

TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

Katalognr. 20005718: 1–4 gangers bruk, opptil 96 biblioteker

Tiltenkt bruk

Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx er et sett med reagenser og forbruksmaterieell som brukes til å klargjøre prøvebiblioteker fra DNA ekstrahert fra perifert fullblod og formalinfiksert, parafininnstøpt vev (FFPE). Brukerleverte analyse-spesifikke reagenser er nødvendige for klargjøring av biblioteker rettet mot bestemte genomiske interesseområder. De genererte prøvebibliotekene er beregnet for bruk på Illumina High Throughput DNA-sekvensanalytatorer.

Prosedyreprinsipper

Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx skal manuelt klargjøre biblioteker for sekvensering av DNA fra perifere fullblodsprøver og formalinfiksert, parafininnstøpt vev (FFPE). Ved hjelp av reagensene i TruSeq Custom Amplicon Kit Dx behandles det genomiske DNA-et via klargjøringstrinnene for biblioteket, som spesifikt forsterker de tiltenkte genomiske områdene på hver prøve ved hjelp av analyttspesifikke oligonukleotider, mens det også tilføyer indekser og strømningsscelleinnfangingssekvenser til de forsterkede produktene. DNA fra fullblodsprøver følger kimbanearbeidsprosessen, mens DNA fra FFPE-vev følger den somatiske arbeidsprosessen. Resulterende prøvebiblioteker er klare til sekvensering på en Illumina High Throughput DNA-sekvensanalytator og analyse ved hjelp av instrumentprogrammeringsmoduler som samsvarer med arbeidsprosessene.

Alle reagenser følger med unntatt de analyttspesifikke oligonukleotidene som er brukerutformet.

Bibliotekklargjøring består av fire hovedtrinn: hybridisering, ekstensjonsligasjon, PCR-forsterkning og biblioteknormalisering.

Bibliotekklargjøring

- **Hybridisering** – Hybridiserer en sammenslåing av oppstrøms- og nedstrømsoligonukleotider som er spesifikke for interesseområdene for prøvegenomisk DNA. På slutten av denne prosessen vil en trettinns vaskeprosedyre med et filter som kan velge størrelse, fjerne ubundne oligonukleotider fra det genomiske DNA-et.
- **Ekstensjonsligasjon** – Forbinder de hybridiserte oppstrøms- og nedstrømsoligonukleotidene. En DNA-polymerase strekker seg fra oppstrømsoligonukleotider gjennom målregionen, fulgt av ligasjon til 5'-enden på nedstrømsoligonukleotiden med en DNA-ligase. Resultatet er dannelse av produkter som inneholder oligonukleotidene som er spesifikke for interesseområdene, flankert av sekvenser som kreves for forsterkning.
- **PCR-forsterkning** – Forsterker ekstensjonsligasjonsprodukter ved å bruke primere som legger til indekssekvenser til prøvemultipleksing og strømningsscelleinnfangingssekvenser som kreves for klyngegenerering på en Illumina-sekvenseringsenhet. På slutten av denne prosessen vil en PCR-rengjøringsprosedyre rense PCR-produktene (kalt et bibliotek).
- **Biblioteknormalisering** – Normaliserer kvantiteten i hvert bibliotek for å sørge for mer lik bibliotekrepresentasjon i det endelige sammenslåtte biblioteket. På slutten av denne prosessen lastes det sammenslåtte biblioteket på Illumina-sekvenseringsenheten for sekvensering ved hjelp av SBS-kjemi.

Prosedyremessige begrensninger

- 1 Til *in vitro*-diagnostisk bruk.
- 2 Indelinnhold (innsettinger, slettinger og kombinasjoner av disse) med en lengde på mer enn 25 bp innrettes ikke av analyseprogrammet. Derfor kan indeler med en lengde på mer enn 25 bp ikke påvises av analyseprogrammet.
- 3 Systemet er validert for påvisning av enkle nukleotidvarianter (SNV) og opptil 25 bp slettinger og 24 bp innsettinger når det brukes med moduler for kimlinje og somatisk variant. For somatisk betegnelse ved en variantfrekvens på 0,05 ble 25 bp slettinger og 18 bp innsettinger testet.
- 4 PCR-produktavlesninger med ekstremt variantinnhold kan kanskje ikke innrettes av analyseprogrammet, noe som resulterer i at området blir rapportert som villtype. Slikt ekstremt innhold omfatter:
 - Avlesninger som inneholder mer enn tre indeler
 - Avlesninger med lengde på minst 30 bp med SNV-innhold på mer enn 4 % av den totale PCR-produktmålengden (unntatt probeområder)
 - Avlesninger med lengde på mindre enn 30 bp med SNV-innhold på mer enn 10 % av den totale PCR-produktlengden (inkludert probeområder)
- 5 Store varianter (deriblant multinukleotidvarianter, store innsettinger, slettinger eller kombinasjoner av disse) kan rapporteres som separate mindre varianter i utdata-VCF.
- 6 Slettingsvarianter kan filtreres eller utelates når de spenner over to sidestilte PCR-produkter, dersom slettelegheten er større enn eller lik overlappingen mellom de sidestilte PCR-produktene.
- 7 Systemet kan ikke påvise innsettinger og slettinger hvis de oppstår rett ved siden av en primer og det ikke er noe overlappende PCR-produkt. For områder med overlappende PCR-produkter kan ikke analysen påvise slettinger når overlappingsområdet er mindre enn størrelsen på slettingen som skal påvises. Hvis for eksempel overlappingsområdet mellom to tilstøtende PCR-produkter er to (2) baser, kan analysen ikke påvise slettinger som inkluderer begge disse basene. En enkelt basesletting på én av disse basene kan påvises.
- 8 Som ved alle hybridiseringsbaserte arbeidsprosesser for bibliotekklargjøring kan underliggende polymorfismer eller mutasjoner, innsettinger eller slettinger i oligonukleotidbindende områder påvirke allelene som sonderes, og derfor også betegnelse som utføres under sekvensering. Eksempel:
 - En variant i fase med en variant i primerområdet kan ikke forsterkes, noe som resulterer i en falsk negativ.
 - Varianter i primerområdet kan forhindre forsterkningen av referanseallelen, noe som resulterer i feil homozygot variantbetegnelse.
 - Indelvarianter i primerområdet kan forårsake en falsk positiv betegnelse på slutten av avlesningen ved siden av primeren.
- 9 Indeler kan filtreres på grunn av strengeavvik hvis de forekommer nær enden av en avlesning og blir «soft-clipped» under innretting.
- 10 Små MNV-er er ikke validert.
- 11 Kopinummervarianter eller strukturvarianter, for eksempel fusjoner eller translokasjoner, er ikke validert.
- 12 Kimlinjespesifikke begrensninger:
 - Kimlinjevariantmodulen er utviklet for å levere kvalitative resultater for kimlinjevariantbetegnelser (f.eks. homozygot, heterozygot, villtype).
 - Ved bruk med kimlinjevariantmodulen er den minimale dekningen per PCR-produkt som er nødvendig for nøyaktig variantbetegnelse, 150x. Antall prøver og det totale antallet baser som er målrettet, påvirker dekningen. GC-innhold og annet genomisk innhold kan påvirke dekning.
 - Variasjon i kopinummer kan påvirke om en variant identifiseres som homozygot eller heterozygot.
 - Varianter i en viss gjentakende kontekst filtreres ut i VCF-filene. RMxN-gjentakelsesfilteret brukes til å filtrere varianter dersom hele eller deler av variantsekvensen er til stede gjentatte ganger i referansegenomet ved siden av variantposisjonen. For kimlinjevariantbetegnelse er det nødvendig med minst ni repetisjoner i referansen for at en variant skal filtreres, og bare gjentakelser med lengde på opptil 5 bp vurderes (R5x9).

13 Somatisk spesifikke begrensninger

- Den somatiske variantmodulen er utformet for å levere kvalitative resultater for somatisk variantbetegnelse (f.eks. tilstedeværelse av en somatisk variant med en variantfrekvens som er større enn eller lik 0,026 med en påvisningsgrense på 0,05).
- Ved bruk med den somatiske variantmodulen er den minimale dekningen per PCR-produkt som er nødvendig for nøyaktig variantbetegnelse, 450x per oligonukleotidsammenslåing. Antall prøver og det totale antallet baser som er målrettet, påvirker dekningen. GC-innhold og annet genomisk innhold kan påvirke dekning.
- Varianter i en viss gjentakende kontekst filtreres ut i VCF-filene. RMxN-gjentakelsesfilteret brukes til å filtrere varianter dersom hele eller deler av variantsekvensen er til stede gjentatte ganger i referansegenomet ved siden av variantposisjonen. For somatisk variantbetegnelse er det nødvendig med minst seks repetisjoner i referansen for at varianten skal filtreres, og bare gjentakelser med lengde på opptil 3 bp vurderes (R3x6).
- Den somatiske variantmodulen kan ikke skille mellom kimlinjevarianter og somatiske varianter. Modulen er utformet for å påvise varianter over en rekke variantfrekvenser, men variantfrekvens kan ikke brukes til å skille mellom somatiske varianter og kimlinjevarianter.
- Normalt vev i prøven påvirker påvisningen av varianter. Den rapporterte påvisningsgrensen er basert på en variantfrekvens i forhold til det totale DNA-et som ekstraheres fra både tumor og normalt vev.

Produktkomponenter

Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx består av:

- TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (katalognr. 20005718)

Reagenser

Reagenser som følger med

Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx er konfigurert for å behandle opptil 96 biblioteker i enkeltbruk (96 prøver for kimlinjearbeidsprosess og 40 prøver for somatisk arbeidsprosess [to biblioteker kreves per prøve]). Settet vil også støtte fire bibliotekklargjøringene med 24 biblioteker per bruk for kimlinjearbeidsprosessen og 20 biblioteker per bruk for den somatiske arbeidsprosessen.

Se følgende tabeller for en komplett liste over reagenser dette settet inneholder.

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, boks 1

Tabell 1 Boks 1A preforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Hybridiseringsbuffer	1 rør	4,32 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter og formamid	-25 °C til -15 °C
Ekstensjonsligasjonsblanding	1 rør	4,8 ml	Bufret vandig løsning som inneholder proprietær blanding av DNA-polymeraser, DNA-ligase og dNTP-er	-25 °C til -15 °C
Indeksprimere A (A501) – H (A508)	1 rør per primer	192 µl	PCR-primere med indekssekvenser og sekvenseringsadaptore	-25 °C til -15 °C
Indeksprimere 1 (A701) – 12 (A712)	1 rør per primer	128 µl	PCR-primere med indekssekvenser og sekvenseringsadaptore	-25 °C til -15 °C
PCR-polymerase	1 rør	56 µl	Proprietær DNA-polymerase	-25 °C til -15 °C
PCR-hovedblanding	1 rør	2,8 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter og dNTP-er	-25 °C til -15 °C

Tabell 2 Boks 1B postforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Biblioteknormaliseringsfortynner	1 rør	4,6 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-mercaptoetanol og formamid	-25 °C til -15 °C
Bibliotekfortynningsbuffer	1 rør	4,5 ml	Bufret vandig løsning	-25 °C til -15 °C
PhiX-internkontroll	1 rør	10 µl	Bufret vandig løsning som inneholder PhiX genomisk DNA	-25 °C til -15 °C

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, boks 2

Tabell 3 Preforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum	Innhold	Oppbevaring
Filterplate	4 plater	I/A	Mikrotiterplate av polypropylen med en modifisert polyetersulfonmembran	15 °C til 30 °C

Tabell 4 Postforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Elueringsbuffer	1 rør	4,8 ml	Bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C
Biblioteklagringsbuffer	1 rør	3,5 ml	Bufret vandig løsning	15 °C til 30 °C



MERK

Boks 2 inneholder preforsterknings- og postforsterkningsreagenser i en enkelt boks.

