

# TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) - laboratorioseurantalomake

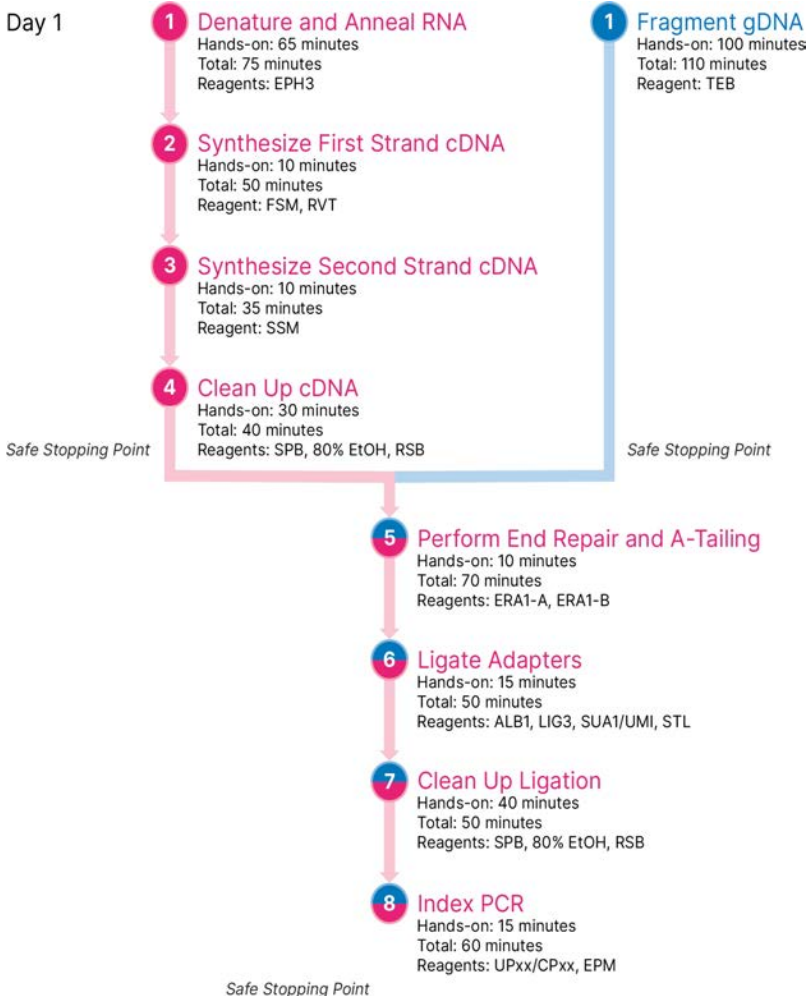
IN VITRO -DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN  
VAIN VIENTIIN

## Käyttöohjeet

Yleiskatsaus TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) -työnkulusta on [Kuva 1](#) ja [Kuva 2](#).  
Lue *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkausselosteen (asiakirjanro 200007789)* varoitukset ja varoimenpiteet ennen protokollan aloittamista.

## Kirjaston valmistelun työnkulku

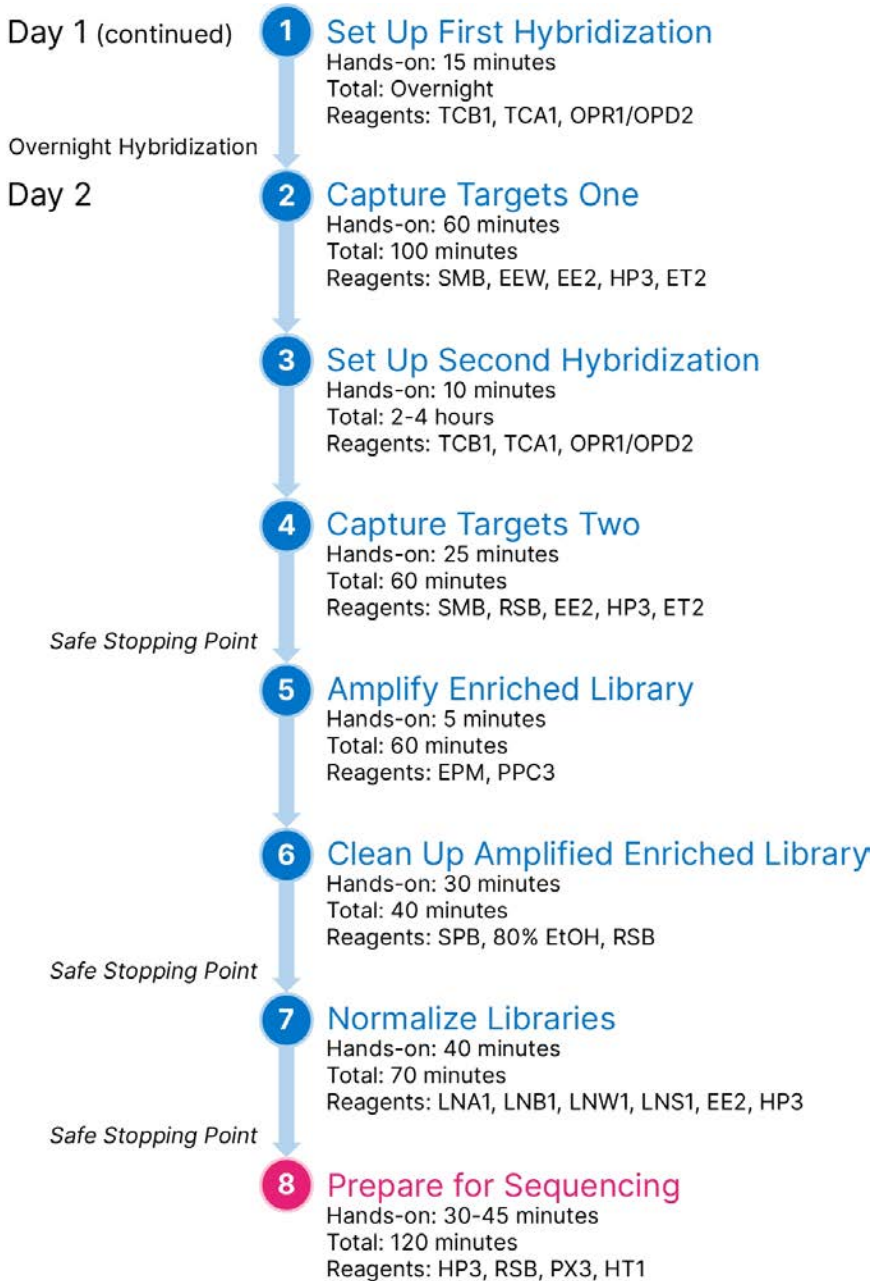
Kuva 1 TSO Comprehensive -työnkulku (osa 1)



