksporteret fra TSO Comprehensive analysis module ved hjælp af funktionen Export to CSV (Eksportér til CSV).
- 2 Gennemse de importerede oplysninger på skærmen Create Run (Opret kørsel).
Forkerte oplysninger kan påvirke resultaterne.
- 3 **[Valgfrit]** Vælg **Export to CSV** (Eksportér til CSV) for at eksportere prøveoplysningerne til en ekstern fil.
- 4 Vælg **Save Run** (Gem kørsel).

Kontrolprøver

TSO Comprehensive kræver brug af panelkontrol. Ved angivelse af en prøve som kontrol bliver prøvens køn automatisk sat til Unknown (Ukendt). Du angiver en prøve som kontrol ved at vælge en af de fire kontroltyper i feltet Tumor Type (Tumortype): DNA External Control (positive DNA control) (DNA, ekstern kontrol (positiv DNA-kontrol)), DNA No-Template Control (DNA, ingen skabelonkontrol), RNA External Control (positive RNA

control) (RNA, ekstern kontrol (positiv RNA-kontrol)) eller RNA No-Template Control (RNA, ingen skabelonkontrol). Du kan finde yderligere oplysninger om konfiguration af tumortyper for alle prøvetyper i forbindelse med kørselskonfigurationen under *Valg af tumortype på side 7*.

Der kan kun angives én af hver kontroltype inden for en kørsel. Der kan kun angives et DNA-bibliotek for en DNA External Control (DNA, ekstern kontrol) eller en DNA No-Template Control (DNA, ingen skabelonkontrol). Der kan kun angives et RNA-bibliotek for en RNA External Control (RNA, ekstern kontrol) eller en RNA No-Template Control (RNA, ingen skabelonkontrol). Biblioteker, der er angivet som DNA No-Template Control (DNA, ingen skabelonkontrol) eller RNA No-Template Control (RNA, ingen skabelonkontrol), bliver ikke modregnet i det maksimale antal biblioteker i en kørsel.

Valg af tumortype

Der skal angives en tumortype for hver prøve. Med undtagelse af kontroltyperne er de tilgængelige tumortyper fra den installerede videnbase (KB), og disse kan ændres ved opdaterede versioner af videnbasen.

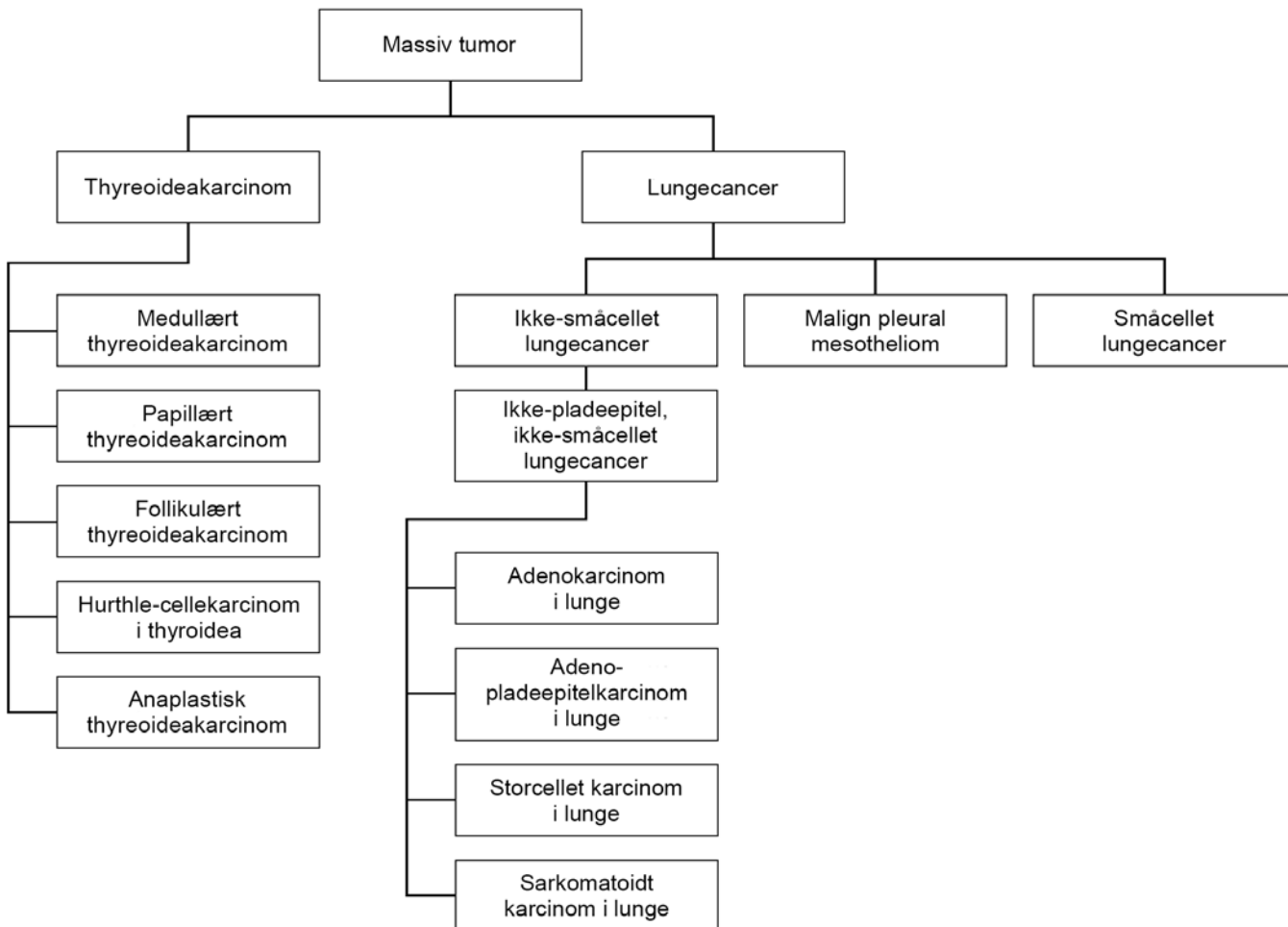


FORSIGTIG

Ukorrekt valg af tumortype kan medføre ukorrekte resultater. Afhjælp alle advarsler, der bliver vist i forbindelse med angivelse af tumortyper, for at undgå analysefejl.

Tumortype-terminerne er en del af en hierarkisk sygdomsontologi i videnbasen, som er opbygget som et sæt overordnede/underordnede relationer. Eksempel: Termen ikke-småcellet lungecancer er en underordnet lungecancer, eftersom ikke-småcellet lungecancer er en type lungecancer. **Figur 3** illustrerer et eksempel på et undersæt af en sygdomsontologi, der viser solid tumor som rod-terminen og de termer, der er forbundet med lungecancer og thyreoideacancer (andre tumortyper er ikke vist). En term, der er forbundet via overordnede/underordnede relationer til en term på et lavere niveau, kaldes en ascendent. De forbundne termer på lavere niveauer er descendenter til ascendent-terminen. Eksempel: Lungecancer er ascendent til adenokarcinom i lungen og småcellet lungecancer, og medullært thyreoideakarcinom er descendent til både thyreoideakarcinom og solid tumor.

Figur 3 Eksempel på et undersæt af en sygdomsontologi



Den valgte tumortype for en patientprøve har indvirkning på:

- ▶ Hvilke påtænkte anvendelser af ledsagende diagnostiske test, der bliver evalueret for prøven. Kun patientprøver, der har den eksakt samme tumortype som tumortypen for den påtænkte anvendelse af ledsagende diagnostiske test, eller er en descendent dertil, bliver evalueret for dette krav.
- ▶ Hvilke tumorprofileringsvariationer, der er inkluderet i TSO Comprehensive-rapporten.

Nedenstående vejledning beskriver fremgangsmåden til valg af tumortype via skærmen Create Run (Opret kørsel). Tumortypen kan også konfigureres ved at importere en CSV-fil, der indeholder en tumortype (se [Import af prøver på side 6](#)).

- 1 Dobbeltklik i cellen Tumor Type (Tumortype) i rækken for den relevante prøve for at få vist de tilgængelige tumortyper. De tilgængelige tumortyper vises på en hierarkisk liste, der er sorteret alfabetisk. Feltet Tumor Type (Tumortype) bruges også til at angive en kontroltype for kontrolprøver (se [Kontrolprøver på side 6](#)).
- 2 Find og vælg den ønskede tumortype ved hjælp af listen eller ved hjælp af søgelinjen øverst i vinduet Tumor Type (Tumortype).