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, boks 3

Tabell 5 Boks 3A preforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
Stringent vaskebuffer	1 flaske	24 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-mercaptoetanol og formamid	2 °C til 8 °C
Universalvaskebuffer	1 rør	4,8 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter	2 °C til 8 °C

Tabell 6 Boks 3B postforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser	Oppbevaring
PCR-rengjøringskuler	1 rør	5 ml	Bufret vandig løsning som inneholder fast fase-paramagnetiske kuler og polyetylenglykol	2 °C til 8 °C
Vaskeløsning for biblioteknormalisering	2 rør	4,8 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter, 2-mercaptoetanol og formamid	2 °C til 8 °C
Bibliotekkulur	1 rør	1,2 ml	Bufret vandig løsning som inneholder fast fase-paramagnetiske kuler	2 °C til 8 °C

Reagenser som er påkrevd, men som ikke følger med

Tilpasset oligonukleotidsammenslåing

Analyttspesifikke oligonukleotider skal utvikles av brukeren og er ikke inkludert i bibliotekklargjøringssettet.

Figur 1 illustrerer det egendefinerte oligodesignprinsippet. Oligodesignet skal tilfredsstille følgende krav:

- Når det gjelder kimbanearbeidsprosessen skal et par egendefinerte oligonukleotider utformes for hvert PCR-produkt: én tilpasset probe 1 (oppstrøms lokusspesifikt oligonukleotid [ULSO]) og én tilpasset probe 2 (nedstrøms lokusspesifikt oligonukleotid [DLSO]).

- For somatisk arbeidsprosess skal to par tilpassede oligonukleotider utformes for hvert PCR-produkt. Hvert par består av én tilpasset probe 1 (oppstrøms lokusspesifikt oligonukleotid [ULSO]) og én tilpasset probe 2 (nedstrøms lokusspesifikt oligonukleotid [DLSO]). Det ene paret skal bruke plusstrengen som mål, mens det andre paret skal bruke minusstrengen som mål.
- Tilpassede oligonukleotider skal omslutte interesseområdet. Interesseområdet kan være mellom 150 og 250 bp for å gjøre det mulig med fullstendig sekvensering av fragmentet med en sekvenseringskjøring på 2 x 150-sykluser.
- Begge oligonukleotidene skal hybridiseres til den samme DNA-tråden.
- Tilpassede oligonukleotider skal inneholde Illumina-spesifikke adaptore for å gjøre det mulig å legge til indekser og sekvenseringsadaptore ved PCR.
 - Adapter 1 (5'-CAACGATCGTCGAAATTCGC-3') skal være plassert på 5'-enden av tilpasset probe 1 (ULSO).
 - Adapter 2 (5'-AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA-3') skal være plassert på 3'-enden av tilpasset probe 2 (DLSO).
- Tilpasset probe 2 (DLSO) er fosforylert ved 5'-enden for å støtte ligasjonstrinnet etter ekstensjon med tilpasset probe 1 (ULSO).

Figur 1 Oligodesign for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx



- Følgende designparametere for oligonukleotider anbefales:
 - Lengdeområde fra 22 til 30 nukleotider (genspesifikt område).
 - Total størrelse på PCR-produktet fra 190 til 290 basepar, inkludert adaptore for kimbanearbeidsprosess eller 160 til 250 basepar, inkludert adaptore for somatisk arbeidsprosess.
 - Anbefalt GC-innhold for primer kan variere fra 25 % til 70 %.
 - Anbefalt T_m-område fra 55 °C til 70 °C.
 - Oligonukleotidkonsentrasjonen skal være 15 nM per oligo i tilpasset sammenslåing.
 - Ingen ytterligere oligonukleotidrensing kreves etter syntese. Avsaltyng anbefales.
 - Oligonukleotider kan fortynnes i TE-buffere.
 - Antall PCR-produkter per prøve kan variere fra 16 til 384.
 - Oligonukleotider skal utformes slik at det blir liggende ekstra baser mellom primerenden og interesseområdet for å muliggjøre påvisning av innsetting og slettinger ved ytterkantene i interesseområdene (se punkt 7 i Prosedyremessige begrensninger på side 2).
 - Hvis overlapping er nødvendig for å dekke et helt interesseområde, skal området med overlapping i målområdet mellom bindingssteder for de tilstøtende probesettene være 1 bp større enn størrelsen på slettingen som skal påvises. For å aktivere påvisning av 3 bp-slettinger må for eksempel overlappingsområdet mellom tilstøtende probesett være >4 bp. Tilstøtende probesett skal utformes til alternerende tråder for å unngå interferens.

Se [Prosedyremessige begrensninger](#) for den minimale dekningen per PCR-produkt som trengs for variantbetegnelse. Antall prøver per kjøring skal beregnes basert på den minste dekningen som kreves av sekvenseringsinstrumentet, og dette vil avhenge av den totale lengden og dekningsoverensstemmelsen for tilpasset oligonukleotidsammenslåing(er).

En manifestfil skal opprettes for hver tilpasset oligonukleotidsammenslåing. Manifestet er en tekstfil som inneholder informasjon om målrettede genomiske områder, og det er nødvendig for at sekvenseren skal kunne kjøre analysen. Gå inn på Illuminas nettsted for å laste ned en mal for manifestfilen.

Preforsterkningsreagenser

- 10 N NaOH (klargjort fra tabletter, eller bruk en standardoppløsning)
- TE-buffer
- RNase/DNase-fritt vann

Postforsterkningsreagenser

- 10 N NaOH (klargjort fra tabletter, eller bruk en standardoppløsning)
- Etanol, 200 proof for molekylær biologi
- TE-buffer
- RNase/DNase-fritt vann

Oppbevaring og håndtering

- 1 Romtemperatur defineres som 15 °C til 30 °C.
- 2 Følgende reagenser blir levert i frossen tilstand og er stabile når de lagres ved –25 °C til –15 °C inntil den angitte utløpsdatoen.
 - Hybridiseringsbuffer
 - Ekstensjonsligasjonsblanding
 - Indeksprimere A (A501) – H (A508)
 - Indeksprimere 1 (A701) – 12 (A712)
 - PCR-polymerase
 - PCR-hovedblanding
 - Biblioteknormaliseringsfortynner
 - Bibliotekfortynningsbuffer
 - PhiX-internkontrollReagensene er stabile i maksimalt seks fryse/tine-sykluser som utføres før den angitte utløpsdatoen.
- 3 Følgende reagenser blir levert nedkjølte og er stabile når de oppbevares ved 2 °C til 8 °C inntil den angitte utløpsdatoen.
 - Stringent vaskebuffer
 - Universalvaskebuffer
 - PCR-rengjøringskuler
 - Bibliotekkulere
 - Vaskeløsning for biblioteknormalisering
- 4 Følgende reagenser blir levert ved omgivelsestemperatur og er stabile når de oppbevares ved romtemperatur inntil den angitte utløpsdatoen:
 - Elueringsbuffer
 - Filterplate
 - Biblioteklagringsbuffer
- 5 Endringer i de leverte reagensenes fysiske utseende kan indikere nedbryting av materialene. Hvis det forekommer endringer i det fysiske utseendet (for eksempel åpenbare endringer i reagensfarge eller uklarhet sammen med mikrobiell kontaminasjon), skal ikke reagensene brukes.
- 6 Hybridiseringsbuffer-, stringent vaskebuffer- og biblioteknormaliseringsfortynnerreagenser kan danne synlig bunnfall eller krystaller. Før de brukes, skal de roteres kraftig og deretter kontrolleres visuelt for å kontrollere at det ikke er bunnfall til stede.
- 7 Følg denne beste praksisen når du håndterer PCR-rengjøringskuler og bibliotekkulere:
 - Kulene skal aldri fryses.
 - La kulene nå romtemperatur.
 - Umiddelbart før bruk skal kulene roteres til de er godt suspendert og fargen er homogen.

- Bland prøven grundig etter at kulene er tilsatt ved å pipettere opp og ned ti ganger. En ryster kan brukes til grundig blanding av prøver.
 - Inkuber kule/prøve-blandingen ved romtemperatur i hele den angitte tiden.
 - Følg instruksjonene når du bruker magnetstativet. Vent til oppløsningen er klar før du aspirerer. La platen ligge på magnetstativet mens supernatanten aspireres langsomt, og vær nøye med ikke å bevege de atskilte kulene.
- 8 PCR-forsterkningsplaten kan forbli på termosyklusen over natten, eller den kan oppbevares ved angitte betingelser. Forsegl platen godt før oppbevaring.
 - 2 °C til 8 °C i opptil to dager
 - -25 °C til -15 °C i opptil én uke
 - 9 Ikke frys bibliotekkulene, og ikke bland dem med biblioteknormaliseringsfortynnerreagenset hvis de ikke skal brukes umiddelbart.
 - 10 Den ferdige biblioteknormaliseringsplaten (LNP) kan oppbevares ved 2 °C til 8 °C i opptil tre timer, eller ved -25 °C til -15 °C i opptil én uke.
 - 11 Oppbevaringsplaten (SGP) kan oppbevares ved -25 °C til -15 °C i opptil 48 timer.
 - 12 Det fortynnede ampliconbiblioteket (DAL) kan oppbevares ved -25 °C til -15 °C i opptil 84 dager.
 - 13 Last fortynnet amplicomsammenslåing på reagenskassetten umiddelbart etter denaturering.

Utstyr og materiell

Utstyr og materialer som følger med, selges separat

- 1 En Illumina High Throughput DNA-sekvensanalysator og tilhørende sekvenseringsmateriell
- 2 **TruSeq Index Plate Fixture Kit**, katalognr. FC-130-1005
- 3 **TruSeq Index Plate Fixture & Collar Kit**, katalognr. FC-130-1007
- 4 **Utskiftingshetter for indeksadapter**, katalognr. DX-502-1003
- 5 TruSeq Custom Amplicon Kit Dx – FFPE QC, katalognr. 20006259 (for somatisk arbeidsprosess)

Utstyr og materiell som er påkrevd, men som ikke følger med

Utstyr og materiell til preforsterkning

- 1 **Varmeblokk** – Én varmeblokk for 96-brønners plate er påkrevd. Varmeblokken skal oppfylle følgende spesifikasjoner.
 - Oppvarmet lokk
 - Temperaturområde: Omgivelse +5 °C til 99 °C
 - Temperaturregulering: ± 0,1 °C ved 37 °C, ± 0,4 °C ved 60 °C
- 2 **Prøveinkubator** – Én inkubator (hybridiseringsovn) er påkrevd. Inkubatoren skal oppfylle følgende spesifikasjoner.
 - Temperaturområde: 10 °C til 100 °C
 - Temperaturregulering: ± 0,2 °C
- 3 **Bordsentrifuge** – Én bordsentrifuge (en separat sentrifuge kreves i preforsterkningsområdet i laboratoriet). Sentrifugen skal oppfylle følgende spesifikasjoner.
 - Kan opprettholde 20 °C
 - Passer til en 96-brønners plate med filterenhet
 - Godtar 5 ml rør
 - Oppnår hastigheter på 280 til 2400 x g
- 4 **Varmeforseglende enhet** – Anbefales til hybridiseringer over natten for å forhindre fordampning ved 40 °C inkubasjon.
- 5 **Presisjonsdråpetellere** – Ett sett med presisjonsdråpetellere er påkrevd. (Et separat sett er påkrevd i postforsterkningsområdet i laboratoriet.) Bruk av presisjonsdråpetellere sikrer nøyaktig reagens- og

prøvetilførsel. Dråpetellere med enkel kanal eller flere kanaler kan brukes hvis de blir kalibrert regelmessig og er nøyaktige innen 5 % av oppgitt volum.