\* Hands-on and total times are approximate.

## Rikastustyönkulku

Kuva 2 TSO Comprehensive -työnkulku (osa 2)



● Enrichment ● Sequencing Prep

## Lämpösyklilaitteiden ohjelmointi

- 1 Ennen kuin aloitat määrittämisen, tallenna seuraavat ohjelmat monistusta edeltäviin ja monistuksen jälkeisiin lämpösyklilaitteisiin.

Taulukko 1 Monistusta edeltävät lämpösyklilaitteen ohjelmat

Toimenpidevaihe	Ohjelman nimi	Kannen lämpötila	Reaktiotilavuus	Lämpösyklilaitteen parametrit
RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 65 °C 5 minuutin ajan</li> <li>• 4 °C 1 minuutin ajan</li> <li>• Pito 4 °C:ssa</li> </ul>
Ensimmäisen cDNA-säikeen syntetisointi	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 °C 10 minuutin ajan</li> <li>• 42 °C 15 minuutin ajan</li> <li>• 70 °C 15 minuutin ajan</li> <li>• 4 °C 1 minuutin ajan</li> <li>• Pito 4 °C:ssa</li> </ul>
Toisen cDNA-säikeen syntetisointi	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 16 °C 25 minuutin ajan</li> <li>• 4 °C 1 minuutin ajan</li> <li>• Pito 4 °C:ssa</li> </ul>

Jos kannen lämpötilaksi ei voi asettaa 2ndSS-ohjelmassa 30 °C -lämpötilaa, poista kannen esilämmitys käytöstä.

Taulukko 2 Monistuksen jälkeiset lämpösyklilaitteen ohjelmat

Toimenpidevaihe	Ohjelman nimi	Kannen lämpötila	Reaktiotilavuus	Lämpösyklilaitteen parametrit
PCR:n indeksointi	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C 30 sekunnin ajan</li> <li>• 15 jaksoa: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C 10 sekunnin ajan</li> <li>• 60 °C 30 sekunnin ajan</li> <li>• 72 °C 30 sekunnin ajan</li> </ul> </li> <li>• 72 °C 5 minuutin ajan</li> <li>• Pito 10 °C:ssa</li> </ul>
Ensimmäisen hybridisaation suorittaminen	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C 10 minuutin ajan</li> <li>• 85 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan</li> <li>• 75 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan</li> <li>• 65 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan</li> <li>• Pito 57 °C:ssa 8–24 tunnin ajan</li> </ul>
Toisen hybridisaation suorittaminen	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C 10 minuutin ajan</li> <li>• 85 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan</li> <li>• 75 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan</li> <li>• 65 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan</li> <li>• Pito 57 °C:ssa 1,5–4 tunnin ajan</li> </ul>

Toimenpidevaihe	Ohjelman nimi	Kannen lämpötila	Reaktiivilavuus	Lämpösyklilaitteen parametrit
Rikastetun kirjaston monistaminen	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C 30 s ajan</li> <li>• 18 jaksoa: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C 10 s ajan</li> <li>• 60 °C 30 s ajan</li> <li>• 72 °C 30 s ajan</li> </ul> </li> <li>• 72 °C 5 min ajan</li> <li>• Pito 10 °C:ssa</li> </ul>

## Ajotietojen syöttäminen

TSO Comprehensive -ajo määritetään NextSeq 550Dx -laitteen Local Run Manager -ohjelmistossa. Katso lisätietoja *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module -työnkulkuoppaasta (asiakirjanro 200008661)*.