Klargøring til protokoltrin

- 1 Dekontaminer arbejdsområder grundigt med et RNase/DNase-inhiberende rensmiddel.

**FORSIGTIG**

Alle procedurer i arbejdsgangen kræver et RNase/DNase-frit miljø.

- 2 Indstilling af termocyclerens programmer præ-amplifikation. Se *Programmering af termocykler på side 4.*
- 3 Følg producentens instruktioner for at konfigurere ultrasonikatoren.
- 4 Hvis der udelukkende behandles DNA-prøver, skal du fortsætte direkte til *Fragmenting af gDNA på side 12.*
- 5 Hent RNA-kontrollerne fra opbevaringen.
- 6 Tag reagensrørene ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 3 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (PN 20031127)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
EPH3	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Denaturering og annealering af RNA
FSM	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Syntetisering af første cDNA-streng
RVT	-25 °C til -15 °C	Opbevares på is.	Syntetisering af første cDNA-streng
SSM	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Syntetisering af anden cDNA-streng

Tabel 4 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (PN 20031119)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
SPB (lysegrøn mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Oprensning af cDNA
RSB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Oprensning af cDNA

Denaturering og annealering af RNA

Klargøring

- 1 Klargør følgende reagenser.
 - ▶ EPH3 – Sæt til side.
 - ▶ FSM – Bland på vortexblander. Centrifuger kortvarigt, og bland ved pipettering. Inspicer for bundfald. Hvis der er bundfald, skal du blande ved pipettering, indtil bundfaldet opløses.
 - ▶ RVT – Centrifuger kortvarigt, og bland ved pipettering. Opbevares på is.

BEMÆRK! RVT er en viskøs opløsning. Pipetter altid langsomt for at undgå, at der dannes bobler.

- 2 Kombiner følgende volumener i et mikrocentrifugerør for at klargøre en FSM+RVT-masterblanding.

Tabel 5 FSM+RVT-masterblanding

Bestanddel i masterblandingen	3 RNA-prøver (µl)	8 RNA-prøver (µl)	16 RNA-prøver (µl)	24 RNA-prøver (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se afsnittet Håndtering af reagenser i *Indlægsseddel til TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200007789)* for beregninger.

- 3 Bland ti gange ved pipettering.
- 4 Placer FSM+RVT-masterblandingen på is indtil *Syntetisering af første cDNA-streng på side 10.*

Fremgangsmåde

- 1 Optø ekstraherede RNA-prøver og RNA-kontroller på is.
RNA-kontroller skal behandles som prøver i den resterende del af protokollen.
Se *Indlægsseddel til TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200007789)* for at kvantificere prøver.

- 2 Bland hver RNA-prøve 10 gange ved pipettering.
- 3 Brug RNase/DNase-frit vand til at klargøre 40 ng af hver RNA-prøve i et endeligt volumen på 8,5 µl (4,7 ng/µl). For RNA-kontroller skal du bruge den koncentration, der er angivet på rørets mærkat.
- 4 Markér en ny 96-brønds PCR-plade CF (cDNA Fragments – cDNA-fragmenter).
- 5 Tilføj 8,5 µl af hver RNA-prøve til en unik brønd i CF PCR-pladen.
- 6 Kontrollér, at prøvepladens layout og indekser for hver prøve svarer den kørsel, der er planlagt i Local Run Manager under kørselskonfigurationen.
- 7 Bland EPH3 på vortexblander, og centrifugér kortvarigt.
- 8 Tilføj 8,5 µl EPH3 til hver prøvebrønd.
- 9 Påfør selvklæbende pladeforsegler på CF PCR-pladen.

**FORSIGTIG**

Sørg for at forsegle kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.

- 10 Omryst ved 1200 o/min. i 1 minut.
- 11 Centrifugér ved 280 × g i 1 minut.
- 12 Placer på termocykleren, og kør LQ-RNA-programmet.
Se *Programmering af termocykler på side 4.*
- 13 Når prøverne er 4 °C, skal de opretholdes ved denne temperatur i et minut, og derefter skal du straks fortsætte til næste trin.

Syntetisering af første cDNA-streng

Fremgangsmåde

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Fjern CF PCR-pladen fra termocykleren.
- 2 Bland FSM+RVT-masterblandingen 5 gange ved pipettering.
- 3 Tilføj 8 µl FSM+RVT-masterblanding til hver brønd.
- 4 Bland 5 gange ved pipettering.
- 5 Kassér den resterende FSM+RVT-masterblanding.
- 6 Påfør selvklæbende pladeforsegler på CF PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
- 7 Omryst ved 1200 o/min. i 1 minut.
- 8 Centrifugér ved 280 × g i 1 minut.
- 9 Placer på en termocykler, og kør 1stSS-programmet.
Se *Programmering af termocykler på side 4.*
- 10 Når prøverne er 4 °C, skal du straks fortsætte til næste trin.
Prøver af første streng kan opretholdes ved 4 °C i op til 5 minutter.

Syntetisering af anden cDNA-streng

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Klargør følgende reagens.
 - ▶ SSM – Vend og op ned 10 gange for at blande. Centrifugér kortvarigt.

Fremgangsmåde

- 1 Fjern CF PCR-pladen fra termocykleren.
- 2 Tilføj 25 µl SSM til hver prøvebrønd.
- 3 Påfør selvklæbende pladeforsegler på CF PCR-pladen.

Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.

- 4 Omryst ved 1200 o/min. i 1 minut.
- 5 Centrifuger ved 280 × g i 1 minut.
- 6 Placer på en termocycler, og kør 2ndSS-programmet.
Se *Programmering af termocycler på side 4.*
- 7 Når prøverne er 4 °C, skal de opretholdes ved denne temperatur i et minut, og derefter skal du straks fortsætte til næste trin.

Oprensning af cDNA

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Klargør følgende reagenser.
 - ▶ SPB – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - ▶ RSB – Sæt til side til brug i proceduren.
- 2 Klargør 80 % EtOH i et 15 ml eller 50 ml konisk rør.

Reagens	3 prøver	8 prøver	16 prøver	24 prøver
100 % ethanolalkohol, ren	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-frit vand	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Bland frisk 80 % EtOH på vortexblander.
- 4 Markér en ny 96-brønds MIDI-plade BIND1 (cDNA Binding - cDNA-binding).
- 5 Dæk til, og sæt til side.
- 6 Placer magneten.

Fremgangsmåde

Bind

- 1 Fjern CF PCR-pladen fra termocycleren.
- 2 Bland SPB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
- 3 Tilføj straks 90 µl SPB til hver prøvebrønd i BIND1 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SPB, skal der inkluderes et overskud på 1,05 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale pr. prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, så snart SPB er tilføjet til hver prøvebrønd.
- 4 Overfør hele volumen (50 µl) af hver prøve fra CF PCR-pladen til den tilsvarende brønd i BIND1 MIDI-pladen.
- 5 Kassér den tomme CF PCR-plade.
- 6 Påfør selvklebende pladeforsegler til BIND1 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 7 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
- 8 Inkuber ved stuetemperatur i 5 minutter.
- 9 Placer BIND1 MIDI-pladen i en magnetisk holder i 5 minutter.
- 10 Brug en 200 µl P200-pipette til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd uden at forstyrre perlepelleten.

Vask

- 1 Vask perle som følger.
 - a Bibehold perle på den magnetiske holder, og tilføj 200 µl frisk 80 % EtOH til hver brønd.
 - b Vent 30 sekunder.
 - c Fjern og kassér alle supernatanter fra hver brønd.
- 2 Vask perle en **ekstra** gang.
- 3 Fjern resterende EtOH fra hver brønd.
Brug en P20-pipette med fine spidser.
- 4 Kassér ubrugt 80 % EtOH.

Eluer

- 1 Fjern BIND1 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
- 2 Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
- 3 Tilføj 22 µl RSB til hver prøvebrønd.
- 4 Påfør selvklæbende pladeforsegl til BIND1 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 5 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
- 6 Inkuber ved stuetemperatur i 2 minutter.
- 7 Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
- 8 Markér en ny 96-brønds MIDI-plade PCF (Purified cDNA Fragments – Oopensede cDNA-fragmenter).
Hvis du stopper ved **SIKKERT STOPTIDSPUNKT** på side 12, skal du bruge en PCR-plade.
- 9 Overfør 20 µl eluat fra hver prøvebrønd i BIND1 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i PCF-pladen.
- 10 Kassér den tomme BIND1 MIDI-plade.
- 11 Tilføj 30 µl RSB til hver prøvebrønd i PCF-pladen.
- 12 Bland 10 gange ved pipettering.
- 13 Påfør selvklæbende pladeforsegl til PCF-pladen, og opbevar den på is.
- 14 Sæt EPH3, FSM, RVT og SSM tilbage til opbevaring.
- 15 Hvis du kun behandler prøver afledt af RNA (cDNA) og ikke stopper ved det sikre stoptidspunkt, skal du fortsætte til **Udførelse af end repair og A-tailing** på side 14.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal PCF PCR-pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage.