- 6 **Forbruksmaterieill** – Følgende forbruksmaterieill er påkrevd.
 - 96-brønners PCR-plater med kant, 0,2 ml, polypropylen eller tilsvarende
 - 96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)
 - Oppløsningsbeholder, PVC, DNase, RNase-fri (kar)
 - Klebende aluminiumsfolieforsegling (tåler et temperaturområde på inkl. 95 °C) eller forseglinger som er kompatible med en varmeforseglende enhet
 - Forsegling kompatibel med PCR-termosykler
 - Aerosolresistente dråpetellerspisser

Utstyr og materieill til postforsterkning

- 1 **Termosykler** – Én termosykler er påkrevd. Termosykleren skal ha et oppvarmet lokk og oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner:
 - Temperaturkontrollområde: 4 °C til 99 °C
 - Kontrollnøyaktighet: $\pm 0,25$ °C fra 35 °C til 99 °C
- 2 **Mikroplateryster** – Én mikroplateryster er påkrevd i bibliotekets postforsterkningsområde. Platerysteren skal oppfylle følgende ytelsesspesifikasjoner:
 - Maks. blandeastighet: 3000 o/min
 - Blandeastighetsområde: 200 til 3000 o/min
- 3 **Bordsentrifuge** – Én bordsentrifuge kreves (en separat sentrifuge kreves i preforsterkningsområdet i laboratoriet). Sentrifugen skal oppfylle følgende spesifikasjoner.
 - Kan opprettholde 20 °C
 - Passer til en 96-brønners MIDI-plate
 - Godtar 5 ml rør
 - Oppnår hastigheter på 280 til 2400 x g
- 4 **Varmeblokk** – Én varmeblokk for 1,5 ml til 2 ml rør er påkrevd. Varmeblokken skal oppfylle følgende spesifikasjoner.
 - Temperaturområde: Omgivelse +5 °C til 99 °C
 - Temperaturregulering: $\pm 0,1$ °C ved 37 °C, $\pm 0,4$ °C ved 60 °C
- 5 **Magnetstativ** – Ett magnetstativ for 96-brønners plate er påkrevd. Bedre ytelse oppnås når magnetene er på siden av stativet og ikke på bunnen.
- 6 **Presisjonsdråpetellere** – Ett sett med presisjonsdråpetellere er påkrevd. (Et separat sett er påkrevd i preforsterkningsområdet i laboratoriet.) Bruk av presisjonsdråpetellere er påkrevd for å sikre nøyaktig reagens- og prøvetilførsel. Dråpetellere med enkel kanal eller flere kanaler kan brukes hvis de blir kalibrert regelmessig og er nøyaktige innen 5 % av oppgitt volum.
- 7 **Gelelektroforesematerieill** – Gelelektroforesematerieill og apparat er nødvendig sammen med en egnet fargemetode for å visualisere PCR-produktene i gelen.
- 8 **Forbruksmaterieill** – Følgende forbruksmaterieill er påkrevd.
 - 96-brønners PCR-plater med kant, 0,2 ml, polypropylen eller tilsvarende
 - 96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)



MERK

Sørg for at 96-brønners platen er kompatibel med magnetstativet.

- 2–4 % TBE-agarosegel
- 100 bp DNA-molekylvektmarkør
- Fargestoff for DNA-lasting
- Kjegleformede rør, 15 ml
- Eppendorf-mikrosentrifugerør (skrukork anbefales)
- Åtterørs PCR-strimler

- Oppløsningsbeholdere, PVC, DNase, RNase-frie (kar)
- Klebende aluminiumsfolieforseglinger
- Microseal® 'B' (Bio-Rad) eller tilsvarende
- Aerosolresistente dråpetellerspisser

Prøvetaking, transport og oppbevaring

Kimbanearbeidsprosess

Følgende betingelser skal oppfylles ved håndtering av blod og DNA ekstrahert fra blodet.



FORSIKTIG

Alle blodprøver skal håndteres som om det finnes en smittefare for HIV, HBV og andre blodbårne patogener.

- 1 Fullblodsprøver tatt i K₂EDTA-rør kan brukes.
- 2 Fullblodsprøver skal oppbevares i maks. sju dager ved romtemperatur, opptil 30 dager ved 2 °C til 8 °C eller opptil 30 dager hvis de er frosset ved –25 °C til –15 °C.
- 3 Fullblod skal transporteres i maks. sju dager i romtemperatur, 30 dager ved 2 °C til 8 °C eller 30 dager hvis de er frosset ved –25 °C til –15 °C. Transport av fullblod skal overholde statlige og lokale retningslinjer for transport av etologiske midler.
- 4 Frosne genomiske DNA-prøver er stabile i seks fryse-/tinesykluser.



MERK

Det ble ikke observert ugunstig virkning på settets ytelse med fullblodsprøver når forhøyet bilirubin, kolesterol, hemoglobin, triglyserider eller EDTA var til stede.

DNA-ekstraksjon (kimbanearbeidsprosess)

Hvilken som helst validert DNA-ekstraksjonsmetode kan brukes.

Somatisk arbeidsprosess

Følgende betingelser skal oppfylles ved håndtering av tumorvev og DNA ekstrahert fra vevet.

- 1 Tumorvev skal være formalinfiksert og parafininnstøpt.
- 2 Ekstrahert genomisk DNA skal oppbevares mellom 2 °C og 8 °C i maks. 28 dager eller oppbevares i frossen tilstand mellom –25 °C til –15 °C i maks. 161 dager.
- 3 Frosne genomiske DNA-prøver er stabile i to fryse-/tinesykluser.



MERK

Det ble ikke observert ugunstig virkning på settets ytelse med FFPE-vev når deparafiniseringsoppløsning, parafin voks, xylen, etanol, proteinase K, vaskeløsninger, hemoglobin eller nekrotisk vev var til stede.

DNA-ekstraksjon (somatisk arbeidsprosess)

Illumina anbefaler kolonnebaserte DNA-ekstraksjonssett ved bruk av dobbel mengde proteinase K, proteinase K-inkubasjoner med omrøring over natten og endelige elusjoner et volum på minst 30 µl. Kulebaserte ekstraksjonsmetoder og metoder som bare bruker lysering av ubehandlede celleekstrakter, anbefales ikke til bruk med disse reagensene.

Advarsler og forholdsregler



FORSIKTIG

Føderal lov begrenser denne enheten til salg av, eller på bestilling av, en lege eller annet fagpersonell, lovmessig lisensiert i staten vedkommende praktiserer, for å bruke eller pålegge bruk av enheten.



ADVARSEL

Dette reagenssettet inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk som er egnet ved risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Hvis du ønsker ytterligere informasjon om helse, miljø og sikkerhet, kan du se mer på support.illumina.com/sds.html.

- 1 Alle blodprøver skal håndteres som om det finnes en smittefare med humant immunsviktvirus (HIV), humant hepatitt B-virus (HBV) og andre blodbårne patogener (universale forholdsregler).
- 2 Hvis du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i prøve kvaliteten.
- 3 Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i utpekte arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakker når du håndterer prøver og settreagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og settreagensene.
- 4 Ikke bruk settkomponenter utover deres oppgitte utløpsdato på etiketten på settets eske. Ikke bytt om settkomponenter fra ulike settpartier. Vær oppmerksom på at settpartier er identifisert på etiketten på settets eske.
- 5 Oppbevar settkomponentene ved angitt temperatur i utpekte preforsterknings- og postforsterkningsområder.
- 6 Unngå gjentatte fryse/tine-sykluser for reagensene. Se *Prosedyremessige merknader* for antall ganger settet kan brukes.
- 7 For å hindre nedbrytning av prøver eller reagens må det kontrolleres at all natriumhypoklorittdamp er fullstendig oppløst før protokollen startes.
- 8 God laboratoriepraksis og god laboratoriehigiene er påkrevd for å hindre at PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumentering og genomiske DNA-prøver. PCR-kontaminasjon kan medføre unøyaktige og upålitelige resultater.
- 9 For å hindre kontaminasjon må du kontrollere at preforsterknings- og postforsterkningsområdene har sitt eget utstyr (som dråpetellere, dråpetellerspisser, roterer og sentrifuge).
- 10 Unngå krysskontaminasjon. Bruk nye dråpetellerspisser mellom prøvene og mellom dispensering av reagenser. Bland prøver med en dråpeteller, og sentrifuger platen når dette angis. Ikke roter platene. Bruk av aerosolresistente spisser reduserer risikoen for carryover av amplicon og krysskontaminasjon fra prøve til prøve.
- 11 Indeks-prøvesammenkobling må være i nøyaktig samsvar med trykt plateoppsett. Local Run Manager fyller automatisk ut indeksprimerne som er tilknyttet prøvenavnene, når de er angitt i modulen. Brukeren anbefales å verifisere indeksprimerne som er tilknyttet prøvene før sekvenseringskjøringen startes. Misforhold mellom prøvearket og plateoppsettet resulterer i tap av positiv prøveidentifikasjon og uriktig resultatrapportering.
- 12 Klargjør alltid ny 80 % etanol for vasketrinnene. Etanol kan absorbere vann fra luften, noe som påvirker resultatene.
- 13 Sørg for at all etanol blir fjernet fra bunnen av brønnene under vasketrinnene. Rester av etanol kan påvirke resultatene.
- 14 Følg de angitte tørketidene etter magnetstativtrinnet for å sikre fullstendig fordamping. Rester av etanol kan påvirke ytelsen til påfølgende reaksjoner.
- 15 Ikke bland tilpasset oligonukleotidsammenslåing og hybridiseringsbuffer ved oppbevaring. Når de kombineres, blir tilpasset oligosammenslåing ustabil, selv ved oppbevaring i frosset tilstand.
- 16 Bruk av termosyklere med aktiv avkjøling (f.eks. Peltier, termoelektrisk avkjølt) anbefales ikke for hybridiseringstrinnet. Det passive nedkjølingstrinnet er kritisk for riktig hybridisering.
- 17 Tilsett alltid PCR-polymerase til PCR-hovedblandingen like før bruk. Kombinert arbeidsoppløsning skal aldri oppbevares.
- 18 Under biblioteknormaliseringstrinnet er det ekstremt viktig å resuspendere bibliotekkulpelletten fullstendig. Dette er avgjørende for å oppnå konsekvent klyngetetthet på den sekvenserende strømningscellen.
- 19 Følg de oppgitte inkubasjonstidene i biblioteknormaliseringstrinnet. Feil inkubasjon kan påvirke bibliotekrepresentasjonen og klyngetettheten.

- 20 På grunn av antall plateoverføringer og derved mulighet for kontaminasjon, skal du være ekstremt forsiktig for å sikre at brønninnholdet forblir fullt ut i brønnen. Innholdet skal ikke sprute.

Akronymer

Tabell 7 Akronymer for Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx

Akronym	Definisjon
AMP	AMplification Plate (Forsterkningsplate) (bibliotek)
CLP	CLean-up Plate (Rengjøringsplate)
COP	Custom Oligonucleotide Pool (Tilpasset oligonukleotids sammenslåing)
DAL	Diluted Amplicon Library (Fortynnet amplikonbibliotek)
FPU	Filter Plate Unit (Filterplateenhet)
HYB	HYBridization Plate (Hybridiseringsplate)
LNP	Library Normalization Plate (Biblioteknormaliseringsplate)
NTC	Negative Template Control (Negativ malkontroll)
PAL	Pooled Amplicon Library (Sammenslått amplikonbibliotek)
POS	POsitive Control (Positiv kontroll)
SGP	StoraGe Plate (Oppbevaringsplate)

Prosedyremessige merknader

- 1 Settet kan brukes opptil fire ganger hvis færre enn 96 biblioteker må behandles. Med fire bruk støtter kimlinjearbeidsprosessen 24 biblioteker per bruk, og den somatiske arbeidsprosessen støtter 20 biblioteker per bruk hvis pipetteringsteknikkene beskrevet i [bruksanvisningen](#) blir fulgt.
- 2 Illumina krever at én positiv kontroll-DNA-prøve og en negativ kontroll (NTC eller kontroll uten mal) er inkludert for hver bruk, som defineres som et sett med prøver som behandles parallelt. Den positive kontroll-DNA-prøven skal være en godt karakterisert prøve med en kjent variasjon i interesseområdet.
- 3 Før du starter med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx-protokollen, må DNA-et ekstraheres og kvantifiseres.
- 4 Når det gjelder kimlinjearbeidsprosessen, kvantifiseres DNA ved hjelp av et spektrofotometer. Verifiser at A260/A280 for DNA-prøven er > 1,5. Normaliser DNA-prøven til 5 ng/µl. Hver prøve krever 10 µl genomisk DNA (totalt 50 ng).
- 5 Anbefalingen av 50 ng DNA-innmatning for kimlinjearbeidsprosessen gjør det mulig med DNA-kvantitetsvariasjon, og bibliotekytelse og sekvenseringsytelse drives av dette innmatingsnivået.
- 6 For den somatiske arbeidsprosessen må DNA-et kvalifiseres ved hjelp av Illumina TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC. Bibliotekytelse og sekvenseringsytelse avhenger av prøve kvalitet, som målt med FFPE QC-metoden.

Prøvegjennomløp

For Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kan bibliotekets gjennomløp for en sekvenseringskjøring være fra 1 til 96 biblioteker på MiSeqDx og 8 til

96 biblioteker på NextSeq 550Dx. Den somatiske arbeidsprosessen krever minst to biblioteker for en prøve.