Syötä ajon ja näytteen määritystiedot suoraan TruSight Oncology Comprehensive -analyysimoduuliin.

### Ajoparametrien määrittäminen

- 1 Kirjautu Local Run Manageriin laitteesta tai verkkoon liitetystä tietokoneesta.
- 2 Valitse **Create Run** (Luo ajo) ja sitten **TSO Comp (EU)**.
- 3 Anna ajolle seuraavat kriteerit täyttävä nimi, jonka perusteella ajo tunnustetaan sekvensoinnin ja analyysin aikana.
  - ▶ Merkkejä saa olla 1–40.
  - ▶ Käytä vain aakkosnumeerisia merkkejä, alaviivoja tai väliviivoja.
  - ▶ Ala- ja väliviivojen edellä ja niiden jälkeen saa olla vain aakkosnumeerinen merkki.
  - ▶ Nimen on oltava yksilöllinen laitteen kaikissa ajoissa.
- 4 [**Valinnainen**] Lisää seuraavat kriteerit täyttävä ajon kuvaus ajon tunnustamisen helpottamiseksi.
  - ▶ Merkkejä saa olla 1–150.
  - ▶ Käytä vain aakkosnumeerisia merkkejä tai välilyöntejä.
  - ▶ Välilyöntien edellä ja niiden jälkeen saa olla vain aakkosnumeerinen merkki.

### Näytteiden määrittäminen ajoa varten

Määritä näytteet ajoa varten käyttämällä jompaakumpaa seuraavista vaihtoehdoista.

- ▶ **Enter Samples Manually** (Syötä näytteet manuaalisesti) – Käytä Create Run (Luo ajo) -näytön tyhjää taulukkoa.
- ▶ **Import Samples** (Tuo näytteet) – Siirry ulkoiseen tiedostoon, jossa arvot on erotettu toisistaan pilkulla (\*.csv). Create Run (Luo ajo) -näytössä on saatavilla ladattava malli.



#### HUOMIO

Näytteiden ja indeksialukkeiden väliset yhteensopimattomuudet johtavat virheellisen tuloksen raportointiin positiivisen näytteen tunnustuksen menetyksen vuoksi. Lisää näytetunnukset ja määritä indeksit Local Run Managerissa, ennen kuin aloitat kirjaston valmistelemisen. Tallenna näytetunnukset, indeksit sekä levyn kuopan suunta viitteeksi kirjaston valmistelemisen aikana.



#### HUOMIO

Estä tietojen menetys varmistamalla ennen ajon tallentamista, että tietokannan asennus ei ole käynnissä.

Näytteiden syöttäminen manuaalisesti

- 1 Syötä seuraavat kriteerit täyttävä ainutkertainen näytetunnus Sample ID (Näytetunnus) -kenttään. **Ensin on lisättävä kaikki kontrollinäytteet.** Katso lisätietoja kohdasta *Kontrollinäytteet sivulla 7*.
  - ▶ Merkkejä saa olla 1–25.

- ▶ Käytä vain aakkosnumeerisia merkkejä, alaviivoja tai väliviivoja.
- ▶ Ala- ja väliviivojen edellä ja niiden jälkeen saa olla vain aakkosnumeerinen merkki.
- 2 **[Valinnainen]** Lisää seuraavat kriteerit täyttävä näytteen kuvaus Sample Description (Näytekuvaus) -kenttään.
  - ▶ Merkkejä saa olla 1–50.
  - ▶ Käytä vain aakkosnumeerisia merkkejä, väliviivoja, alaviivoja tai välilyöntejä
  - ▶ Välilyöntien ja ala- ja väliviivojen edellä ja niiden jälkeen saa olla vain aakkosnumeerinen merkki.
- 3 Valitse indeksi näytteestä valmistetulle DNA - ja/tai RNA-kirjastolle. Varmista, että RNA- ja DNA-näytteet ovat erillisissä sarakkeissa. DNA i7+i5 Sequence (DNA i7+i5 -sekvenssi) -kenttä täytetään automaattisesti, kun DNA Index ID (DNA-indeksitunnus) on valittu. RNA i7+i5 Sequence (RNA i7+i5 -sekvenssi) -kenttä täytetään automaattisesti, kun DNA Index ID (RNA-indeksitunnus) on valittu. Katso tämän tiivistelmän lisäksi tietoja indeksitunnuksen valitsemisesta *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkausselosteesta (asiakirjanro 200007789)*.
  - ▶ Valitse DNA-näytekirjastolle ainutkertainen indeksitunnus (UPxx- tai CPxx-indeksit) avattavasta DNA Index ID (DNA-indeksitunnus) -luettelosta.
  - ▶ Valitse RNA-näytekirjastolle ainutkertainen indeksitunnus (vain UPxx) avattavasta RNA Index ID (RNA-indeksitunnus) -luettelosta.
  - ▶ Jos ajossa on yhteensä kolme kirjastoa, noudata *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkausselosteesta (asiakirjanro 200007789)* annettuja indeksin valintaa koskevia ohjeita.
- 4 Määritä kullekin näytteelle kasvaintyyppi Tumor Type (Kasvaintyyppi) -kentässä valitsemalla tarkin valittavissa oleva kasvaintyyppi. Katso kohta *Kasvaintyyppien valitseminen sivulla 7*.
- 5 Määritä Tumor Type (Kasvaintyyppi) -kentässä kullekin kontrollille jokin seuraavista kontrollityypeistä. Katso kohta *Kontrollinäytteet sivulla 7*.
  - DNA External Control (Ulkoisen DNA-kontrolli)
  - RNA External Control (Ulkoisen RNA-kontrolli)
  - DNA No-Template Control (Malliton DNA-kontrolli)
  - RNA No-Template Control (Malliton RNA-kontrolli)