Stopdato og tidspunkt _____

Klargøring til protokoltrin

- 1 Hent DNA-kontrollerne fra opbevaringen.
- 2 Tag reagensrøret ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 6 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (PN 20031119)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
TEB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Fragmentering af gDNA

Fragmentering af gDNA

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Sørg for at følge anbefalingerne i Indlægsseddel til *TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789) for at kvantificere prøver.
- 2 Klargør følgende reagens.
 - ▶ TEB – Vend op og ned, eller bland på vortexblander.

Fremgangsmåde

Klargør pladen

- 1 Vælg én af de følgende tre muligheder for at klarlægge pladen.
 - ▶ **Mulighed nr. 1:** gDNA-prøver behandles sammen med cDNA-prøver i PCF MIDI-pladen.
 - a Markér PCF MIDI-pladen LP (Library Preparation – Biblioteksklargøring).
 - b Placer på is, og sæt til side til brug i *Overfør fragmenteret DNA på side 13*.
 - ▶ **Mulighed nr. 2:** gDNA-prøver behandles sammen med cDNA-prøver, og PCF PCR-pladen fryses.
 - a Optø PCF PCR-pladen til stuetemperatur.
 - b Centrifuger ved 280 x g i 1 minut.
 - c Bland 10 gange ved pipettering.
 - d Markér en ny 96-brønds MIDI-plade LP (Library Preparation – Biblioteksklargøring).
 - e Overfør alle 50 µl af hver prøve fra PCF PCR-pladen til den tilsvarende brønd i LP MIDI-pladen.
 - f Kassér PCF PCR-pladen.
 - g Påfør selvklæbende forseglere, og placer på is indtil *Overfør fragmenteret DNA på side 13*.
 - ▶ **Mulighed nr. 3:** Prøver, der udelukkende indeholder gDNA, behandles.
 - a Markér en ny 96-brønds MIDI-plade LP (Library Preparation – Biblioteksklargøring).
 - b Hvis du stopper ved *SIKKERT STOPTIDSPUNKT på side 14*, skal du bruge en PCR-plade.
 - c Dæk til, og sæt til side til brug i *Overfør fragmenteret DNA på side 13*.

Fortynd gDNA

- 1 Optø gDNA-prøver og DNA-kontroller ved stuetemperatur.
DNA-kontroller skal behandles som prøver i den resterende del af protokollen.
- 2 Bland hver gDNA-prøve 10 gange ved pipettering.
- 3 Centrifuger røret kortvarigt for at opsamle små dråber.
- 4 Vend TEB op og ned, eller bland på vortexblander.
- 5 Brug TEB til at klarlægge 40 ng af hver gDNA-prøve i et endeligt volumen på 52 µl (0,77 ng/µl).
Analysen kræver minimum ekstraktion af en koncentration på 3,33 ng/µl for at tillade mindst 40 µl TEB af volumenet på 52 µl. Ved DNA-kontroller skal du bruge den koncentration, der er angivet på mærkaten på røret. For at forhindre prøvetab må der ikke tilføjes mindre end 2 µl prøve ved pipettering til denne fortynding.

Fragmentér

- 1 Tilføj 52 µl til hver gDNA-prøve i en separat brønd i det ultrasoniske rør.
- 2 Registrér retningen på strimlen.
- 3 Fragmentér gDNA i fragmenter med en ultrasonikator.

Overfør fragmenteret DNA

- 1 Kontrollér, at prøvepladens layout og indekser for hver prøve svarer den kørsel, der er planlagt i Local Run Manager under kørselskonfigurationen.
- 2 Følg instruktionerne fra producenten af ultrasonikatoren for at gendanne prøven.
For visse typer ultrasoniske rør kan centrifugering være nødvendig for at samle prøven i røret.
- 3 For hver fragmenterede gDNA-prøve skal du bruge en p20-pipette med fine spidser til at foretage 3 overførsler på 16,7 µl til en tom brønd i LP MIDI-pladen.

- 4 Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP MIDI-pladen.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal du påføre selvklæbende pladeforsegler på LP PCR-pladen og centrifugere ved 280 x g i 1 minut. Opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage.

Stopdato og tidspunkt _____

Klargøring til protokoltrin

- 1 Klargør en isspand.
 2 Tag reagensrøret ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 7 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Æske (PN 20031118)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
ERA1-A	-25 °C til -15 °C	Opbevares på is.	Udførelse af end repair og A-tailing
ERA1-B	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Udførelse af end repair og A-tailing
ALB1	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Ligering af adaptere
LIG3	-25 °C til -15 °C	Opbevares på is.	Ligering af adaptere
SUA1 (blå hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Ligering af adaptere
UMI (hvid hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Ligering af adaptere
STL	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Ligering af adaptere
EPM	-25 °C til -15 °C	Opbevares på is.	Indeksering af PCR

Tabel 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Æske (PN 20031119)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
SPB (lysegrøn mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Oprensning ved ligering
RSB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Oprensning ved ligering

Tabel 9 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Æske (PN 20031120)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
UPxx	-25 °C til -15 °C	Optø de relevante indekssprimerrør til stuetemperatur.	Indeksering af PCR

Tabel 10 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Æske (PN 20031126)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
CPxx	-25 °C til -15 °C	Optø de relevante indekssprimerrør til stuetemperatur.	Indeksering af PCR

Udførelse af end repair og A-tailing

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Forvarm 2 mikroprøveinkubatorer med MIDI-varmeblokindsatser som følger.
- ▶ Forvarm en mikroprøveinkubator til 30 °C.
 - ▶ Forvarm en mikroprøveinkubator til 72 °C.
- 2 Klargør følgende reagenser.
- ▶ ERA1-A – Centrifuger kortvarigt, og bland derefter ved pipettering. Opbevares på is.

- ▶ ERA1-B – Bland på vortexblender, og centrifugér derefter kortvarigt. Inspicer for bundfald. Hvis der er bundfald, skal du opvarme røret til 37 °C og derefter blande ved pipettering, indtil bundfaldet opløses.

3 Klargør ERA1-masterblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 11 ERA1-masterblanding

Bestanddel i masterblandingen	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se afsnittet Håndtering af reagenser i *Indlægsseddel til TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200007789)* for beregninger.

- 4 Bland 10 gange ved langsom pipettering, centrifugér kortvarigt, og placer herefter ERA1-masterblandingen på is.
- 5 Vælg den relevante af de to følgende muligheder for at klarlægge pladen.
- ▶ **Mulighed nr. 1:** Hvis prøverne er i en MIDI-plade.
 - a Markér MIDI-pladen LP2 (Library Preparation 2 – Biblioteksklargøring 2). Hvis nogle prøver er i separate MIDI-plader, skal alle prøver overføres til separate brønde i samme MIDI-plade i henhold til pladelayoutet.
 - ▶ **Mulighed nr. 2:** Hvis pladen er frossen.
 - a Optø PCF PCR-pladen eller LP PCR-pladen til stuetemperatur.
 - b Centrifugér pladen ved 280 × g i 1 minut.
 - c Bland 10 gange ved pipettering.
 - d Markér en ny 96-brønds MIDI-plade LP2 (Library Preparation 2 – Biblioteksklargøring 2).
 - e Overfør alle 50 µl af hver prøve fra PCF PCR-pladen eller LP PCR-pladen til den tilsvarende brønd i LP2 MIDI-pladen.
 - f Kassér PCF PCR- eller LP PCR-pladen.

Fremgangsmåde

- 1 Tilføj 10 µl ERA1-masterblanding til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
- 2 Kassér den resterende ERA1-masterblanding.
- 3 Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen. Forsegling kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
- 4 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
- 5 Inkuber i en forvarmet mikroprøveinkubator ved 30 °C i 30 minutter.
- 6 Overfør straks til en anden, forvarmet mikroinkubator, og inkuber ved 72 °C i 20 minutter.
- 7 Placer LP2 MIDI-pladen på is i 5 minutter.