Indekseringsprimerne som brukes under PCR-forsterkningen må være valgt på grunnlag av ønsket endelig prøvegjennomløp for å sikre at hvert bibliotek bruker en unik indeksskombinasjon.

Indeksprimersekvenser

Tabell 8 Sekvenser for indeksprimere A (A501) – H (A508)

Indeksprimer	Sekvens
Indeksprimer A (A501)	TGAACCTT
Indeksprimer B (A502)	TGCTAAGT
Indeksprimer C (A503)	TGTTCTCT
Indeksprimer D (A504)	TAAGACAC
Indeksprimer E (A505)	CTAATCGA
Indeksprimer F (A506)	CTAGAACA
Indeksprimer G (A507)	TAAGTCC
Indeksprimer H (A508)	TAGACCTA



MERK

På NextSeq™ 550Dx leses indeksprimere A501–A508 som revers-komplement. Revers-komplement-sekvensene skal brukes ved vurdering av kravene for indeksmangfold for tokenals sekvenseringskjemi.

Tabell 9 Sekvenser for indeksprimere 1 (A701) – 12 (A712)

Indeksprimer	Sekvens
Indeksprimer 1 (A701)	ATCACGAC
Indeksprimer 2 (A702)	ACAGTGGT
Indeksprimer 3 (A703)	CAGATCCA
Indeksprimer 4 (A704)	ACAAACGG
Indeksprimer 5 (A705)	ACCCAGCA
Indeksprimer 6 (A706)	AACCCCTC
Indeksprimer 7 (A707)	CCCAACCT
Indeksprimer 8 (A708)	CACCACAC
Indeksprimer 9 (A709)	GAAACCCA
Indeksprimer 10 (A710)	TGTGACCA
Indeksprimer 11 (A711)	AGGGTCAA
Indeksprimere 12 (A712)	AGGAGTGG

Bruksanvisning

Prøveoppsett

Før bibliotekklargjøring blir utført, blir en sekvenseringskjøring opprettet med Local Run Manager, som er programvaren på sekvenseringsinstrumentet. Kjøringen fylles med prøver, og manifestfilen blir valgt. Det resulterende prøveoppsettet blir skrevet ut eller eksportert til en fil som skal brukes som referanse når bibliotekene blir klargjort fra prøvene. Du finner detaljerte instruksjoner i den modulspesifikke referanseveiledningen som følger med det aktuelle arbeidsprosess- og sekvenseringsinstrumentet. Prøver kan legges inn manuelt eller importeres i henhold til instruksjonene i referanseveiledningen.

Instruksjoner om kimbanearbeidsprosess kontra somatisk arbeidsprosess

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx skal manuelt klargjøre biblioteker for sekvensering av DNA fra perifere fullblodsprøver og formalinfiksert og parafininnstøpt vev (FFPE). Ved hjelp av reagensene i TruSeq Custom Amplicon Kit Dx behandles det genomiske DNA-et via klargjøringstrinnene for biblioteket, som spesifikt forsterker de tiltenkte genomiske områdene på hver prøve ved hjelp av analyttspesifikke oligonukleotider, mens det også tilfører indekser og strømningsselleinngangssekvenser til de forsterkede produktene. DNA fra fullblod følger kimbanearbeidsprosessen, mens DNA fra FFPE-vev følger den somatiske arbeidsprosessen.

Resulterende prøvebiblioteker er klare til sekvensering på en Illumina høykapasitets DNA-sekvensanalysator og analysering ved hjelp av instrumentprogrammeringsmoduler (kimbane eller somatisk) som svarer til arbeidsprosessene.



MERK

Dette er angitt i det aktuelle trinnet i [bruksanvisningen](#), der det er forskjeller i instruksjonene ved bruk av kimbanearbeidsprosess kontra somatisk arbeidsprosess. Disse forskjellene er oppsummert i [Tabell 10](#).

Tabell 10 Forskjeller mellom arbeidsprosessene for å analysere kimbanevarianter kontra somatiske varianter

Trinn	Parameter	Kimbanearbeidsprosess	Somatisk arbeidsprosess
Preanalytisk	Prøvetype	DNA fra fullblod	DNA fra FFPE-vev
Preanalytisk	DNA-innmating	50 ng	Basert på ΔCq
Preanalytisk	Prøvekvaitetskontrollmetode	A260	TSCA Dx – FFPE QC
Hybridisering av oligonukleotidsammenslåing	Hybridiseringsmetode	Enkelstreng	Dobbelstreng
Hybridisering av oligonukleotidsammenslåing	Antall oligonukleotidsammenslåinger	1	2
PCR-forsterkning	Volum for indeksprimere	4 µl	9 µl
PCR-forsterkning	Volum for indekserende PCR-reaksjon [HM4]	50 µl	60 µl
PCR-forsterkning	PCR-sykluser	28	32
Verifisere bibliotekklargjøring	Bibliotekytelse	Valgfri evaluering med gel (CLP-produkter)	Evaluert med gel (AMP-produkter)
PCR-rengjøring	Volum for PCR-rengjøringskuler	45 µl	55 µl

Hybridisering av oligonukleotids sammenslåing (preforsterkning)

Klargjøring

- 1 La analyttspesifikke oligosammenslåing(er), hybridiseringsbuffer, genomiske DNA-prøver og positiv kontrollprøve nå romtemperatur.
- 2 Roter tilpasset oligosammenslåing(er) og hybridiseringsbuffer kraftig for å sikre at alt bunnfall er fullstendig oppløst, og deretter sentrifugeres rørene med oligosammenslåing et øyeblikk for å samle væske. Sørg for at det ikke er noe bunnfall synlig i hybridiseringsbufferen.
- 3 Still inn en 96-brønners varmeblokk på 95 °C.
- 4 Forvarm en inkubator til 37 °C.
- 5 Opprett prøveplaten i henhold til det trykte plateoppsettet fra Local Run Manager.

Prosedyre

- 1 Sett ut en ny 96-brønners PCR-plate (heretter kalt **HYB**-platen).
- 2 Velg én av følgende arbeidsprosesser (kimbane eller somatisk) basert på varianttypene du har som mål.
 - **Kimbanearbeidsprosess:**
 - Tilsett 10 µl prøve eller kontroll til 5 ng/µl (50 ng totalt) i de aktuelle brønnene i **HYB**-platen i henhold til plateoppsettet.
 - **Somatisk arbeidsprosess:**
 - Tilsett 10 µl prøve eller kontroll fortynt i samsvar med TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC. Prøver eller kontroller tilsettes platen i to brønner for hybridisering til begge oligonukleotids sammenslåingene i henhold til plateoppsettet.
- 3 Velg én av følgende arbeidsprosesser (kimbane eller somatisk) basert på varianttypene du har som mål.
 - **Kimbanearbeidsprosess:**
 - Tilsett 10 µl 1X TE-buffer i brønnen med kontroll uten mal (NTC). Følg det genererte plateoppsettet for riktig brønnvalg.
 - **Somatisk arbeidsprosess:**
 - Tilsett 10 µl 1X TE-buffer i brønnene med kontroll uten mal (NTC) (2). Følg det genererte plateoppsettet for riktig brønnvalg.
- 4 Velg én av følgende arbeidsprosesser (kimbane eller somatisk) basert på varianttypene du har som mål.
 - **Kimbanearbeidsprosess:**
 - Tilsett 5 µl tilpasset oligonukleotids sammenslåing i alle brønner som inneholder genomisk DNA og NTC i henhold til plateoppsettet.
 - **Somatisk arbeidsprosess:**
 - Tilsett 5 µl tilpasset oligonukleotids sammenslåing A i brønner som inneholder genomisk DNA og NTC i henhold til plateoppsettet.
 - Tilsett 5 µl tilpasset oligonukleotids sammenslåing B i brønner som inneholder genomisk DNA og NTC i henhold til plateoppsettet.

Brønner som mottar hver sammenslåing, er gjensidig eksklusive.
- 5 Tilsett 40 µl hybridiseringsbuffer i hver prøve og NTC i **HYB**-platen. Pipetter forsiktig opp og ned 3–5 ganger for å blande.
- 6 Forsegl **HYB**-platen, og sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.

**FORSIKTIG**

For å begrense mulig fordamping under hybridiseringsreaksjonen er det sterkt anbefalt å bruke en varmetafseglende enhet til forsegling av **HYB**-platen ved hybridiseringer over natten. Hvis en varmetafseglende enhet ikke er tilgjengelig, må **HYB**-platen forsegles med en klebende aluminiumsfolieforsegling og festes godt med en forseglingsvalse eller kile. Fortsett til neste trinn når temperaturen når 40 °C.

- 7 Legg **HYB**-platen på den forhåndsoppvarmede blokken med 96 brønner ved 95 °C, lukk lokket, og inkuber i 1 minutt.

- 8 Reduser varmeblokkinnstillingen til 40 °C, og fortsett å inkubere til varmeblokken når 40 °C (ca. 80 minutter). Gradvis avkjøling er avgjørende for riktig hybridisering. PCR-termsyklere med aktiv avkjøling (f.eks. Peltier, termoelektrisk avkjølt) anbefales derfor ikke for denne prosessen.



SIKKERT STOPPEPUNKT

Når varmeblokken har nådd 40 °C, er **HYB**-platen stabil ved 40 °C i opptil 18 timer. Før den fjernes fra varmeblokken, må folieforseglingen forsterkes med en forseglingsvalse eller kile.

Fjerning av ubundne oligonukleotider

Klargjøring

- 1 La ekstensjonsligasjonsblanding, stringent vaskebuffer og universalvaskebuffer nå romtemperatur, og roter deretter et øyeblikk.
- 2 Sett sammen filterplateenheten (heretter kalt **FPU**) i denne rekkefølgen fra topp til bunn: lokk, filterplate, adapterkrage og MIDI-plate.
- 3 Forvask filterplatemembranen slik:
 - a Tilsett 50 µl stringent vaskebuffer i hver prøve- og NTC-brønn.
 - b Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.



MERK

Kontroller at alle brønner i filterplaten dreneres helt. Hvis vaskebufferen ikke dreneres helt, sentrifugerer du på nytt ved 2400 × g ved 20 °C til all væsken har gått gjennom (ytterligere 5–10 minutter).



FORSIKTIG

Det er avgjørende å styre sentrifugetemperaturen under vasketrinnene. Hvis temperaturen når 25 °C eller høyere, kan den høyere temperaturen føre til høyere stringens i primerbinding. Hvis prøver har SNV-er i primerbindingsregionene, kan den høyere stringensen i sjeldne tilfeller føre til allelutfall.

Prosedyre

- 1 Fjern **HYB**-platen fra varmeblokken, og sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 2 Overfør hele volumet (ca. 55 µl) for hver prøve til de tilsvarende brønnene i filterplaten.
- 3 Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.
- 4 Vask filterplaten slik:
 - a Tilsett 50 µl stringent vaskebuffer i hver prøve- og NTC-brønn.
 - b Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.



MERK

Kontroller at alle brønner i filterplaten dreneres helt. Hvis vaskebufferen ikke dreneres helt, sentrifugerer du på nytt ved 2400 × g ved 20 °C til all væsken har gått gjennom (ytterligere 5–10 minutter).

- 5 Gjenta vaskingen som beskrevet i tidligere trinn.
- 6 Kast alt som flyter gjennom (som inneholder formamid), og monter deretter **FPU** på nytt.
- 7 Tilsett 45 µl universalvaskebuffer i hver prøve- og NTC-brønn på **FPU**.
- 8 Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.



MERK

Kontroller at alle brønner i filterplaten dreneres helt. Hvis vaskebufferen ikke dreneres helt, sentrifugerer du på nytt ved 2400 × g ved 20 °C til all væsken har gått gjennom (ytterligere 5–10 minutter).

Ekstensjonsligasjon av bundne oligonukleotider

Prosedyre

- 1 Tilsett 45 µl ekstensjonsligasjonsblanding i hver prøve- og NTC-brønn på filterplaten.
- 2 Forsegl filterplaten med klebende aluminiumsfolie, og dekk deretter til med lokket.
- 3 Inkuber **FPU** i den forhåndsoppvarmede inkubatorovnen ved 37 °C i 45 minutter uten rotasjon.
- 4 Mens **FPU** inkuberer, klargjøres **AMP** (forsterkningsplaten) som beskrevet i følgende avsnitt.