Jos käytössä on Consumable Prefix DNA Control (Tarvikkeen etuliitteen DNA-kontrolli), kontrollityyppi on DNA External Control (Ulkoisen DNA-kontrolli). Jos käytössä on Consumable Prefix RNA Control (Tarvikkeen etuliitteen RNA-kontrolli), kontrollityyppi on RNA External Control (Ulkoisen RNA-kontrolli).
- 6 Määritä sukupuoli.
- 7 **[Valinnainen]** Valitsemalla **Export to CSV** (Vie CSV-tiedostoon) voit viedä näytetiedot ulkoiseen tiedostoon.
- 8 Tarkastele tietoja Create Run (Luo ajo) -näytössä. Virheelliset tiedot saattavat vaikuttaa tuloksiin.
- 9 Valitse **Save Run** (Tallenna ajo).

#### Näytteiden tuonti

- 1 Valitse **Import CSV** (Tuo CSV) ja selaa näytteen tietotiedoston kohtaan. Voit tuoda kahdentyyppisiä tiedostoja.
  - Valitse Create Run (Luo ajo) -näytöstä **Download CSV** (Lataa CSV), jotta voit ladata uuden näytteen tietolomakkeen. CSV-tiedosto sisältää tuontia varten tarvittavat sarakeotsikot ja muodon. Syötä näytetiedot kuhunkin ajon näytteiden sarakkeeseen. Lisää Tumor Type (Kasvaintyyppi) -sarakeeseen kasvaintyyppin termi tai siihen liitetty koodi (katso *Kasvaintyyppien lataaminen sivulla 1*). Tumor Type (Kasvaintyyppi) -kenttää käytetään myös näytteiden määrittämiseen kontrolleiksi (katso kohta *Kontrollinäytteet sivulla 7*).
  - Käytä näytetietotiedostoa, joka vietiin TSO Comprehensive -analyysimoduulista Export to CSV (Vie CSV-tiedostoon) -ominaisuuden avulla.
- 2 Tarkastele tuotuja tietoja Create Run (Luo ajo) -näytössä. Virheelliset tiedot saattavat vaikuttaa tuloksiin.
- 3 **[Valinnainen]** Valitsemalla **Export to CSV** (Vie CSV-tiedostoon) voit viedä näytetiedot ulkoiseen tiedostoon.
- 4 Valitse **Save Run** (Tallenna ajo).

### Kontrollinäytteet

TSO Comprehensive edellyttää paneelikontrollin käyttöä. Näytteen määrittäminen kontrolliksi asettaa sukupuolen automaattisesti tuntemattomaksi. Määritä näyte kontrolliksi valitsemalla jokin neljästä Tumor Type (Kasvaintyyppi) -kentän kontrollityypistä: DNA External Control (Ulkoisen DNA-kontrolli) (positiivinen DNA-kontrolli), DNA No-Template Control (Malliton DNA-kontrolli), RNA External Control (Ulkoisen RNA-kontrolli) (positiivinen RNA-kontrolli) tai RNA No-Template Control (Malliton RNA-kontrolli). Katso lisätietoja kasvaintyyppien määrittämisestä kaikentyyppisille näytteille ajon valmistelun aikana kohdasta *Kasvaintyyppin valitseminen sivulla 7*.

Ajossa voidaan määrittää vain yksi kutakin kontrollityyppejä. DNA External Control (Ulkoisen DNA-kontrolli)- tai DNA No-Template Control (Malliton DNA-kontrolli) -kontrollityypille voidaan määrittää vain DNA-kirjasto. RNA External Control (Ulkoisen RNA-kontrolli)- tai RNA No-Template Control (Malliton RNA-kontrolli) -kontrollityypille voidaan määrittää vain RNA-kirjasto. Kirjastoja, jotka on määritetty mallittomiksi DNA- tai RNA-kontrollityypeiksi, ei lasketa mukaan ajon kirjastojen enimmäismäärään.

### Kasvaintyyppin valitseminen

Kullekin näytteelle on määritettävä kasvaintyyppi. Käytävissä olevat kasvaintyyppit ovat, kontrollityyppejä lukuun ottamatta, peräisin asennetusta tietokannasta (KB) ja ne voivat muuttua tietokannan päivityksissä versioissa.