Ligering af adaptore

Denne proces ligger adaptore til enderne af cDNA- og/eller gDNA-fragmenterne.

TSO Comprehensive-analysen inkluderer SUA1-adaptore og UMI-adaptore.

- ▶ Brug SUA1-adaptore sammen med RNA-prøver.
- ▶ Brug UMI-adaptore sammen med DNA-prøver.

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Klargør følgende reagenser.
- ▶ ALB1 – Bland på vortexblender i mindst 10 sekunder, og centrifugér derefter kortvarigt.

- ▶ **LIG3** – Centrifuger kortvarigt, og bland derefter ved pipettering. Opbevares på is.
- ▶ **SUA1** – Bland på vortexblander i mindst 10 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
- ▶ **UMI** – Bland på vortexblander i mindst 10 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
- ▶ **STL** – Sæt til side til brug i proceduren.

Fremgangsmåde

- 1 Fjern LP2 MIDI-pladen fra is.
 - 2 Tilføj 60 µl ALB1 til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen. Sørg for at pipettere langsomt.
 - 3 Tilføj 5 µl LIG3 til hver prøvebrønd.
 - 4 Tilføj adaptore.
- Kombiner **ikke** forskellige typer adaptore sammen.
- **RNA-prøvebrønde** – 10 µl SUA1 (blå hætte) til hver prøve afledt fra RNA.
 - **DNA-prøvebrønde** – 10 µl UMI (hvid hætte) til hver prøve afledt fra DNA.
- 5 Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
 - 6 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
 - 7 Inkuber ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - 8 Bland STL på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - 9 Tilføj 5 µl STL til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
 - 10 Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
 - 11 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.

Oprensning ved ligering

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Klargør følgende reagenser.
 - ▶ **SPB** – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - ▶ **RSB** – Sæt til side til brug i proceduren.
- 2 Klargør 80 % EtOH i et 15 ml eller 50 ml konisk rør.

Reagens	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
100 % ethanolalkohol, ren	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-frit vand	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Bland frisk 80 % EtOH på vortexblander.
- 4 Placer magneten.

Fremgangsmåde

Bind

- 1 Bland SPB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
- 2 Tilføj straks 112 µl SPB til hver prøvebrønd i LP2 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SPB, skal der inkluderes et overskud på 1,05 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale pr. prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, så snart SPB er tilføjet til hver prøvebrønd.
- 3 Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 4 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
- 5 Inkuber ved stuetemperatur i 5 minutter.

- 6 Placer LP2 MIDI-pladen på den magnetiske holder i 10 minutter.
- 7 Brug en P200-pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver prøvebrønd uden at forstyrre perlepelleten.

Vask

- 1 Vask perlerne som følger.
 - a Bibehold perlerne på den magnetiske holder, og tilføj 200 µl frisk 80 % EtOH til hver prøvebrønd.
 - b Vent 30 sekunder.
 - c Fjern og kassér alle supernatanter fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
- 2 Vask perlerne en **ekstra** gang.
- 3 Fjern resterende EtOH fra hver brønd.
Brug en P20-pipette med fine spidser.
- 4 Kassér ubrugt 80 % EtOH.

Eluer

- 1 Fjern LP2 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
- 2 Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
- 3 Tilføj 27,5 µl RSB til hver prøvebrønd.
- 4 Påfør selvklæbende pladeforsegler på LP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 5 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
- 6 Inkuber ved stuetemperatur i 2 minutter.
- 7 Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
- 8 Markér en ny 96-brønds PCR-plade LS (Library Samples - Biblioteksprøver).
- 9 Overfør 25 µl af hvert eluat fra LP2 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i LS PCR-pladen.
- 10 Kassér den tomme LP2 MIDI-plade.
- 11 Påfør selvklæbende forsegl på LS PCR-pladen.

Indeksring af PCR

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Klargør følgende reagenser.
 - ▶ EPM – Opbevares på is.
 - ▶ UPxx – Bland på vortexblander, og centrifuger kortvarigt. UPxx er den indeksprimer, der blev valgt på skærmen Create Run (Opret kørsel) i Local Run Manager-softwaren under kørselskonfigurationen.
 - ▶ CPxx – Bland på vortexblander, og centrifuger kortvarigt. CPxx er den indeksprimer, der blev valgt på skærmen Create Run (Opret kørsel) i Local Run Manager-softwaren under kørselskonfigurationen.
- 2 Sørg for, at indekser for hver prøve matcher den kørsel, der blev planlagt i Local Run Manager under kørselskonfigurationen. Sørg for at følge instruktionerne vedrørende valg af indeks i Indlægsseddel til *TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789).



FORSIGTIG

Uoverensstemmelser mellem prøver og indeksprimere medfører rapportering af forkerte resultater på grund af manglende identifikation af positiv prøve.

Fremgangsmåde

- 1 Tilføj 5 µl af den relevante indeksprimer (UPxx eller CPxx) til den tilsvarende prøvebrønd i LS PCR-pladen i henhold til de indekser, der blev valgt på skærmen Create Run (Opret kørsel) i Local Run Manager-softwaren under kørselskonfigurationen.



FORSIGTIG

Håndter og åbn kun ét indeksprimerrør ad gangen. Luk hvert indekserør umiddelbart efter brug. Kombiner ikke indekserprimere.

- 2 Bland EPM på vortexblander i 5 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 3 Tilføj 20 µl EPM til hver prøvebrønd.
- 4 Påfør selvklæbende forseglers på LS PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
- 5 Omryst ved 1200 o/min. i 1 minut.
- 6 Sæt reagenser til brug præ-amplifikation tilbage til opbevaring.



FORSIGTIG

Udfør alle efterfølgende trin i et område, der anvendes efter amplifikation, for at forhindre overførsel af amplifikationsprodukt.

- 7 Centrifuger LS PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.
- 8 Placer på den forprogrammerede termocykler til anvendelse post amplifikation, og kørsel I-PCR-programmet.
Se *Programmering af termocykler på side 4*

BEMÆRK! Hvis du fortsætter med *Konfiguration af første hybridisering på side 19*, skal du følge instruktionerne til optøning af reagenser i trinnene Klargør protokol.

- 9 Når I-PCR-programmet er færdigt, skal LS PCR-pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut.
- 10 Markér pladen ALS (Amplified Library Samples – Amplificerede biblioteksprøver).

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal ALS PCR-pladen opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

Stopdato og tidspunkt _____

Klargøring til protokoltrin

- 1 Sørg for, at termocyklerens programmer til post-amplifikation er indstillet. Se *Programmering af termocykler på side 4*.
- 2 Tag reagensrøret ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 12 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Æske (PN 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
TCB1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Konfiguration af første hybridisering

Tabel 13 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Æske (PN 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
TCA1	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Konfiguration af første hybridisering

Tabel 14 TruSight Oncology Comp Indhold i kittet, æske (PN 20031122)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
OPR1 (rød hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Konfiguration af første hybridisering
OPD2 (hvid hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Konfiguration af første hybridisering

Konfiguration af første hybridisering

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Klargør følgende reagenser.
 - ▶ TCB1 – Opvarm røret ved 37 °C i 5 minutter. Bland på vortexblander i 10 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - ▶ TCA1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - ▶ OPR1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - ▶ OPD2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 2 Hvis ALS PCR-pladen har været opbevaret, skal den optøs ved stuetemperatur og centrifugeres ved 280 x g i 1 minut. Bland derefter ved pipettering.
- 3 Markér en ny 96-brønds PCR-plade HYB1 (Hybridization 1 – Hybridisering 1).

Fremgangsmåde

- 1 Overfør 20 µl af hvert cDNA- og/eller gDNA-bibliotek fra ALS PCR-pladen til den tilsvarende brønd i HYB1 PCR-pladen.
- 2 Påfør selvklæbende pladeforsegler til ALS PCR-pladen, og sæt den til side. Forsegel kanter og brønde fuldstændigt.
- 3 Inspicer TCB1 for bundfald. Hvis der er bundfald, skal røret opvarmes igen og blandes på vortexblander, indtil krystallerne er opløst.
- 4 Tilføj 15 µl TCB1 til hver biblioteksbrønd i HYB1 PCR-pladen.
- 5 Tilføj 10 µl TCA1 til hver biblioteksbrønd i HYB1 PCR-pladen.
- 6 Tilføj prober.

Kombiner **ikke** forskellige typer af prober.

 - ▶ **RNA-biblioteksbrønde** – 5 µl OPR1 til hvert bibliotek afledt fra RNA.
 - ▶ **DNA-biblioteksbrønde** – 5 µl OPD2 til hvert bibliotek afledt fra DNA.
- 7 Påfør selvklæbende pladeforsegler til HYB1 PCR-pladen.