PCR-forsterkning

Klargjøring

- 1 Klargjør ny 0,05 N NaOH.
- 2 Bestem hvilke indeksprimere som skal brukes i henhold til det trykte plateoppsettet fra Local Run Manager.
- 3 La PCR-hovedblandingen og de aktuelle indeksprimerne nå romtemperatur. Roter hvert tinte rør for å blande, og foreta deretter en rask sentrifugering av rørene for å samle væsken.
- 4 Sett ut en ny 96-brønners PCR-plate (heretter kalt **AMP**-platen).
- 5 Tilsett indeksprimere i **AMP**-platen basert på arbeidsprosessen:
 - **Kimbanearbeidsprosess:**
 - Tilsett 4 µl av de valgte indeksprimerne [A (A501) – H (A508)] i den aktuelle brønnen i en kolonne i **AMP**-platen.
 - Kast de opprinnelige hvite hettene, og sett på nye hvite hetter.
 - Tilsett 4 µl av de valgte indeksprimerne [1 (A701) – 12 (A712)] i den aktuelle raden i **AMP**-platen. *Spissene skal byttes etter hver rad for å unngå indeks-krysskontaminasjon.*
 - Kast de opprinnelige oransje hettene, og sett på nye oransje hetter.
 - **Somatisk arbeidsprosess:**
 - Tilsett 9 µl av de valgte indeksprimerne [A (A501) – H (A508)] i den aktuelle brønnen i en kolonne i **AMP**-platen.
 - Kast de opprinnelige hvite hettene, og sett på nye hvite hetter.
 - Tilsett 9 µl av de valgte indeksprimerne [1 (A701) – 12 (A712)] i den aktuelle raden i **AMP**-platen. *Spissene skal byttes etter hver rad for å unngå indeks-krysskontaminasjon.*
 - Kast de opprinnelige oransje hettene, og sett på nye oransje hetter.
- 6 Klargjør PCR-hovedblandingen/PCR-polymerase PCR-arbeidsoppløsningen på følgende måte:
 - a For 96 biblioteker tilsettes 56 µl PCR-polymerase i 2,8 ml PCR-hovedblanding. Forholdet mellom PCR-hovedblanding og PCR-polymerase inkluderer allerede dødvolum.
 - b Snu den klargjorte PCR-arbeidsoppløsningen 20 ganger for å blande.
 - c PCR-arbeidsoppløsningen er stabil ved romtemperatur i 10 minutter.

Prosedyre

- 1 Fjern **FPU** fra inkubatoren.
- 2 Fjern aluminiumsfolieforseglingen. Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 2 minutter.
- 3 Tilsett 25 µl 0,05 N NaOH i hver prøve og NTC-brønn i filterplaten. Pipetter NaOH opp og ned 5–6 ganger.
- 4 Dekk til og inkuber filterplaten ved romtemperatur i fem minutter for å eluere bibliotekene.
- 5 Mens filterplaten inkuberes, overføres 22 µl PCR-arbeidsoppløsning i hver brønn i **AMP**-platen som inneholder indeksprimere.
- 6 Overfør prøver som er eluert fra filteret til **AMP**-platen slik:
 - a Pass på at du ikke perforerer filtermembranen. Pipetter prøvene forsiktig opp og ned 5–6 ganger ved hjelp av et P20-dråpetellersett satt til 20 µl.
 - b Overfør 20 µl fra filterplaten til tilsvarende brønner i **AMP**-platen.
 - c Pipetter forsiktig opp og ned 5–6 ganger for grundig å kombinere DNA med PCR-arbeidsoppløsningen.
 - d Overfør gjenværende reaksjonsbrønner fra filterplaten til **AMP**-platen på samme måte. *Spissene skal byttes etter hver overføring for å unngå krysskontaminasjon av indeks og prøve.*
- 7 Forsegl **AMP**-platen, og sikre den med en valse eller kile.
- 8 Sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 9 Overfør **AMP**-platen til postforsterkningsområdet.

10 Utfør PCR basert på arbeidsprosessen ved hjelp av følgende termosyklusprogram med det oppvarmede lokket på:

– **Kimbanearbeidsprosess:**

– 95 °C i tre minutter

Deretter 28 sykluser:

– 95 °C i 30 sekunder

– 66 °C i 30 sekunder

– 72 °C i 60 sekunder

– 72°C i fem minutter

– Holdes på 10 °C

– **Somatisk arbeidsprosess:**

– 95 °C i tre minutter

Deretter 32 sykluser:

– 95 °C i 30 sekunder

– 66 °C i 30 sekunder

– 72 °C i 60 sekunder

– 72 °C i fem minutter

– Holdes på 10 °C



SIKKERT STOPPEPUNKT

Hvis du ikke fortsetter umiddelbart til PCR-rengjøring, kan AMP-platen bli på termosykluseren over natten, oppbevares ved 2 °C til 8 °C i opptil 48 timer, eller oppbevares ved –25 °C til –15°C i opptil én uke.

Verifisere bibliotekklargjøring

Prosedyre

Verifiser bibliotekklargjøringen ved å utføre følgende trinn.

Kimbanearbeidsprosess:

Det er ingen verifisering av bibliotekklargjøring i kimbanearbeidsprosessen.

Somatisk arbeidsprosess:

- 1 Kombiner 5 µl forsterket produkt med 15 µl vann og DNA-fargestoff om nødvendig.
- 2 Bruk en TBE-agarosegel på 2–4 % med 50–100 bp-stige for å bekrefte tilstedeværelse og lysstyrke for bibliotekproduktet (produktstørrelsen er panelavhengig).
 - Prøver som viser forsterkning i én oligosammenslåing eller begge oligosammenslåinger, anses som gyldige og kan behandles gjennom resten av arbeidsprosessen.
 - Prøver som viser liten til ingen forsterkning i én oligosammenslåing eller begge oligosammenslåinger, anses som ugyldige og skal ikke behandles gjennom resten av arbeidsprosessen.
 - Hvis et ugyldig gelresultat blir observert, må bibliotekklargjøringen for denne prøven eller prøvene gjentas fra og med *hybridisering av oligonukleotidsammenslåing (preforsterkning)*.
 - Hvis det ikke observeres bånd på gelen for den gjentatte kjøringen, må prøve kvaliteten eller oligopaneldesignen kontrolleres.
 - Hvis en blank NTC-prøve viser forsterkning i oligosammenslåing A og/eller B, indikerer dette kontaminasjon.

PCR-rengjøring

Klargjøring

- 1 La PCR-rengjøringskulene nå romtemperatur.
- 2 Klargjør ny 80 % etanol fra absolutt etanol.

Prosedyre

- 1 Sentrifuger **AMP**-platen ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 2 Sett ut en ny MIDI-plate (heretter kalt **CLP**-platen).
- 3 Snu PCR-rengjøringskulene ti ganger. Roter kraftig, og snu deretter ytterligere ti ganger. Kontroller oppløsningen visuelt for å sikre at kulene er resuspendert.



MERK

PCR-rengjøringskuler er ekstremt viskøse, så vær ekstra forsiktig ved pipettering. For å unngå for stort reagenstap skal kulevolumene aspireres og dispenserers sakte. Se at alle kuler er dispensert fra dråpetellerspissene før spissutløsning. Aspirer riktig volum, og dispenser uten å blande dråpetellere eller fukte dråpetellerspissene på forhånd.

- 4 Tilsett PCR-rengjøringskuler i **CLP**-platen i følgende trinn, avhengig av arbeidsprosessen:

- **Kimbanearbeidsprosess:**

- Tilsett 45 µl PCR-rengjøringskuler i hver brønn i **CLP**-platen.
- Overfør hele PCR-produktet fra **AMP**-platen til **CLP**-platen (ca. 50 µl).

- **Somatisk arbeidsprosess:**

- Tilsett 55 µl PCR-rengjøringskuler i hver brønn i **CLP**-platen.
- Overfør hele PCR-produktet fra **AMP**-platen til **CLP**-platen (ca. 60 µl).

- 5 Forsegle **CLP**-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 6 Inkuberes ved romtemperatur uten resting i 10 minutter.
- 7 Sett platen på et magnetstativ i minst to minutter eller til supernatanten er klar.
- 8 Mens **CLP**-platen står på magnetstativet, fjernes supernatanten forsiktig og kastes.
- 9 Mens **CLP**-platen står på magnetstativet, vaskes kulene slik:
 - a Tilsett 200 µl nyttilberedt 80 % etanol i hver prøvebrønn.
 - b Inkuber platen på et magnetstativ i minst 30 sekunder eller til supernatanten er klar.
 - c Fjern supernatanten forsiktig, og kast den.
- 10 Gjenta vaskingen som beskrevet i tidligere trinn.
- 11 Bruk et P20 flerkanalsdråpetellersett satt på 20 µl til å fjerne overflødig etanol.
- 12 Ta **CLP**-platen ut av magnetstativet, og lufttørk kulene i fem minutter.
- 13 Tilsett 30 µl elueringsbuffer forsiktig til kulene, og foreta en kort rotering.



MERK

Elueringsbuffer er viskøs og krever langsom aspirasjon og dispensering av volumene.

- 14 Forsegl **CLP**-platen med Microseal 'B' og en valse eller kile, og rist den deretter på en mikroplateryster ved 1800 o/min i fem minutter. Etter restingen må du kontrollere at prøvene ble resuspendert. Hvis en kulepellet fortsatt er synlig i enkelte brønner, må du bruke en P200-dråpetellersett innstilt på 30 µl for å resuspendere hver enkelt kulepellet. Kontroller spissene visuelt for å kontrollere at kulene blir dispensert tilbake i brønnene før spissene utløses. Forsegl **CLP**-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i ytterligere fem minutter.
- 15 Inkuberes ved romtemperatur i to minutter.
- 16 Sett **CLP**-platen på et magnetstativ i minst to minutter eller til supernatanten er klar.
- 17 Sett ut en ny MIDI-plate (heretter kalt **LNP**-platen).
- 18 Overfør 20 µl av supernatanten fra **CLP**-platen til **LNP**-platen.
- 19 Overfør 20 µl av supernatanten forsiktig fra **CLP**-platen til **LNP**-platen.
- 20 Forsegl **LNP**-platen med en klebende plateforsegling, og sentrifuger den deretter med 1000 × g ved 20 °C i ett minutt for å sørge for at all supernatant befinner seg på bunnen i brønnen.
- 21 [Valgfritt] Overfør gjenværende 10 µl av supernatanten fra **CLP**-platen til en ny plate, og merk platen med et kjøringsnavn og dato. Oppbevar denne platen ved –25 °C til –15 °C til sekvenseringskjøringen og dataanalysen er ferdig.
De rengjorte PCR-produktene kan brukes til feilsøking hvis det oppstår prøvefeil.

**SIKKERT STOPPEPUNKT**

Hvis den stopper på dette punktet, forsegles **LNP**-platen og sentrifugeres ved $1000 \times g$ ved $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 1 minutt. Platen er stabil i opptil tre timer ved $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ eller $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i opptil én uke.

Biblioteknormalisering**Klargjøring**

- 1 Klargjør ny 0,1 N NaOH.
- 2 La biblioteknormaliseringsfortynner, bibliotekkuler og vaskeløsning for biblioteknormalisering nå romtemperatur.
- 3 Fjern biblioteklagringsbuffer fra romtemperaturlagring, og sett den til side.
- 4 Roter biblioteknormaliseringsfortynner kraftig, og kontroller at alt bunnfall er oppløst.
- 5 Roter bibliotekkuler kraftig i ett minutt med vekselvis vending til kulene er resuspendert og ingen pellet finnes på bunnen av røret når røret er vendt opp ned.

Prosedyre

- 1 Bland biblioteknormaliseringsfortynning og bibliotekkuler i et nytt 15 ml kjegleformet rør (bruk et nytt 1,5 ml rør ved behandling av < 24 prøver) slik:
 - a For 96 prøver tilsettes 4,4 ml biblioteknormaliseringsfortynning.
 - b Resuspend bibliotekkuler: Roter bibliotekkuler kraftig i ett minutt med vekselvis vending. Bruk et P1000-sett til $1000\text{ }\mu\text{l}$ for å resuspendere bibliotekkulene helt ved sakte å pipettere opp og ned minst 10 ganger til det ikke er noe pellet igjen når røret snus.