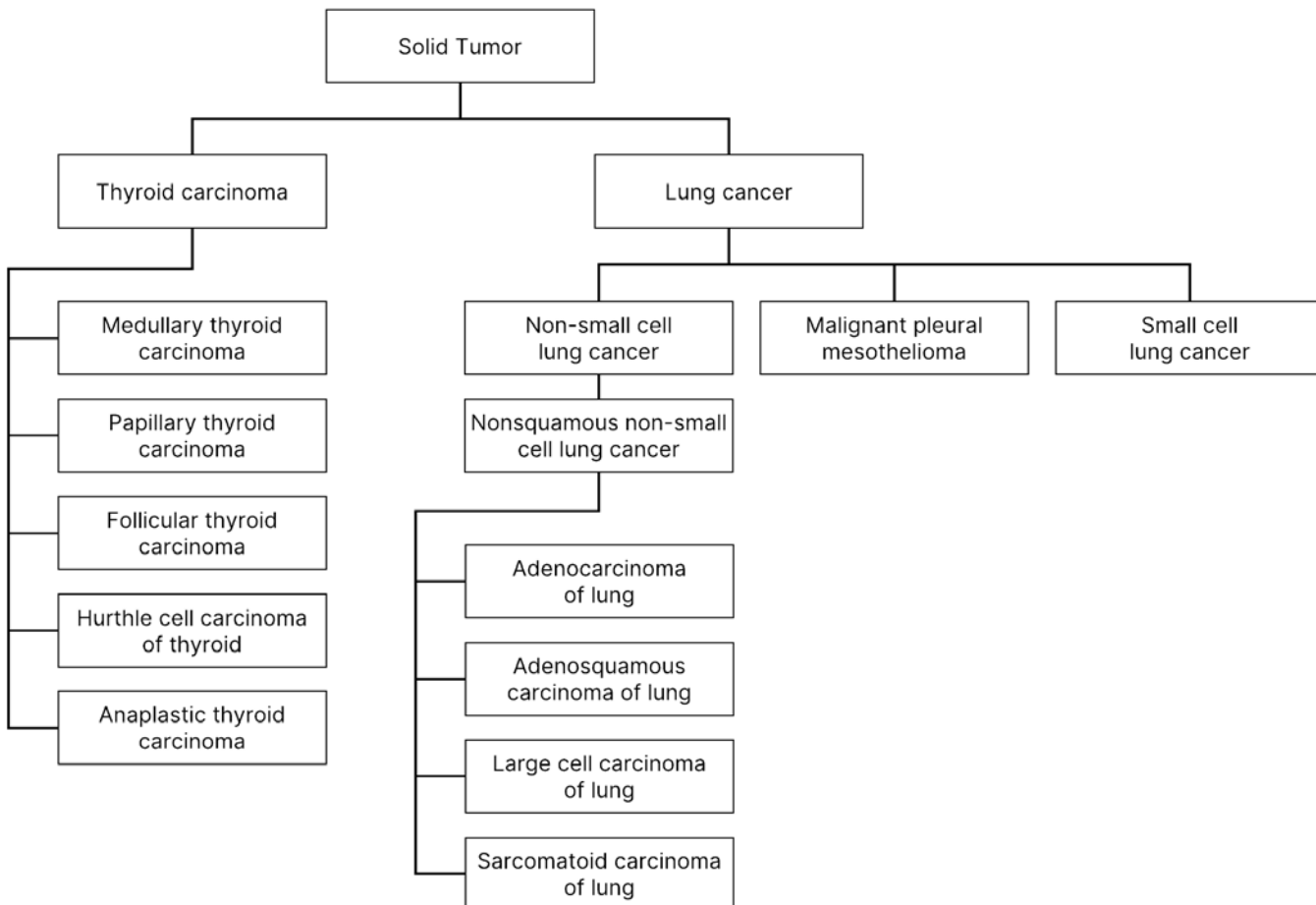


#### HUOMIO

Kasvaintyyppin virheellinen valinta voi aiheuttaa virheellisiä tuloksia. Ratkaise kaikki kasvaintyyppin määrittämisen aikana annettavat varoitukset, jotta analyysi ei epäonnistu.

Kasvaintyyppin termit ovat osa tietokannan hierarkkista sairauden ontologiaa, joka on koostettu pää- ja alisuhteiden mukaan. Esimerkiksi termi ei-pienisolainen keuhkosityöpä on keuhkosityövän alitermi, sillä ei-pienisolainen keuhkosityöpä on keuhkosityövän tyyppi. *Kuva 3* on esimerkki sairauden ontologiasta. Kiinteä kasvain on päätermi ja sen alitermeinä näkyvät keuhko- ja kilpirauhassyöpään liittyvät termit (muut kasvaintyyppit eivät ole näkyvissä). Termi, joka yhdistyy pää- ja alisuhteiden kautta alempiin termeihin, on päätermi. Yhdistetyt alemman tason termit ovat päätermin alitermejä. Keuhkosityöpä on esimerkiksi keuhkon adenokarsinoman ja pienisoluisen keuhkosityövän päätermi, ja medullaarinen kilpirauhassyöpä on sekä kilpirauhassyövän että kiinteän kasvaimen alitermi.