FORSIGTIG

Sørg for at forsegle kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.

- 8 Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
- 9 Placer på termocykler, og kør HYB1-programmet.

Se *Programmering af termocykler på side 4.*
- 10 Hybridiser ved 57 °C i minimum 8 timer og maksimum 24 timer.
- 11 Sæt hybridiseringsreagenser tilbage til opbevaring.
- 12 Opbevar ALS PCR-pladen ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

Klargøring til protokoltrin

- 1 Ved starten på dag 2 tages reagensrørene ud af æsken, og instruktionerne til optøning skal følges.

Tabel 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Æske (PN 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
SMB (mørkeblå mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Indfangning af Targets One Indfangning af Targets Two
ET2	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Indfangning af Targets One Indfangning af Targets Two
HP3	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Indfangning af Targets One Indfangning af Targets Two Normalisering af biblioteker
TCB1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Konfiguration af anden hybridisering
RSB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Indfangning af Targets Two Oprensning af amplificeret, beriget bibliotek

Tabel 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Æske (PN 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
EE2	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Indfangning af Targets One Indfangning af Targets Two Normalisering af biblioteker
EEW	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Indfangning af Targets One
TCA1	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Konfiguration af anden hybridisering

Tabel 17 TruSight Oncology Comp Indhold i kittet, æske (PN 20031122)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
OPR1 (rød hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Konfiguration af anden hybridisering
OPD2 (hvid hætte)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Konfiguration af anden hybridisering

Indfangning af Targets One

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Forvarm en mikroprøveinkubator med MIDI-varmeblokindsats til 57 °C.
- 2 Klargør følgende reagenser.
 - ▶ EEW – Bland på vortexblander i 1 minut.
 - ▶ EE2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - ▶ HP3 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - ▶ SMB – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - ▶ Sørg for at bruge **SMB** og ikke **SPB** til denne procedure.
 - ▶ ET2 – Sæt til side til brug i proceduren.
- 3 Klargør frisk EE2+HP3-elueringsblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 18 EE2+HP3-elueringsblanding til Indfangning af Targets One

Bestanddel i elueringsblandingen	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se afsnittet Håndtering af reagenser i *Indlægsseddel til TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789) for beregninger.

- 4 Bland EE2+HP3-elueringsblanding, og centrifuger derefter kortvarigt. Sæt til side til trinnet *Eluer*.
- 5 Markér en ny 96-brønds MIDI-plade CAP1 (Capture 1 – Indfang 1).
- 6 Placer magneten.

Fremgangsmåde

Bind

- 1 Fjern HYB1 PCR-pladen fra termocykleren.
- 2 Centrifuger HYB1 PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.
- 3 Bland SMB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
- 4 Tilføj straks 150 µl SMB til hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SMB, skal der inkluderes et overskud på 1,15 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale pr. prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, så snart SMB er tilføjet til hver prøvebrønd.
- 5 Indstil pipetten til 50 µl, og overfør hele volumen af hvert bibliotek fra HYB1 PCR-pladen til den tilsvarende brønd i CAP1 MIDI-pladen.
- 6 Kassér den tomme HYB1 PCR-plade.
- 7 Påfør selvklæbende pladeforsegl på CAP1 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
- 8 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
- 9 Inkuber på en forvarmet mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.
- 10 Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
- 11 Mens CAP1 MIDI-pladen bibeholdes på den magnetiske holder, anvendes en P200-pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter uden at forstyrre perlepelleten.



FORSIGTIG

Fortsæt straks til det næste trin (*Vask*). Lad ikke perlepelleten henstå i en længere periode, uden at der er væske til stede.

Vask

- 1 Vask perlerne som følger.
 - a Fjern CAP1 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
 - b Tilføj 200 µl EEW til hver brønd.
 - c Indstil pipettevolumenet til 150 µl, og bland ved pipettering minimum 10 gange. Sørg for, at alle perler er resuspendet.



FORSIGTIG

Sørg for, at der ikke er perlepellets til stede ved forsigtigt at opsuge hele brøndens perleopløsning i spidsen. Inspicer herefter bunden af hver brønd for en pellet. Skråstil pipettespidsen mod perlepelleten under vasketrinnene for at løsne pelleten. Sørg for, at perlepelleten er helt opløst. Opløsningen bør være mørkebrun og have en homogen konsistens.

- d Påfør selvklæbende pladeforsegl på CAP1 MIDI-pladen.
- e Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
- f Omryst ved 1800 o/min. i 4 minutter.
- g Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 5 minutter.
- h Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.

- i Bibehold på den magnetiske holder, og fjern og kassér alle supernatanter fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
- 2 Vask perlerne en **ekstra** gang.
- 3 Vask perlerne en **tredje** gang.
- 4 Fjern resterende supernatant fra hver brønd.
Brug en P20-pipette med fine spidser.

Eluer

- 1 Fjern CAP1 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
- 2 Bland frisk EE2+HP3-elueringsblanding på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 3 Tilføj forsigtigt 17 µl EE2+HP3-elueringsblanding til hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen.
- 4 Kassér resterende EE2+HP3-elueringsblanding.
- 5 Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP1 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 6 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
- 7 Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
- 8 Markér en ny 96-brønds PCR-plade ELU1 (Elution 1 – Eluering 1).
- 9 Bland ET2 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 10 Tilføj 5 µl ET2 til hver tilsvarende biblioteksbrønd i den nye ELU1 PCR-plade.
- 11 Overfør forsigtigt 15 µl eluat fra hver biblioteksbrønd i CAP1 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i ELU1 PCR-pladen.
- 12 Kassér den tomme CAP1 MIDI-plade.
- 13 Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU1 PCR-pladen.
- 14 Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
- 15 Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
- 16 Sæt EEW tilbage til opbevaring.

Konfiguration af anden hybridisering

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Klargør følgende reagenser.
 - ▶ TCB1 – Opvarm røret ved 37 °C i 5 minutter. Bland på vortexblander i 10 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - ▶ TCA1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - ▶ OPR1 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
 - ▶ OPD2 – Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Fremgangsmåde

- 1 Inspicer TCB1 for bundfald. Hvis der er bundfald, skal røret opvarmes igen og blandes på vortexblander, indtil krystallerne er opløst.
- 2 Tilføj 15 µl TCB1 til hver biblioteksbrønd i ELU1 PCR-pladen.
- 3 Tilføj 10 µl TCA1 til hver biblioteksbrønd.
- 4 Tilføj prober.
Kombiner **ikke** forskellige typer af prober.
 - ▶ **RNA-biblioteksbrønde** – 5 µl OPR1 til hvert bibliotek afledt fra RNA.
 - ▶ **DNA-biblioteksbrønde** – 5 µl OPD2 til hvert bibliotek afledt fra DNA.
- 5 Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU1 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.

- 6 Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
- 7 Placer på termocykler, og kør HYB2-programmet.
Se *Programmering af termocykler på side 4.*
- 8 Hybridiser ved 57 °C i minimum 1,5 og maksimum 4 timer.
- 9 Sæt TCA1, TCB1, OPR1 og OPD2 tilbage til opbevaring.

Indfangning af Targets Two

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Forvarm en mikroprøveinkubator med MIDI-varmeblokindsats til 57 °C.
- 2 Klargør følgende reagenser.
 - ▶ EE2 – Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
 - ▶ HP3 – Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
 - ▶ SMB – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - ▶ Sørg for at bruge **SMB** og ikke SPB til denne procedure.
 - ▶ RSB – Sæt til side til brug i proceduren.
 - ▶ ET2 – Sæt til side til brug i proceduren.
- 3 Klargør frisk EE2+HP3-elueringsblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 19 EE2+HP3-elueringsblanding til Indfangning af Targets Two

Bestanddel i elueringsblandingen	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se afsnittet Håndtering af reagenser i *Indlægsseddel til TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200007789)* for beregninger.

- 4 Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt. Sæt til side til trinnet *Eluer.*
- 5 Markér en ny 96-brønds MIDI-plade CAP2 (Capture 2 – Indfang 2).
- 6 Placer magneten.