**FORSIKTIG**

Det er viktig at bibliotekkulpeleter på bunnen av røret blir fullstendig resuspendert. Bruk av en P1000 sikrer at kulene blir homogent resuspendert og at det ikke finnes kulemasse på bunnen av røret. Resuspenderingen av kulene er avgjørende for å oppnå konsekvent klyngetetthet på strømningscellen.

**FORSIKTIG**

Bibliotekkuler er ekstremt viskøse, så vær ekstra forsiktig ved pipettering. For å unngå for stort reagenstap skal kulevolumene aspireres og dispenseres sakte. Se at alle kuler er dispensert fra dråpetellerspissene før spissutløsning.

- c For 96 biblioteker pipetteres $800\text{ }\mu\text{l}$ bibliotekkuler i røret som inneholder biblioteknormaliseringsfortynning. For færre biblioteker er forholdet $7,2\text{ }\mu\text{l}$ bibliotekkuler til $37,8\text{ }\mu\text{l}$ biblioteknormaliseringsfortynning per bibliotek. Inkluder dødvolume for pipetteringsfeil.
 - d Bland ved å snu røret 15–20 ganger.
- 2 Tilsett $45\text{ }\mu\text{l}$ av den kombinerte arbeidsoppløsningen av biblioteknormaliseringsfortynning/bibliotekkuler i hver brønn i **LNP**-platen som inneholder biblioteker.
- 3 Forsegl **LNP**-platen med Microseal 'B' og en valse eller kile, og rist den deretter på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 30 minutter.

**MERK**

Hvis sekvensering skal utføres samme dag, er det lurt å begynne å tine reagenskassetten nå. Følg instruksjonene i gjeldende pakningsvedlegg for instrumentet ved tining av reagenskassetten.

- 4 Sett platen på et magnetstativ i minst to minutter eller til supernatanten er klar.
- 5 Mens **LNP**-platen står på magnetstativet, skal forseglingen fjernes. Fjern deretter supernatanten forsiktig, og kast den.
- 6 Fjern **LNP**-platen fra magnetstativet, og vask kulene med vaskeløsning for biblioteknormalisering på følgende måte:
 - a Tilsett $45\text{ }\mu\text{l}$ vaskeløsning for biblioteknormalisering til kulene i **LNP**-platen.
 - b Forsegl **LNP**-platen med Microseal 'B' og en valse eller kile, og rist den deretter på en mikroplateryster ved 1800 o/min i fem minutter.
 - c Sett **LNP**-platen på et magnetstativ i minst to minutter eller til supernatanten er klar.
 - d Fjern og kast all supernatant.
- 7 Gjenta prosedyren for vaskeløsning for biblioteknormalisering som beskrevet i tidligere trinn.

- 8 Forsegle LNP-platen med en klebende plateforsegling.
- 9 Sentrifuger LNP-platen ved $1000 \times g$ ved $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 30 sekunder for å samle opp overflødig vaskebuffer.
- 10 Sett LNP-platen på magnetstativet i to minutter.
- 11 Bruk et P20 flerkanalsdråpetellersett satt til $20\text{ }\mu\text{l}$ til forsiktig å fjerne overflødig vaskeløsning for biblioteknormalisering. Ikke forstyr kulene.
- 12 Fjern LNP-platen fra magnetstativet, og tilsett $30\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{ N NaOH}$ i hver brønn.
- 13 Forsegl LNP-platen med Microseal 'B' og en valse eller kile, og rist den deretter på en mikroplateryster ved 1800 o/min i fem minutter.
- 14 I løpet av elueringen på 5 minutter settes en ny 96-brønners PCR-plate ut (heretter kalt SGP-platen).
- 15 Tilsett $30\text{ }\mu\text{l}$ biblioteklagringsbuffer i hver brønn som skal brukes i SGP-platen.
- 16 Etter elueringen på fem minutter må du kontrollere at alle kulene i LNP-platen er resuspendert. Hvis kulene ikke er fullstendig resuspendert, skal disse brønnene pipetteres forsiktig opp og ned. Bank eventuelt platen forsiktig mot benken for å resuspendere kulene, og rist deretter i ytterligere fem minutter.
- 17 Sett LNP-platen på magnetstativet i minst to minutter.
- 18 Overfør supernatanten (ca. $30\text{ }\mu\text{l}$) sakte fra LNP-platen til SGP-platen. Pipetter forsiktig opp og ned fem ganger for å blande. Bruk nye spisser for hver overføring.
- 19 Forsegle SGP-platen, og sentrifuger deretter ved $1000 \times g$ ved $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 1 minutt. Fortsett umiddelbart med [biblioteksammenslåing](#). Kast LNP-platen.

Klargjøre for biblioteksekvensering

Klargjøring

- 1 Still inn en varmeklokk som rommer $1,5\text{ ml}$ sentrifugerør, på $96\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 2 Klargjør et isbad i en isbøtte.
- 3 Fjern bibliotekfortynningsbufferen og PhiX-internkontroll fra oppbevaringsstedet som holder $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, og tin dem.
- 4 Når de er tint, kan du kjøle bibliotekfortynningsbufferen og PhiX-internkontrollen i isvannet.
- 5 Roter bibliotekfortynningsbufferen, sentrifuger et øyeblikk, og kontroller at alt bunnfall er fullstendig oppløst.

Denaturere og fortynne PhiX-internkontroll

PhiX-internkontroll leveres ved 10 nM , og må denatureres til enkeltstreng DNA og fortynnes til 20 pM før bruk. Følgende instruksjoner gir 1 ml denaturert 20 pM PhiX-internkontroll, som er nok til flere DAL-er (> 20).

- 1 Klargjør $0,1\text{ N NaOH}$.
- 2 Snu røret flere ganger for å blande.



FORSIKTIG

Det er avgjørende å bruke nyfortynnet NaOH for fullstendig å denaturere prøver for klyngegenerering på sekvenseren.



TIPS

Hvis PhiX klargjøres samme dag som biblioteknormalisering, kan samme stamløsning av $0,1\text{ N NaOH}$ brukes.

- 3 Kombiner følgende volumer for å fortynne PhiX-internkontrollbiblioteket til 2 nM :
 - $2\text{ }\mu\text{l}$ 10 nM PhiX-internkontrollbibliotek
 - $8\text{ }\mu\text{l}$ 1 X TE -buffer
- 4 Kombiner følgende volumer for å få et PhiX-internkontrollbibliotek på 1 nM :
 - $10\text{ }\mu\text{l}$ 2 nM PhiX-internkontrollbibliotek
 - $10\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{ N NaOH}$
- 5 Roter et øyeblikk slik at PhiX-internkontrollbiblioteksløsningen på 1 nM blandes.
- 6 Sentrifuger 1 nM PhiX-internkontrollbiblioteksløsningen for å samle innholdet.
- 7 Inkuber i fem minutter ved romtemperatur for å denaturere PhiX-internkontrollbiblioteksløsningen til enkle DNA-strenger.

- Tilsett 980 µl forhåndskjølt bibliotekfortynningsbuffer i røret som inneholder denaturert PhiX-internkontrollbibliotek. Den endelige konsentrasjonen er 20 pM denaturert PhiX-internkontrollbibliotek.

**TIPS**

Det denaturerte PhiX-internkontrollbiblioteket på 20 pM kan oppbevares i opptil tre uker ved -25°C til -15°C som alikvoter for engangsbruk.

Biblioteksammenslåing

- Roter bibliotekfortynningsbufferen, og kontroller at alt bunnfall er fullstendig oppløst.
- Sentrifuger et øyeblikk for å samle innhold.
- Sett ut et nytt rør med skrukork (heretter kalt **PAL-rør** [Pooled Amplicon Library] (Sammensatt PCR-produktbibliotek)).
- Bestem hvilke prøver som skal grupperes for sekvensering. Maksimalt 96 biblioteker kan grupperes for sekvensering.
- Fjern forseglingen fra **SGP**-platen. Overfør 10 µl av hvert bibliotek som skal sekvenseres fra **SGP**-platen til en PCR 8-rørstrimmel, og bytt spisser hver gang.
- Forsegl **SGP**-platen med en klebende plateforsegling, og oppbevar ved -25°C til -15°C i opptil 48 timer.

**TIPS**

SGP-platen kan brukes til å slå sammen færre prøver når innledende sekvenseringsdekning er utilstrekkelig.

- Kombiner og overfør innholdet i strimmelen med PCR 8-rørstrimmelen til **PAL**-røret. Bland **PAL**-røret grundig.
- Sett ut tre nye rør med skrukork (heretter kalt **DAL-rør** [Diluted Amplicon Library] (Fortynnet PCR-produktbibliotek)).
- Tilsett 585 µl bibliotekfortynningsbuffer i **DAL**-rørene.
- Overfør 5 µl denaturert PhiX (20 pM) til hvert **DAL**-rør som inneholder bibliotekfortynningsbuffer. Pipetter opp og ned 3–5 ganger for å skylle spissen og for å sikre at overføringen er fullstendig.
- Overfør 10 µl **PAL** til hvert **DAL**-rør. Pipetter opp og ned 3–5 ganger for å skylle spissen og for å sikre at overføringen er fullstendig.
- Roter **DAL**-rørene et øyeblikk, og sentrifuger **DAL**-rørene et øyeblikk for å samle væske.

**TIPS**

Avhengig av bruken av settet kan det være nødvendig med ekstra bibliotekfortynningsbuffer fra et sett med Illumina-sekvenseringsmaterieell for det aktuelle sekvenseringsinstrumentet.

**SIKKERT STOPPEPUNKT**

Hvis sekvensering ikke skal utføres umiddelbart, kan **DAL**-rørene oppbevares ved -25°C til -15°C i opptil 84 dager.

Klargjøre for sekvensering ved hjelp av MiSeqDx

- Fortsett med ett **DAL**-rør for sekvensering.
- Hvis **DAL**-røret ble lagret frosset, må det tine helt.
- Bland **DAL**-røret ved å rotere røret med maksimal hastighet.
- Sentrifuger **DAL**-røret et øyeblikk.
- Inkuber **DAL**-røret på en varmeblokk ved 96°C i 2 minutter.
- Etter inkubasjonen snus **DAL**-røret 1–2 ganger for blanding før det umiddelbart settes i isvann.
- La **DAL**-røret stå i isvann i fem minutter.

**FORSIKTIG**

Utfør varmedenatureringstrinnet umiddelbart før innlasting av **DAL**-røret i en reagenskasset for å sikre effektiv malinnlasting på sekvenseringsstrømningscellen.

Se pakningsvedlegget til *MiSeqDx-instrumentet* for å klargjøre reagenskassetten, laste inn prøvebibliotekene på reagenskassetten og sette opp sekvenseringskjøringen.

Klargjøre for sekvensering ved hjelp av NextSeq 550Dx

- 1 Fortsett med ett **DAL**-rør for sekvensering.
- 2 Sett ut et nytt rør med skrukork (heretter kalt **FDT**-rør [Final Dilution Tube] (Endelig fortynningsrør)).
- 3 Hvis **DAL**-røret ble lagret frosset, må det tine helt.
- 4 Bland **DAL**-røret ved å rotere røret med maksimal hastighet.
- 5 Sentrifuger **DAL**-røret et øyeblikk.
- 6 Overfør en aliquot fra **DAL** til **FDT**. **DAL**-volumet som trengs for å oppnå riktig klyngetetthet, er avhengig av oligosammenslåingen som brukes, og varierer vanligvis i området 130–160 µl.
- 7 Klargjør **FDT** med et totalt volum på 1300 µl med bibliotekfortynningsbuffer.
- 8 Bland **FDT**-røret ved å rotere røret med maksimal hastighet.
- 9 Sentrifuger **FDT**-røret et øyeblikk.
- 10 Inkuber **FDT**-røret på en varmeblokk ved 96 °C i to minutter.
- 11 Etter inkubasjonen snus **FDT**-røret 1–2 ganger for blanding før det umiddelbart settes i isvann.
- 12 La **FDT**-røret stå i isvann i fem minutter.



FORSIKTIG

Utfør varmedenatureringstrinnet umiddelbart før innlasting av **FDT**-røret i en reagenskasset for å sikre effektiv malinnlasting på sekvenseringsstrømningscellen.