Kuva 3 Esimerkki sairauden ontologiasta



#### Potilasnäytteen valittu kasvaintyyppi vaikuttaa:

- ▶ Siihen, miten näytettä arvioidaan lääkehoidon ja diagnostiikan yhdistävällä laitteella. Ainoastaan potilasnäytteet, joiden kasvaintyyppi vastaa tarkalleen lääkehoidon ja diagnostiikan yhdistävän laitteen käyttötarkoitusta tai ovat sen alimuoto, arvioidaan.
  - ▶ Siihen, mitä kasvaimen profiointiversioita sisällytetään TSO Comprehensive -raporttiin.
- Seuraavissa ohjeissa kuvataan kasvaintyyppien valintaa Create Run (Luo ajo) -näytössä. Kasvaintyyppi voidaan myös määrittää tuomalla kasvaintyyppien sisältävä CSV-tiedosto (katso kohta [Näytteiden tuonti sivulla 6](#)).
- 1 Voit näyttää käytettävissä olevat kasvaintyyppit kaksoisnapsauttamalla näyterivin Tumor Type (Kasvaintyyppi) -solua. Käytettävissä olevat kasvaintyyppit näytetään hierarkkisessa luettelossa aakkosjärjestyksessä. Tumor Type (Kasvaintyyppi) -kenttää käytetään kontrollinäytteiden kontrollityypin määrittämiseen (katso kohta [Kontrollinäytteet sivulla 7](#)).
  - 2 Etsi ja valitse haluamasi kasvaintyyppi luettelosta tai Tumor Type (Kasvaintyyppi) -ikkunan yläreunan hakupalkista.

#### Protokollavaiheiden valmisteleminen

- 1 Puhdista työskentelyalueet huolellisesti RNAasin/DNAasin estoaineella.



#### HUOMIO

Kaikki työnkulun toimenpiteet vaativat RNAasittoman/DNAasittoman ympäristön.



- 2 Määritä monistusta edeltävät lämpösyklilaitteen ohjelmat. Katso kohta *Lämpösyklilaitteiden ohjelmointi sivulla 4.*
- 3 Määritä sonikaattori noudattamalla valmistajan ohjeita.
- 4 Jos käsittelet vain DNA-näytteitä, jatka suoraan kohtaan *gDNA:n fragmentointi sivulla 12.*
- 5 Poista RNA -kontrollit säilytyksestä.
- 6 Poista reagenssiputket pakkauksesta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 3 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (tuotenumero 20031127)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
EPH3	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely
FSM	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Ensimmäisen cDNA-säikeen syntetisointi
RVT	-25...-15 °C	Säilytä jäissä.	Ensimmäisen cDNA-säikeen syntetisointi
SSM	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Toisen cDNA-säikeen syntetisointi

Taulukko 4 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (tuotenumero 20031119)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
SPB (vaaleanvihreä etiketti)	2-8 °C	Säilytä huoneenlämmössä 30 minuuttia.	cDNA:n puhdistaminen
RSB	2-8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	cDNA:n puhdistaminen

## RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely

### Valmisteleminen

- 1 Valmistele seuraavat reagenssit.
  - ▶ EPH3 – Aseta sivuun.
  - ▶ FSM – Sekoita vorteksoimalla. Sentrifugoi lyhyesti ja sekoita sitten pipetoimalla. Tarkista saostumat. Jos niitä näkyy, sekoita pipetoimalla, kunnes saostumat ovat lienneet.
  - ▶ RVT – Sentrifugoi lyhyesti ja sekoita sitten pipetoimalla. Säilytä jäissä.

**HUOMAUTUS** RVT on viskoosinen liuos. Pipetoi aina hitaasti, jotta kuplia ei pääse muodostumaan.

- 2 Valmista FSM+RVT Master Mix -sekoite mikrosentrifugiputkeen yhdistämällä seuraavat määrät.

Taulukko 5 FSM+RVT Master Mix -sekoite

Master Mix -komponentti	3 RNA-näytettä (µl)	8 RNA-näytettä (µl)	16 RNA-näytettä (µl)	24 RNA-näytettä (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

Taulukon määrät ovat hieman ylimitoituja. Katso laskelmia varten *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkaselosteen (asiakirjanumero 200007789)* reagenssien käsittelemistä koskeva osio.

- 3 Sekoita pipetoimalla kymmenen kertaa.
- 4 Aseta FSM+RVT Master Mix -sekoite jäihin, kunnes olet kohdassa *Ensimmäisen cDNA-säikeen syntetisointi sivulla 10.*

### Toimenpide

- 1 Sulata erotetut RNA-näytteet ja RNA-kontrollit jäissä.  
Käsittele RNA-kontrolleja näytteinä protokollan lopun ajan.

Katso ohjeita näytteiden kvantifioimiseen *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkauselosteesta (asiakirjanro 200007789)*.

- 2 Sekoita jokainen RNA-näyte pipetoimalla 10 kertaa.
- 3 Käytä RNAasitonta/DNAasitonta vettä ja valmista 40 ng kutakin RNA-näytettä, jonka lopullinen tilavuus on 8,5 µl (4,7 ng/µl).  
Käytä RNA-kontrolleissa putken etiketissä ilmoitettua pitoisuutta.
- 4 Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä CF (cDNA-frakmentit).
- 5 Lisää 8,5 µl kutakin RNA-näytettä CF PCR -levyn yksilölliseen kuoppaan.
- 6 Varmista, että näytelevyn asettelu ja kunkin näytteen indeksit vastaavat Local Run Managerissa ajon valmistelun aikana suunniteltua ajoa.
- 7 Sekoita EPH3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 8 Lisää 8,5 µl EPH3:a kuhunkin näytekuppaan.
- 9 Aseta CF PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.