Fremgangsmåde

Bind

- 1 Fjern ELU1 PCR-pladen fra termocyklern.
- 2 Centrifugér ELU1 PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.
- 3 Bland SMB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
- 4 Tilføj straks 150 µl SMB til hver biblioteksbrønd i CAP2 MIDI-pladen.
Hvis der bruges en skål til at dispensere SMB, skal der inkluderes et overskud på 1,15 ved portionsopdeling af tilstrækkeligt materiale pr. prøve. Kassér eventuelt overskydende materiale, så snart SMB er tilføjet til hver prøvebrønd.
- 5 Indstil pipetten til 50 µl, og overfør hele volumen af hvert bibliotek fra ELU1 PCR-pladen til den tilsvarende brønd i CAP2 MIDI-pladen.
- 6 Kassér den tomme ELU1 PCR-plade.
- 7 Påfør selvklæbende pladeforsegl på CAP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
- 8 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
- 9 Inkuber i en mikroprøveinkubator ved 57 °C i 25 minutter.

BEMÆRK! Hvis du fortsætter med *Amplificering af beriget bibliotek på side 25*, skal du følge instruktionerne for optøning af reagenser i afsnittet Trin til klargøring til protokol.

- 10 Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
- 11 Bibehold CAP2 MIDI-pladen på den magnetiske holder, og brug en P200-pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver biblioteksbrønd uden at forstyrre perlepelleten.



FORSIGTIG

Fortsæt straks til det næste trin (*Vask*). Lad ikke perlepelleten henstå i en længere periode, uden at der er væske til stede.

Vask

- 1 Fjern CAP2 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
- 2 Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
- 3 Tilføj 200 µl RSB til hver brønd.
- 4 Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 5 Omryst ved 1800 o/min. i 4 minutter.
- 6 Placer på den magnetiske holder i 2 minutter.
- 7 Bibehold CAP2 MIDI-pladen på den magnetiske holder, og fjern og kassér alle supernatanter uden at forstyrre perlepelleten.
- 8 Fjern resterende supernatant fra hver brønd.
Brug en P20-pipette med fine spidser.

Eluer

- 1 Fjern CAP2 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
- 2 Bland frisk EE2+HP3-elueringsblanding på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 3 Tilføj 22 µl EE2+HP3-elueringsblanding til hver biblioteksbrønd i CAP2 MIDI-pladen.
- 4 Kassér resterende EE2+HP3-elueringsblanding.
- 5 Påfør selvklæbende pladeforsegler på CAP2 MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 6 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
- 7 Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
- 8 Markér en ny 96-brønds PCR-plade ELU2 (Elution 2 – Eluering 2).
- 9 Bland ET2 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 10 Tilføj 5 µl ET2 til hver tilsvarende biblioteksbrønd i den nye ELU2 PCR-plade.
- 11 Overfør forsigtigt 20 µl eluat fra hver biblioteksbrønd i CAP2 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i ELU2 PCR-pladen.
- 12 Kassér den tomme CAP2 MIDI-plade.
- 13 Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU2 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
- 14 Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
- 15 Sæt SMB, EE2, HP3 og ET2 tilbage til opbevaring.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal ELU2 PCR-pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 7 dage. Sæt RSB tilbage til opbevaring.

Stopdato og tidspunkt _____

Klargøring til protokoltrin

- 1 Klargør en isspand.
- 2 Tag reagensrøret ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Æske (PN 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
PPC3	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Amplificering af beriget bibliotek
EPM	-25 °C til -15 °C	Opbevares på is.	Amplificering af beriget bibliotek

Tabel 21 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Æske (PN 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
SPB (lysegrøn mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Oprensning af amplificeret, beriget bibliotek
RSB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Oprensning af amplificeret, beriget bibliotek Klargøring til sekventering

Amplificering af beriget bibliotek

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Hvis ELU2-pladen har været opbevaret, skal den optøs til stuetemperatur og derefter centrifugeres ved 280 x g i 1 minut.

Fremgangsmåde

- 1 Bland PPC3 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 2 Tilføj 5 µl PPC3 til hver biblioteksbrønd i ELU2 PCR-pladen.
- 3 Bland EPM på vortexblander i 5 sekunder, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 4 Tilføj 20 µl EPM til hver biblioteksbrønd.
- 5 Påfør selvklæbende pladeforsegler på ELU2 PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt for at undgå fordampning.
- 6 Omryst ved 1200 o/min. i 2 minutter.
- 7 Placer på en termocykler, og kør EL-PCR-programmet.
Se *Programmering af termocykler på side 4*.

BEMÆRK! Hvis du fortsætter med *Normalisering af biblioteker på side 27*, skal du følge instruktionerne til optøning i afsnittet Trin til klarlægning til protokol.

- 8 Sæt PPC3 og EPM tilbage til opbevaring.

Oprensning af amplificeret, beriget bibliotek

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Klargør følgende reagenser.
 - ▶ SPB – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - ▶ Sørg for at bruge **SPB**, ikke SMB til denne procedure.
 - ▶ RSB – Sæt til side til brug i proceduren.

- 2 Klargør frisk 80 % ethanol i et 15 ml eller 50 ml konisk rør.

Reagens	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
100 % ethanolalkohol, ren	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-frit vand	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Bland frisk 80 % EtOH på vortexblander.
 4 Markér en ny 96-brønds MIDI-plade BIND2 (Clean Up Binding - Binding ved oprensning).
 5 Placer magneten.

Fremgangsmåde

Bind

- 1 Fjern ELU2 PCR-pladen fra termocykleren.
 2 Centrifugér ELU2 PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut.
 3 Bland SPB på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne.
 4 Tilføj straks 110 µl SPB til hver biblioteksbrønd i BIND2 MIDI-pladen.
 5 Overfør 50 µl af hvert bibliotek fra ELU2 PCR-pladen til den tilsvarende brønd i BIND2 MIDI-pladen.
 6 Kassér den tomme ELU2 PCR-plade.
 7 Påfør selvklæbende pladeforsegl til BIND2 MIDI-pladen.
 Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
 8 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
 9 Inkuber ved stuetemperatur i 5 minutter.
 10 Placer pladen i en magnetisk holder i 5 minutter.
 11 Brug en P200-pipette indstillet til 200 µl til at fjerne og kassere **alle** supernatanter fra hver biblioteksbrønd uden at forstyrre perlepelleten.

Vask

- 1 Vask perlerne som følger.
- a Bibehold perlerne på den magnetiske holder, og tilføj 200 µl frisk 80 % EtOH til hver brønd.
 - b Vent 30 sekunder.
 - c Fjern og kassér alle supernatanter fra hver prøvebrønd uden at forstyrre perlepelleten.
- 2 Vask perlerne en **ekstra** gang.
 3 Fjern resterende EtOH fra hver brønd.
 Brug en P20-pipette med fine spidser.
 4 Kassér ubrugt 80 % EtOH.

Eluer

- 1 Fjern BIND2 MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
 2 Vend op og ned, eller brug vortexblander for at blande RSB.
 3 Tilføj 32 µl RSB til hver biblioteksbrønd.
 4 Påfør selvklæbende pladeforsegl til BIND2 MIDI-pladen.
 Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
 5 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
 6 Inkuber ved stuetemperatur i 2 minutter.
 7 Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
 8 Markér en ny 96-brønds PCR-plade PL (Purified Libraries – Oprensede biblioteker).
 9 Overfør 30 µl af hvert eluat fra BIND2 MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i PL PCR-pladen.
 10 Kassér den tomme BIND2 MIDI-plade.

- 11 Påfør selvklæbende pladeforseglere til PL PCR-pladen.
- 12 Sæt SPB tilbage til opbevaring.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal PL PCR-pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut og opbevares ved -25° C til -15 °C i op til 30 dage. Sæt RSB tilbage til opbevaring.

Stopdato og tidspunkt _____

Klargøring til protokoltrin

- 1 Tag reagensrøret ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 22 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Æske (PN 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
LNA1	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker
EE2	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker

Tabel 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Æske (PN 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
LNB1	2 °C til 8 °C	Lad henstå i 30 minutter for at opnå stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker
HP3	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker Klargøring til sekventering
LNW1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker
LNS1	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Normalisering af biblioteker

- 2 Hvis du fortsætter samme dag med *Klargøring til sekventering på side 30*, skal du følge instruktionerne til optøning i afsnittet Trin til klarlægning til protokol.

Normalisering af biblioteker

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Klargør følgende reagenser.
 - ▶ LNB1 – Sørg for, at perlerne har været opbevaret ved stuetemperatur i 30 minutter.
 - ▶ LNA1 – Bland på vortexblander.
 - ▶ EE2 – Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
 - ▶ HP3 – Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
 - ▶ LNW1 – Bland på vortexblander. Sæt til side til brug i proceduren.
 - ▶ LNS1 – Bland på vortexblander. Sæt til side til brug i proceduren.
- 2 Bland LNB1 på vortexblander i 1 minut for at resuspendere perlerne. Vend LNB1-røret op og ned for at sikre, at alle perlerne er resuspendet.
- 3 Brug en 800 µl P1000-pipette, pipettér LNB1 op og ned 10 gange for at sikre resuspension.
- 4 Klargør straks frisk LNA1+LNB1-masterblanding i et konisk rør.