Se pakningsvedlegget til *NextSeq 550Dx-instrumentet* for å klargjøre reagenskassetten, laste inn prøvebibliotekene på reagenskassetten og sette opp sekvenseringskjøringen.

Kvalitetskontrollprosedyrer

God laboratoriepraksis krever at en positiv kontroll-DNA-prøve og en negativ kontrollprøve (uten mal) er inkludert i hver bibliotekklargjøring. Den positive kontroll-DNA-prøven skal være en godt karakterisert prøve med kjente varianter i interesseområdet.

For den somatiske arbeidsprosessen undersøkes alle biblioteker (inkludert biblioteker for kontrollene) med gelelektroforese som tidligere beskrevet.

Ytelseskarakteristikk

Kimlinjestudier brukte enten MiSeqDx™ Universal Kit 1.0 (DNA-ekstraksjon og forstyrrende stoffer) eller TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (DNA-innmating) for bibliotekklargjøring. De to settene bruker identiske reagenser og har bare én arbeidsprosessforskjell: antall sykluser med polymerasekjedereaksjoner (PCR) (henholdsvis 28 og 32). De økte PCR-syklusene tillater lavere DNA-innmating med TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 ng) sammenlignet med MiSeqDx Universal Kit 1.0 (250 ng), som vist i DNA-innmatingstudien ved hjelp av TruSeq Custom Amplicon Kit Dx. Hver studie spesifiserer reagensene for bibliotekklargjøring og sekvenseringsmaterieell som brukes, men alle studier gjenspeiler ytelseskarakteristikkene for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx på grunn av ekvivalensen med Universal Kit 1.0.

Somatiske studier brukte TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Biblioteker klargjort med MiSeqDx Universal Kit 1.0 brukte sekvenseringsmaterieell fra Illumina versjon 1 som avlesning for ytelse, mens TruSeq Custom Amplicon Kit Dx brukte sekvenseringsmaterieell fra versjon 3 som avlesning. Sekvensering ble utført på MiSeqDx-instrumenter. Studier som brukte paneler med to gener eller ett gen som representative mutasjonspaneler, brukte analysespesifikke arbeidsprosesser og analysemoduler.

Definisjoner av beregninger for ytelseskarakteristikk

- 1 Positivt prosentamsvar (PPA) beregnes som andelen av loki klassifisert som varianter ved hjelp av en referansemetode som er korrekt rapportert av analysen.
 - (antall variantloki korrekt rapportert av analysen) / (totalt antall variantloki)
 Variantloki rapportert av analysen som samsvarer med referansemetoden, er sant positive (TP). Variantloki

- rapportert som referansebetegnelser eller som forskjellige variantbetegnelser av analysen, er falskt negative (FN).
- 2 Negativt prosentsamsvar (NPA) beregnes som andelen av loki klassifisert som villtype ved hjelp av en referansemetode som er korrekt rapportert av analysen.
 - $(\text{Antall villtypeloki korrekt rapportert av analysen}) / (\text{totalt antall villtypeloki})$
Villtypeloki rapportert av analysen som samsvarer med referansemetoden, er sant negative (TN). Villtypeloki rapportert som varianter av analysen, er falskt positive (FP).
 - 3 Samlet prosentsamsvar (OPA) beregnes som andelen loki som er korrekt rapportert av analysen i forhold til en referansemetode.
 - $((\text{antall variantloki korrekt rapportert av analysen}) + (\text{antall villtypeloki korrekt rapportert av analysen})) / ((\text{totalt antall variantloki}) + (\text{totalt antall villtypeloki}))$
 - 4 Beregningene av PPA, NPA og OPA inkluderer ikke noen betegnelser (variant- eller referanseloki som ikke oppfyller ett eller flere kvalitetsfiltre). To studier inneholder spesifikt ikke noen betegnelser i målinger av «% korrekte betegnelser», og denne inkluderingen av ingen betegnelser er angitt for de aktuelle tabellene.
 - 5 Betegnelserfrekvens er beregnet som det totale antallet lokipasserende filtre som deles på totalt antall posisjoner som er sekvensert eller rapporterbare. Denne målingen vurderer ikke samsvaret av betegnelser med referansemetoden.

Carryover av prøver

Både kimbanearbeidsprosesser og somatiske arbeidsprosesser omfatter bibliotekklargjøring og sekvensering av flere prøver pluss kontroller som alle behandles samtidig. Studien om carryover av prøver ble utført for å evaluere om falskt positive resultater grunnet carryover fra brønn til brønn-kontaminasjon ved bibliotekklargjøring eller fra kjøring til kjøring-kontaminasjon mellom etterfølgende sekvenseringskjøringer, hadde innvirkning på testresultatene. Somatiske varianter ble brukt fordi de kan påvises ved lavere allelfrekvenser enn kimbanevarianter.

Prøvene besto av fire genomiske DNA-prøver fra cellelinjer, der hver av dem inneholdt ulike panelmutasjoner i et panel med to gener. Prøvene var slik at en mutasjon med en posisjon i det ene panelet, hadde en referansesekvens (villtype) i det andre.

Carryover fra brønn til brønn er definert som en feilmodus som potensielt oppstår under manuelle behandlingstrinn (pipettering, forveksling av prøver, osv.). For å evaluere carryover fra en prøvebrønn til en annen ble det utført to testkjøringer:

- Et sjakkbrettmønstret oppsett av en prøve med høy innmating av genomisk DNA som inneholdt en mutasjon i gen 1, vekslende med en prøve med lav innmating av genomisk DNA som inneholdt en mutant i gen 2.
- Et sjakkbrettmønstret oppsett av en prøve med høy innmating av genomisk DNA som inneholdt en mutasjon i gen 2, vekslende med en prøve med lav innmating av genomisk DNA som inneholdt en mutasjon i gen 1.

I hver kjøring ble totalt 12 replikater evaluert for falskt positive resultater (f.eks. ble en gen 1-mutasjon rapportert i en brønn betegnet som en gen 2-mutantprøve eller omvendt).

Carryover fra kjøring til kjøring defineres som en feilmodus som potensielt er opprettet basert på rester fra en tidligere sekvenseringskjøring. For å avgjøre om det er carryover mellom sekvenseringskjøringene ble to plater som hver inneholdt 11 replikater av en enkelt unik prøve med høy innmating av genomisk DNA pluss en blank prøve, klargjort og sekvensert etter hverandre på et MiSeqDx-instrument og evaluert for falskt positive resultater. Den første kjøringen inneholdt 11 replikater av en gen 2-mutantprøve pluss én blank. Den andre kjøringen inneholdt 11 replikater av en gen 1-mutantprøve pluss én blank. Gen 2-mutantprøvebiblioteket ble sekvensert først etterfulgt av en påfølgende sekvenseringskjøring med gen 1-mutantprøvebiblioteket, etterfulgt av en annen gjentatt sekvenseringskjøring av gen 2-mutantprøvebibliotekene. Hvis en gen 2-mutasjon observeres i en kjøring kun med gen 1-mutant eller omvendt, vil denne observasjonen indikere carryover.

Null falske positive (0/24, 0 %) pga. carryover fra *brønn til brønn*, ble rapportert. Alle forventede mutasjoner ble påvist. Null falske positive (0/24, 0 %) pga. carryover fra *kjøring til kjøring*, ble rapportert. Alle forventede mutasjoner ble påvist. Null falske positive (0/48, 0 %) pga. *total* carryover (carryover fra brønn til brønn og kjøring til kjøring), ble rapportert.

Ytelseskarakteristikk for kimbane

DNA-innmatingsstudien brukte et panel med 23 kromosomer som det representative mutasjonspanelet. De andre studiene brukte et panel med ett gen som det representative mutasjonspanelet.

DNA-ekstraksjon

Tre ulike ekstraksjonsmetoder (magnetkuleekstraksjon, alkoholutfelling og kvartfilter-kolonneisolasjon) ble evaluert med K₂EDTA antikoagulert fullblod. Bibliotekklargjøringen ble fullført ved hjelp av MiSeqDx Universal Kit 1.0. Fjorten (14) unike blodprøver ble brukt i studien som representerer en rekke genotyper fra et enkelt genpanel. De tre DNA-ekstraksjonsmetodene ble testet uavhengig av to ulike operatører som hver utførte tre sekvenseringskjøringer per ekstraksjonsmetode. Hver ekstraksjon ble utført av hver operatør på ulike dager. DNA-konsentrasjonen og A260/A280-forholdet i de ekstraherte gDNA-prøvene ble bestemt med spektrofotometri. Den totale prøvestørrelsen for hver ekstraksjonsmetode i denne studien var 168 (14 prøver x 2 operatører/ekstraksjonsmetode x 3 kjøringer/operatør x 2 replikater / ekstrahert gDNA-prøve). Resultatene for hver metode er angitt i [Tabell 11](#).

Tabell 11 Nøyaktighet, betegnelsesfrekvens og prøvens første gjennomgangshastighet med ekstraksjonsmetode

Ekstraksjonsmetode	Antall prøver som ble testet	Betegnelsesfrekvens	Nøyaktighet ¹	Prøvens første gjennomgangshastighet ²
Alkoholutfelling	168	100 %	100 %	100 %
Kvartfilter-kolonneisolasjon	168	100 %	100 %	100 %
Magnetkuleekstraksjon	168	100 %	100 %	100 %

¹Nøyaktighet – prosentsvaret med en referansetestmetode (toveis sekvensering med Sanger) beregnet for baseposisjonene som mottar en basebetegnelse.

²Prøvens første gjennomgangshastighet – antallet prøver som oppfyller den angitte betegnelseshastigheten første gang de behandles (dvs. uten behov for ny kjøring eller ekstra behandling) som en prosentverdi av det totale antallet prøver kjørt i et enkelt MiSeqDx-sekvenseringseksperiment.

DNA-innmating

DNA-innmatingsområdet for bibliotekklargjøring (TruSeq Custom Amplicon Kit Dx) ble evaluert ved å utføre en seriell fortynningsstudie med 13 DNA-prøver og en representativ analyse utformet for å utforske ulike gener som dekker 12 588 baser på mer enn 23 ulike kromosomer. MiSeqDx Reagent Kit v3 ble brukt som sekvenseringsavlesning.

Hver prøve ble testet i duplikat på 5 DNA-innmatingsnivåer fra 250 ng til 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng og 12 ng). For å bestemme nøyaktighet ble prøvegenotyper sammenlignet med Platinum Genomes-versjon 2016-01. Resultatene ble bestemt for hvert innmatingsnivå. PPA for hver varianttype (slettinger, innsetninger og SNV-er) er angitt i [Tabell 12](#), mens NPA er angitt i [Tabell 13](#). Alle innmatingsnivåer hadde lignende nøyaktighet. Anbefalt DNA-innmating er 50 ng med 25 ng og 100 ng som en nedre og øvre grense for å oppfylle nøyaktighetskravet.

Tabell 12 PPA-resultater for hver DNA-innmating etter varianttype

DNA-innmating (ng)	Varianttype	Forventede varianter	TP totalt	FN totalt	Variant Ingen betegnelser	PPA (%)
12	Sletting	552	534	3	15	99,4
25			541	0	11	100
50			542	0	10	100
100			542	0	10	100
250			542	0	10	100
12	Innsetting	588	569	0	19	100
25			572	0	16	100
50			572	0	16	100
100			572	0	16	100
250			572	0	16	100
12	SNV	1752	1725	2	25	99,9
25			1739	3	10	99,8
50			1742	0	10	100
100			1740	0	12	100
250			1735	0	17	100

Tabell 13 NPA for hver DNA-innmating

DNA-innmating (ng)	Forventede varianter	TN	FP	Ref. Ingen betegnelser	NPA (%)
12	2892	307179	0	3935	100
25	2892	309767	0	1347	100
50	2892	309999	0	1115	100
100	2892	309754	0	1360	100
250	2892	308922	0	2192	100

Forstyrrende stoffer

For å vurdere virkningen av forstyrrende stoffer på bibliotekklargjøring ble en representativ analyse utformet for å undersøke et enkelt gen som dekket 11 529 baser, evaluert i nærvær og fravær av mulige forstyrrende stoffer. Bibliotekklargjøringen ble fullført ved hjelp av Universal Kit 1.0. Åtte (8) fullblodsprøver, som representerte åtte unike genotyper, ble brukt i studien. Fire endogene forstyrrende stoffer (bilirubin, kolesterol, hemoglobin og triglyserid) ble testet ved å tilsette dem i blodprøvene før DNA ble ekstrahert. For å vurdere forstyrrelsen som resulterte fra blodprøvetaking (kort prøvetaking), ble EDTA tilsatt blodprøvene i to konsentrasjoner. Konsentrasjonsgrensene for hvert stoff vises i Tabell 14. Dessuten, for å vurdere forstyrrelsen fra prøveklargjøringen, ble 15 % vaskebuffer tilsatt åtte rensset genomisk DNA. Det ene genpanelet ble brukt. En 100 % betegnelsesfrekvens ble oppnådd for alle prøvene som ble testet i tillegg til 100 % reproduserbarhet i genotypebetegnelser mellom prøver i nærvær og fravær av forstyrrende stoffer.