#### HUOMIO

Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.

- 10 Ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
- 11 Sentrifugoi arvolla 280 × g 1 minuutin ajan.
- 12 Aseta lämpösyklilaitteeseen ja suorita LQ-RNA-ohjelma.  
Katso kohta *Lämpösyklilaitteiden ohjelmointi sivulla 4*.
- 13 Kun näytteiden lämpötilana on 4 °C, säilytä niitä yksi minuutti jatka sitten välittömästi seuraavaan vaiheeseen.

## Ensimmäisen cDNA-säikeen syntetisointi

### Toimenpide

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Poista CF PCR -levy lämpösyklilaitteesta.
- 2 Sekoita FSM+RVT master mix -sekoite pipetoimalla 5 kertaa.
- 3 Lisää 8 µl FSM+RVT master mix -sekoitetta jokaiseen näytekuppaan.
- 4 Sekoita pipetoimalla 5 kertaa.
- 5 Hävitä jäljelle jäävä FSM+RVT master mix -sekoite.
- 6 Aseta CF PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.
- 7 Ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
- 8 Sentrifugoi arvolla 280 × g 1 minuutin ajan.
- 9 Aseta lämpösyklilaitteeseen ja suorita 1stSS-ohjelma.  
Katso kohta *Lämpösyklilaitteiden ohjelmointi sivulla 4*.
- 10 Kun näytteiden lämpötilana on 4 °C, jatka välittömästi seuraavaan vaiheeseen.  
Ensimmäisen säikeen näytteitä voidaan säilyttää 4 °C -lämpötilassa enintään 5 minuuttia.

## Toisen cDNA-säikeen syntetisointi

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Valmistele seuraava reagenssi.
  - ▶ SSM – Sekoita kääntelemällä 10 kertaa. Sentrifugoi lyhyesti.

### Toimenpide

- 1 Poista CF PCR -levy lämpösyklilaitteesta.

- 2 Lisää 25 µl SSM:ää kuhunkin näytekuppaan.
- 3 Aseta CF PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi. Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.
- 4 Ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
- 5 Sentrifugoi arvolla 280 × g 1 minuutin ajan.
- 6 Aseta lämpösyklilaitteeseen ja suorita 2ndSS-ohjelma. Katso kohta *Lämpösyklilaitteiden ohjelmointi sivulla 4*.
- 7 Kun näytteen lämpötilana on 4 °C, säilytä niitä yksi minuutti jatka sitten välittömästi seuraavaan vaiheeseen.

## cDNA:n puhdistaminen

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Valmistele seuraavat reagenssit.
  - ▶ SPB — Varmista, että rakeet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
  - ▶ RSB — Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- 2 Valmista uusi 80 %:n EtOH 15 ml:n tai 50 ml:n kartioputkeen.

Reagenssi	3 näytettä	8 näytettä	16 näytettä	24 näytettä
100 %:n etanoliaalkoholi, puhdas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNaasiton/DNaasiton vesi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Sekoita vorteksoimalla uusi 80 %:n EtOH.
- 4 Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä BIND1 (cDNA:n sidonta).
- 5 Peitä ja aseta sivuun.
- 6 Aseta magneetti.

### Toimenpide

#### Sidonta

- 1 Poista CF PCR -levy lämpösyklilaitteesta.
- 2 Suspensoi rakeet uudelleen vorteksoimalla SPB:tä 1 minuutin ajan.
- 3 Lisää välittömästi 90 µl SPB:tä kuhunkin BIND1 MIDI -levyn näytekuppaan. Jos annostelet SMB:tä kourulla, kerro tarvittava näytekohdainen materiaalmäärä kertoimella 1,05. Hävitä kaikki jäljelle jäävä materiaali, kun SPB:tä on lisätty kuhunkin näytekuppaan.
- 4 Siirrä kunkin näytteen koko tilavuus (50 µl) CF PCR -levystä BIND1 MIDI -levyn vastaavaan kuppaan.
- 5 Hävitä tyhjä CF PCR -levy.
- 6 Aseta BIND1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi. Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 7 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 8 Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
- 9 Aseta BIND1 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 5 minuutin ajaksi.
- 10 Poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekupasta P200-pipetillä, jonka arvoksi on asetettu 200 µl, koskematta rakeeseen.

## Peseminen

- 1 Pese rakeet seuraavasti.
  - a Pidä magneettisella jalustalla ja lisää 200 µl uutta 80 %:n EtOH:ta kuhunkin kuoppaan.
  - b Odota 30 sekuntia.
  - c Poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin kuopasta.
- 2 Pese rakeet **toisen** kerran.
- 3 Poista EtOH-jäämät kustakin kuopasta.  
Käytä ohutkärkistä P20-pipettiä.
- 4 Hävitä käyttämätön 80 %:n EtOH.