**FORSIGTIG**

Resuspender LNB1-perlepelleten helt i bunden af røret for at forhindre uensartet clusterdensitet.

Tabel 24 LNA1+LNB1-masterblanding

Bestanddel i masterblandingen	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
LNA1	229 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se afsnittet Håndtering af reagenser i *Indlægsseddel til TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200007789)* for beregninger.

- 5 Bland LNA1+LNB1-masterblanding på vortexblender. Sæt til side til trinnet *Bind*.
- 6 Klargør frisk EE2+HP3-elueringsblanding i et mikrocentrifugerør.

Tabel 25 EE2+HP3-elueringsblanding til normalisering af biblioteker

Bestanddel i elueringsblandingen	3 biblioteker	8 biblioteker	16 biblioteker	24 biblioteker	48 biblioteker
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Denne tabel inkluderer overskud af volumen. Se afsnittet Håndtering af reagenser i *Indlægsseddel til TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokumentnr. 200007789)* for beregninger.

- 7 Bland frisk elueringsblanding på vortexblender, og centrifuger derefter kortvarigt. Sæt til side til trinnet *Eluer*.
- 8 Hvis PL PCR-pladen har været opbevaret, skal den optøs til stuetemperatur, centrifugeres ved 280 x g i 1 minut og derefter blandes ved pipettering.
- 9 Markér en ny 96-brønds MIDI-plade BBN (Bead Based Normalization – Perlebaseret normalisering).
- 10 Placer magneten.

Fremgangsmåde

Bind

- 1 Bland LNA1+LNB1-masterblanding på vortexblender.
- 2 Tilføj straks 45 µl LNA1+LNB1-masterblanding til hvert bibliotek i BBN MIDI-pladen.
- 3 Kassér den resterende LNA1+LNB1-masterblanding.
- 4 Tilføj 20 µl af hvert bibliotek fra PL PCR-pladen til den tilsvarende brønd i BBN MIDI-pladen.
- 5 Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 6 Omryst ved 1800 o/min. i 30 minutter.
- 7 Påfør selvklæbende pladeforsegler til PL PCR-pladen, og sæt den tilbage til opbevaring.
- 8 Placer pladen på en magnetisk holder i 2 minutter.
- 9 Bibehold pladen på en magnetisk holder, og brug en P200-pipette til at fjerne og kassere alle supernatanter fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.

Vask

- 1 Vask perlerne som følger.
 - a Fjern BBN MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
 - b Tilføj 45 µl LNW1 til hver biblioteksbrønd.
 - c Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
 - d Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
 - e Omryst ved 1800 o/min. i 5 minutter.
 - f Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
 - g Fjern og kassér alle supernatanter fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
- 2 Vask perlerne en **ekstra** gang.

- 3 Fjern resterende supernatant fra hver brønd.
Brug en P20-pipette med fine spidser.

Eluer

- 1 Fjern BBN MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
- 2 Bland frisk EE2+HP3-elueringsblanding på vortexblender, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 3 Tilføj 32 µl EE2+HP3-opløsning til hver biblioteksbrønd i BBN MIDI-pladen.
- 4 Kassér den resterende elueringsblanding.
- 5 Påfør selvklæbende pladeforsegler på BBN MIDI-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 6 Omryst ved 1800 o/min. i 2 minutter.
- 7 Placer på en magnetisk holder i 2 minutter.
- 8 Markér en ny 96-brønnds PCR-plade NL (Normalized Libraries - Normaliserede biblioteker).
- 9 Overfør forsigtigt 30 µl eluat fra hver biblioteksbrønd i BBN MIDI-pladen til den tilsvarende brønd i NL PCR-pladen.

**FORSIGTIG**

Hvis perlerne suges op i pipettespidser, skal du dispensere perlerne tilbage på pladen på den magnetiske holder og vente, indtil væsken er klar (~2 minutter), inden du fortsætter til det næste trin i proceduren.

- 10 Kassér den tomme BBN MIDI-plade.
- 11 Bland LNS1 på vortexblender.
- 12 Tilføj 30 µl LNS1 til hver biblioteksbrønd i en ny NL PCR-plade.
- 13 Bland 5 gange ved pipettering.
- 14 Tilføj selvklæbende pladeforsegler til NL PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 15 Sæt LNB1, LNA1, EE2, LNW1 og LNS1 tilbage til opbevaring.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal NL PCR-pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut og opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

Stopdato og tidspunkt _____

Klargøring til protokoltrin

Start klargøring af sekventeringsmaterialer fra NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklusser) (PN 20028871) mindst en time inden brug.

- 1 Hent biblioteksfortyndingsbufferen (HT1) fra opbevaringen på -25 °C til -15 °C, optø til stuetemperatur, og placer på is.
- 2 Følg instruktionerne til klargøring i *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)* for de andre materialer i kittet.
 - ▶ NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser)
 - ▶ NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklusser)
 - ▶ NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklusser)
- 3 Tag reagensrøret ud af æsken, og følg instruktionerne til optøning.

Tabel 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Æske (PN 20031121)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
PhiX Internal Control (PhiX)	-25 °C til -15 °C	Optøs til stuetemperatur. Opbevares på is.	Klargøring til sekventering

Tabel 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Æske (PN 20031123)

Reagens	Opbevaring	Instruktioner til optøning	Protokoltrin
HP3	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Klargøring til sekventering
RSB (lyserød mærkat)	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå stuetemperatur.	Klargøring til sekventering

Klargøring til sekventering

Klargøring

Startdato og tidspunkt _____

- 1 Gennemgå retningslinjerne for antal biblioteker og valg af indeks i Indlægsseddel til *TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokumentnr. 200007789).
- 2 Markér et mikrocentrifugerør dHP3 (diluted HP3 – fortyndet HP3).
- 3 Markér et mikrocentrifugerør dPhiX (diluted PhiX – fortyndet PhiX).
- 4 Forvarm en varmeblok til 96 °C til mikrocentrifugerør.
- 5 Klargør en isspand.

Fortynd og denaturer PhiX-kontrol

- 1 Bland HP3 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 2 Kombiner følgende volumener i dHP3-mikrocentrifugerøret.
 - ▶ 10 µl HP3
 - ▶ 190 µl RNase/DNase-frit vand
- 3 Bland dHP3 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 4 Vend op og ned, eller bland RSB på vortexblander.
- 5 Bland PhiX-kontrol på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 6 Kombiner følgende volumener i dPhiX-mikrocentrifugerøret.
 - ▶ 8 µl RSB
 - ▶ 2 µl PhiX-kontrol
- 7 Tilføj 10 µl dHP3 til dPhiX-røret.
- 8 Kassér dHP3-røret.
- 9 Bland dPhiX-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 10 Inkuber dPhiX ved stuetemperatur i 5 minutter for at denaturere.
- 11 Bland HT1 på vortexblander.
- 12 Tilføj straks 980 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til dPhiX.
- 13 Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 14 Placer dPhiX på is indtil klarlægning af den anden fortynding.
Den endelige koncentration er 20 pM dPhiX.
- 15 Sæt PhiX, HP3 og RSB tilbage til opbevaring.

Samling og denaturering af biblioteker

- 1 Hvis NL PCR-pladen har været opbevaret, skal den optøs til stuetemperatur, og derefter skal pladen centrifugeres ved 280 × g i 1 minut.

- 2 Brug en multikanalpipette indstillet til 30 µl til forsigtigt at blande bibliotekerne i NL PCR-pladen 5 gange ved pipettering.
Brug friske spidser til hvert bibliotek.

**FORSIGTIG**

Sørg for at blande bibliotekerne godt for at opnå optimal ydeevne.