Tabell 14 Betegnelsesfrekvens for hvert teststoff

Teststoff	Totalt antall replikater	Konsentrasjon testet i blod (øvre grense)	Konsentrasjon testet i blod (nedre grense)	Betegnelsesfrekvens
Bilirubin	16	684 µmol/l	137 µmol/l	100 %
Kolesterol	16	13 mmol/l	2,6 mmol/l	100 %
Hemoglobin	16	2 g/l	0,4 g/l	100 %
Triglyserid	16	37 mmol/l	7,4 mmol/l	100 %
EDTA	16	7 mg/ml	2,8 mg/ml	100 %

Karakteristikker for somatisk ytelse

DNA-innmatingsstudien brukte et panel med 26 gener som det representative mutasjonspanelet. De andre studiene brukte et panel med to gener som det representative mutasjonspanelet.

DNA-innmating

TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC ble brukt for å evaluere et sett DNA-prøver ekstrahert fra FFPE-prøver som besto av ni ulike vev. Iht. FFPE QC ble en Cq-verdi målt for hver prøve og sammenlignet med en kontroll for å beregne ΔCq -verdier som varierte fra $-1,2$ til $6,4$. Prøver ble fortynnet i forholdet 1:8, 1:4, 1:2 eller behandlet som ufortynnet iht. settinstruksjonene. Enkelte prøver ble ytterligere fortynnet (opptil 1:64) for å øke ΔCq -verdiene. To prøver der ΔCq -verdier betegnet 1:8-fortynninger ble også behandlet uten fortynning for å teste innmatings høyere enn det som var anbefalt. Alle fortynninger ble behandlet gjennom bibliotekklargjøring og sekvensert. Variantbetegnelser fra den somatiske variantmodulen ble sammenlignet med toveis Sanger-sekvensering utført på spesifikke genmål avhengig av vevstype. Fortynninger ble gruppert i ett av fire ΔCq -områder og analysert for nøyaktighet og ingen betegnelser (Tabell 15). Den øvre innmatingsgrensen er en ΔCq på to, som oppnås ved gjentakende fortynninger av prøver med innmating på $< \Delta Cq$ på to i henhold til settets instruksjoner. Den nedre innmatingsgrensen er en ΔCq på 4. ΔCq -verdier mellom to og fire oppnår ekvivalent nøyaktighet. Analyser som bruker ΔCq til å vurdere FFPE-prøver, skal bestemme nødvendig cut-off for å oppnå ønsket nøyaktighet og presisjon.

Tabell 15 Nøyaktighet og ingen betegnelser av ΔCq -gruppen

ΔCq -gruppe	Varianter				Villtypeposisjoner				
	Forventet	TP	FN	Ingen betegnelser	PPA	TN	FP	Ingen betegnelser	NPA
ΔCq -er $-1,2$ og $-0,8$	1	1	0	0	100	1387	1	0	99,9
ΔCq -er 1,5–4	19	18	0	1	100	14358	1	78	99,9
ΔCq -er ~ 4	19	18	0	1	100	14333	1	103	99,9
ΔCq s ~ 5	22	20	2	0	90,9	15878	1	439	99,9

Ekstraksjon

En studie med ekstraksjonsmetoder ble utført for å evaluere hvilken påvirkning tre kommersielt tilgjengelige ekstraksjonssett hadde på ytelsen til bibliotekklargjøringen. Settene brukte kolonner som utgangspunkt for ekstraksjonen, og inkluderte reagenser for deparafinisering og delvis reversering av formalinkryssbinding som er spesifikk for FFPE-vev. Metodene ble endret ved å fordoble mengden proteinase K og digerere med en inkubasjon over natten med omrøring. DNA ble eluert i det lavest anbefalte volumet for et gitt sett eller minst 30 µl. Ti (10) prøver ble testet i duplikat med hvert ekstraksjonssett. Alle replikater (20/20) som ble testet med hvert sett, oppfylte

analysekvalitetskontrollspesifikasjonene. En representativ analyse for to gener ble benyttet. PPA var 100 % (16/16) og NPA var 100 % (1104/1104) for hvert sett. Sanger-sekvensering ble brukt som referansem metode.

Forstyrrende stoffer

En studie med forstyrrende stoffer ble gjennomført for å evaluere virkningen av potensielt forstyrrende stoffer på ytelsen til bibliotekklargjøringen. Analyseytelsen ble evaluert i nærvær av eksogene stoffer (parafinvoks, xylen, etanol og proteinase K, ekstraksjonsoppløsninger) samt endogene stoffer (nekrotisk vev og hemoglobin).

Eksogene stoffer

De eksogene stoffene som ble testet, er ekstraksjonsoppløsninger som vanligvis brukes under DNA-ekstraksjonsprosessen, og som er oppført med testede mengder i [Tabell 16](#). Femten (15) kolorektale FFPE-prøver ble testet per forstyrrende stoff og sammenlignet med ubehandlede kontroller. Prøvene representerte villtypeprøver som ikke inneholdt noen gen 1-panelmutasjoner (5/15 prøver), samt prøver som inneholdt prevalente mutasjoner (10/15 prøver). Prøver ble sekvensert ved maksimalt multiplekseringsnivå på 10 prøver pluss kontroller per kjøring.

Tabell 16 Testede stoffer

Forstyrrende stoff	Faktisk mengde [μl / 25 μl eluat]
Deparafiniseringsoppløsning	$1,69 \times 10^{-04}$
Parafinvoks (i xylen)	$2,50 \times 10^{-05}$
Xylen	$2,50 \times 10^{-05}$
Etanol	$1,69 \times 10^{-04}$
Proteinase K ¹	$3,30 \times 10^{-06}$
Vaskeløsning ²	$6,25 \times 10^{-01}$
1 X vaskeløsning ³	$6,25 \times 10^{-01}$
Vaskebuffer AW1 ¹	$6,25 \times 10^{-02}$
Vaskebuffer AW2 ¹	$6,25 \times 10^{-01}$

¹⁻³Tre kommersielt tilgjengelige kolonnebaserte DNA-isolasjonssett.

For alle eksogene stoffer som ble testet, besto alle 15 eksemplarer prøvevalifikasjonskravet (15/15, 100 % prøvens kvalitetskontrollgjennomgangsfrekvens) og viste et gyldig resultat etter bibliotekklargjøring og sekvensering (15/15, prøvens første gjennomgangshastighet på 100 %).

PPA beregnes per prøve-basis. OPA og NPA beregnes per mutasjon-basis på DNA-nivået. Det er 56 mutasjoner per prøve på DNA-nivået. Alle 15 prøver for alle ni eksogene stoffer viste samsvar med ubehandlet kontrolltilstand i alle mutante (10/10) og ikke-mutante posisjoner (830/830). Ingen av de potensielt forstyrrende stoffene som ble vurdert ved maksimale konsentrasjoner, og som var forventet å bli påvist under genomisk DNA (gDNA)-ekstraksjon fra FFPE-vev, påvirker ytelsen til TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Endogene stoffer (hemoglobin)

Femten (15) kolorektale FFPE-prøver ble hver testet i nærvær eller fravær av 2 mg/ml hemoglobin, en CLSI-«høy» mengde hemoglobin. Prøvene representerte villtypeprøver som ikke inneholdt representative panelmutasjoner (5/15 prøver), samt prøver som inneholdt prevalente representative panelmutasjoner (10/15 prøver). Prøver ble sekvensert ved maksimalt multiplekseringsnivå på 10 prøver pluss kontroller per kjøring. Alle 15 eksemplarer besto prøvevalifikasjonskravet (15/15, 100 % prøvens kvalitetskontrollgjennomgangshastighet) og viste et gyldig resultat etter bibliotekklargjøring og sekvensering (15/15, prøvens første gjennomgangshastighet på 100 %). Alle 15 prøver viste

samsvar for alle mutante (10/10) og ikke-mutante posisjoner (830/830) med ubehandlet kontrolltilstand. Konsentrasjonen av testet hemoglobin påvirker ikke ytelsen til TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Endogene stoffer (nekrotisk)

Femten (15) kolorektale FFPE-prøver sammensatt av villtypeprøver som ikke inneholder noen panelmutasjoner (10/15 prøver), samt prøver som inneholder prevalente representative panelmutasjoner (5/15 prøver) og mellom 10 og 80 % nekrotisk vev, bestemt ved patologisk vurdering, ble benyttet til evaluering av endogene nekrotiske prøver. Prøver ble sekvensert ved maksimalt multiplekseringsnivå på 10 prøver pluss kontroller per kjøring. 14/15 prøver ga et gyldig resultat etter bibliotekklargjøring og sekvensering (prøvens første gjennomgangshastighet var 93,3 %). Samlet prosentsamsvar var 99,9 % (783/784) sammenlignet med Sanger-sekvensering. PPA var 100 % (4/4) og NPA var 99,87 % (779/780). Det ene (1) falskt positive resultatet som ble registrert, var sannsynligvis på grunn av en prøvemutasjonsfrekvens som lå under påvisningsgrensen for Sanger-sekvensering. Totalt sett oppfyller TruSeq Custom Amplicon Kit Dx ytelsesegenskapene med vev som inneholder 10–80 % nekrose.

Patenter og varemerker

Dette dokumentet og dets innhold er opphavsrettslig beskyttet for Illumina, Inc. og tilknyttede selskaper («Illumina»), og er ment utelukkende for kontraktbruk av kunden i forbindelse med bruk av produktet (produktene) beskrevet her, og for intet annet formål. Dette dokumentet og dets innhold skal ikke brukes eller distribueres til andre formål og/eller på annen måte kommuniseres, fremlegges eller reproduseres på noen måte uten forutgående, skriftlig samtykke fra Illumina. Illumina overfører ikke noen lisens under sitt patent, varemerke, opphavsrett eller sedvanerett eller lignende rettigheter til tredjeparter gjennom dette dokumentet.

Instruksjonene i dette dokumentet skal følges strengt og tydelig av kvalifisert og tilfredsstillende utdannet personell for å sikre riktig og sikker bruk av produktet (produktene) som er beskrevet i dette dokumentet. Alt innhold i dette dokumentet skal leses fullt ut og være forstått før produktet (produktene) brukes.

HVIS DET UNNLATES Å LESE FULLSTENDIG OG UTTRYKkelig FØLGE ALLE INSTRUKSJONENE I DETTE DOKUMENTET, KAN DET FØRE TIL SKADE PÅ PRODUKTET (PRODUKTENE), SKADE PÅ PERSONER, INKLUDERT BRUKERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANNEN EIENDOM, OG DETTE VIL UGYLDIGGJØRE EVENTUELL GARANTI SOM GJELDER FOR PRODUKTET (PRODUKTENE).

ILLUMINA PÅTAR SEG IKKE ANSVAR SOM FØLGE AV FEIL BRUK AV PRODUKTET (PRODUKTENE) SOM ER BESKREVET I DETTE DOKUMENTET (INKLUDERT DELER AV DETTE ELLER PROGRAMVARE).

© 2021 Illumina, Inc. Med enerett.

Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. Ytterligere informasjon om varemerker finner du på www.illumina.com/company/legal.html.

AMPure, Beckman og Beckman Coulter er varemerker eller registrerte varemerker for Beckman Coulter, Inc.

Kontaktinformasjon



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California, 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (utenfor Nord-Amerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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



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

Produktmerking

Ønsker du en fullstendig oversikt over symboler som finnes på produktemballasjen og -merkingen, kan du gå til support.illumina.com og lese under fanen *Documentation and Literature* (Dokumentasjon og litteratur) for settet.