- 3 Vælg én af de følgende muligheder for at samle, denaturere og fortynde bibliotekerne.
 - ▶ **Mulighed nr. 1:** Sekventer biblioteker afledt fra RNA-prøver og DNA-prøver på samme tid. Se *Mulighed nr. 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen på side 31.*
 - ▶ **Mulighed nr. 2:** Sekventer biblioteker afledt fra prøver, der udelukkende indeholder DNA. Se *Mulighed nr. 2: Biblioteker, der udelukkende indeholder DNA på side 32.*
 - ▶ **Mulighed nr. 3:** Sekventer biblioteker afledt fra prøver, der udelukkende indeholder RNA. Se *Mulighed #3: Biblioteker, der kun indeholder RNA på side 32.*

Mulighed nr. 1: DNA- og RNA-biblioteker sammen

- 1 Markér et mikrocentrifugerør PRL (Pooled RNA Libraries – Samlede RNA-biblioteker).
- 2 Markér et mikrocentrifugerør PDL (Pooled DNA Libraries – Samlede DNA-biblioteker).
- 3 Overfør 10 µl af hvert normaliserede RNA-bibliotek (cDNA) fra NL-pladen til PRL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
- 4 Overfør 10 µl af hvert normaliserede DNA-bibliotek fra NL-pladen til PDL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
- 5 Tilføj selvklæbende pladeforsegler til NL PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 6 Bland hvert PRL- og PDL-rør på vortexblander.
- 7 Centrifuger PRL- og PDL-rørene kortvarigt.
- 8 Inkuber PRL- og PDL-rørene i en varmeblok ved 96 °C i 2 minutter.
- 9 Placer PRL og PDL på is i 5 minutter.
- 10 Bland PRL- og PDL-rørene på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 11 Sæt PRL- og PDL-rørene tilbage på is.

Klargør første fortynding

- 1 Markér et 1,7 ml mikrocentrifugerør DIL1 (Dilution 1 – Fortynding 1).
- 2 Overfør 20 µl PDL til det tomme DIL1-rør.
- 3 Tilføj 5 µl PRL til DIL1.
- 4 Kassér PDL- og PRL-rørene.
- 5 Tilføj 475 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL1-røret (fortynding 1:20).
- 6 Bland DIL1-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Klargør anden fortynding

- 1 Markér et 2,0 mL mikrocentrifugerør DIL2 (Dilution 2 – Fortynding 2).
- 2 Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-rør.
- 3 Kassér DIL1-røret.
- 4 Tilføj 1660 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL2-røret (fortynding 1:850).
- 5 Bland den klargjorte 20 pM dPhiX på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 6 Tilføj 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX til DIL2-røret.
- 7 Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 8 Tilføj 1300 µl DIL2 til den optøede NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser)
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513).*
- 9 Kassér DIL2-røret.
- 10 Centrifuger NL PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut, og opbevar ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

- 11 Fortsæt til sekventering.
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)*.

Mulighed nr. 2: Biblioteker, der udelukkende indeholder DNA

- 1 Markér et mikrocentrifugerør PDL (Pooled DNA Libraries – Samlede DNA-biblioteker).
- 2 Overfør 10 µl af hvert normaliserede DNA-bibliotek fra NL-pladen til PDL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
- 3 Tilføj selvklæbende pladeforsegler til NL PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 4 Bland PDL-røret på vortexblander.
- 5 Centrifuger PDL-røret kortvarigt.
- 6 Inkuber PDL-røret i en varmekub ved 96 °C i 2 minutter.
- 7 Placer PDL på is i 5 minutter.
- 8 Bland PDL-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 9 Sæt PDL-røret tilbage på is.

Klargør første fortynding

- 1 Markér et 1,7 ml mikrocentrifugerør DIL1 (Dilution 1 – Fortynding 1).
- 2 Overfør 10 µl PDL til det tomme DIL1-rør.
- 3 Kassér PDL-røret.
- 4 Tilføj 190 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL1-røret (fortynding 1:20).
- 5 Bland DIL1 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Klargør anden fortynding

- 1 Markér et 2,0 mL mikrocentrifugerør DIL2 (Dilution 2 – Fortynding 2).
- 2 Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-rør.
- 3 Kassér DIL1-røret.
- 4 Tilføj 1660 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL2-røret (fortynding 1:850).
- 5 Bland den klargjorte 20 pM dPhiX på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 6 Tilføj 2,5 µl klargjort 20 pM dPhiX til DIL2-røret.
- 7 Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 8 Tilføj 1300 µl DIL2 til den optøede NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser).
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)*.
- 9 Kassér DIL2-røret.
- 10 Centrifuger NL PCR-pladen ved 280 x g i 1 minut, og opbevar derefter ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.
- 11 Fortsæt til sekventering.
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)*.

Mulighed #3: Biblioteker, der kun indeholder RNA

- 1 Markér et mikrocentrifugerør PRL (Pooled RNA Libraries – Samlede RNA-biblioteker).
- 2 Overfør 10 µl af hvert normaliserede RNA-bibliotek (cDNA) fra NL-pladen til PRL-røret.
To biblioteker med samme indeksprimer må ikke samles i en pulje.
- 3 Tilføj selvklæbende pladeforsegler til NL PCR-pladen.
Forsegl kanter og brønde fuldstændigt.
- 4 Bland PRL-røret på vortexblander.
- 5 Centrifuger PRL-røret kortvarigt.
- 6 Inkuber PRL-røret i en varmekub ved 96 °C i 2 minutter.
- 7 Placer PRL på is i 5 minutter.
- 8 Bland PRL-røret på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 9 Sæt PRL-røret tilbage på is.

Klargør første fortynding

- 1 Markér et 1,7 ml mikrocentrifugerør DIL1 (Dilution 1 – Fortynding 1).
- 2 Overfør 10 µl PRL til det tomme DIL1-rør.
- 3 Kassér PRL-røret.
- 4 Tilføj 190 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL1-røret (fortynding 1:20).
- 5 Bland DIL1 på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.

Klargør anden fortynding

- 1 Markér et 2,0 mL mikrocentrifugerør DIL2 (Dilution 2 – Fortynding 2).
- 2 Overfør 40 µl DIL1 til det tomme DIL2-rør.
- 3 Kassér DIL1-røret.
- 4 Tilføj 1646 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til DIL2-røret (fortynding 1:843).
- 5 Bland den klargjorte 20 pM dPhiX på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 6 Tilføj 16,7 µl klargjort 20 pM dPhiX til DIL2-røret.
- 7 Bland på vortexblander, og centrifuger derefter kortvarigt.
- 8 Tilføj 1300 µl DIL2 til den optøede NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklusser).
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)*.
- 9 Kassér DIL2-røret.
- 10 Centrifuger NL PCR-pladen ved 280 × g i 1 minut, og opbevar ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.
- 11 Fortsæt til sekventering.
Se *Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 100000009513)*.

Patenter og varemærker

Dette dokument og dets indhold er ophavsretligt beskyttet af Illumina, Inc. og dets datterselskaber ("Illumina") og er udelukkende beregnet til kundens kontraktmæssige brug i forbindelse med anvendelsen af det produkt eller de produkter, som er beskrevet heri, og til intet andet formål. Dette dokument og dets indhold må ikke bruges eller distribueres til noget andet formål og/eller på anden måde kommunikeres, offentliggøres eller reproduceres på nogen som helst måde uden forudgående skriftligt samtykke fra Illumina. Med dette dokument udsteder Illumina ingen licens under sit patent, varemærke, sin copyright eller sædvaneret eller lignende rettigheder for nogen tredjeparter.

Instruktionerne i dette dokument skal følges nøje og fuldstændigt af kvalificerede og behørigt uddannede medarbejdere for at sikre, at det produkt eller de produkter, der er beskrevet heri, anvendes korrekt og sikkert. Alt indhold i dette dokument skal læses grundigt og forstås inden brug af produktet/produkterne.

HVIS ALLE INSTRUKTIONERNE HERI IKKE GENNEMLÆSES FULDT UD OG FØLGES NØJE, KAN DET MEDFØRE SKADE PÅ PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE, SKADE PÅ PERSONER, HERUNDER BRUGERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANDEN EJENDOM OG VIL GØRE ENHVER GARANTI GÆLDENDE FOR PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE UGYLDIG.

ILLUMINA PÅTAGER SIG INTET ANSVAR SOM FØLGE AF FORKERT BRUG AF DET PRODUKT ELLER DE PRODUKTER, DER ER BESKREVET HERI (HERUNDER DELE HERAF ELLER SOFTWARE).

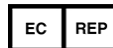
© 2022 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

Alle varemærker tilhører Illumina, Inc. eller de respektive ejere. Specifikke varemærkeoplysninger er tilgængelige på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktoplysninger



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (uden for Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Produktmærkning

Du kan finde en fyldestgørende forklaring til de symboler, der kan fremgå af produktemballagen og -mærkningen, i symbolforklaringen til det pågældende kit på support.illumina.com.