## Eluointi

- 1 Irrota BIND1 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
- 2 Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
- 3 Lisää 22 µl RSB:tä kuhunkin näytekuoppaan.
- 4 Aseta BIND1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 5 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 6 Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.
- 7 Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
- 8 Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä PCF (puhdistetut cDNA-frakmentit).  
Jos pysäytät kohdan **TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA** sivulla 12 mukaisessa kohdassa, käytä PCR-levyä.
- 9 Siirrä kustakin BIND1 MIDI -levyn näytekuopasta 20 µl eluaattia PCF-levyn vastaavaan kuoppaan.
- 10 Hävitä tyhjä BIND1 MIDI -levy.
- 11 Lisää 30 µl RSB:tä kuhunkin PCF-levyn näytekuoppaan.
- 12 Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
- 13 Aseta PCF-levyyn liimapintainen levyn sulkukansi ja säilytä jäissä.
- 14 Palauta EPH3, FSM, RVT ja SSM säilytykseen.
- 15 Jos käsittelet vain RNA:sta (cDNA) johdettuja näytteitä ja et pysähdy turvalliseen pysäytyskohtaan, jatka kohtaan **Päiden korjauksen ja A-hännänmuodostuksen suorittaminen** sivulla 15.

**TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA**

Jos pysäytät, sentrifugoi PCF PCR -levyä arvolla 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä -25 °C:n ja -15 °C:n välillä enintään 7 vuorokautta.

Lopetuspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

## Protokollavaiheiden valmisteleminen

- 1 Poista DNA -kontrollit säilytyksestä.
- 2 Poista reagenssiputki pakkauksesta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 6 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (tuotenumero 20031119)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
TEB	2-8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	gDNA:n fragmentointi

## gDNA:n fragmentointi

## Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Muista noudattaa *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkauselosteen (asiakirjanro 200007789)* näytteiden kvantifioimista koskevia suosituksia.
- 2 Valmistele seuraava reagenssi.
  - ▶ **TEB** – Sekoita kääntämällä tai vorteksoimalla.

## Toimenpide

### Levyn valmisteleminen

- 1 Valmistele levy jollakin seuraavista kolmesta tavasta.
  - ▶ **Vaihtoehto 1:** Käsittele gDNA-näytteet samanaikaisesti cDNA-näytteiden kanssa PCF MIDI -levyssä.
    - a Merkitse PCF MIDI -levyyn merkintä LP (kirjaston valmisteleminen).
    - b Aseta jäihin ja aseta sivuun kohdan *Frakmentoitudun DNA:n siirtäminen sivulla 14* mukaista käyttöä varten.
  - ▶ **Vaihtoehto 2:** Käsittele gDNA-näytteet samanaikaisesti cDNA-näytteiden kanssa. PCF PCR -levy on jäädytetty.
    - a Sulata PCF PCR -levy huoneenlämpötilaan.
    - b Sentrifugoi arvolla 280 × g 1 minuutin ajan.
    - c Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
    - d Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä LP (kirjaston valmisteleminen).
    - e Siirrä kunkin näytteen koko 50 µl PCF PCR -levystä LP MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
    - f Hävitä tyhjä PCF PCR -levy.
    - g Aseta liimapintainen levyn sulkukansi ja pidä jäissä kohtaan *Frakmentoitudun DNA:n siirtäminen sivulla 14* asti.
  - ▶ **Vaihtoehto 3:** Käsittele vain gDNA-näytteet.
    - a Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä LP (kirjaston valmisteleminen).
    - b Jos pysäytät kohdan *TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA sivulla 14* mukaisessa kohdassa, käytä PCR -levyä.
    - c Peitä ja aseta sivuun kohdan *Frakmentoitudun DNA:n siirtäminen sivulla 14* mukaista käyttöä varten.

### gDNA:n laimentaminen

- 1 Sulata gDNA-näytteet ja DNA -kontrollit huoneenlämpötilassa. Käsittele DNA-kontrolleja näytteinä protokollan lopun ajan.
- 2 Sekoita jokainen gDNA-näyte pipetoimalla 10 kertaa.
- 3 Kerää pisarat sentrifugoimalla putki lyhyesti.
- 4 Sekoita TEB vorteksoimalla tai kääntämällä.
- 5 Käytä TEB:iä ja valmista 40 ng kutakin gDNA-näytettä, jonka lopullinen tilavuus on 52 µl (0,77 ng/µl). Määrittäminen edellyttää erotuksen 3,33 ng/µl:n vähimmäispitoisuutta, jotta TEB:in 52 µl:n tilavuudesta saadaan vähintään 40 µl. Käytä DNA-kontrolleissa putken etiketissä ilmoitettua pitoisuutta. Jotta näytteen menetys voidaan estää, älä pipetoi laimennukseen alle 2 µl:n näytettä.

### Fragmentointi

- 1 Lisää 52 µl kutakin gDNA-näytettä sonikaattorin putken erilliseen kuoppaan.
- 2 Tallenna sarjan suunta.
- 3 Fragmentoi gDNA frakmentteihin sonikaattorilla.

Frakmentoidun DNA:n siirtäminen

- 1 Varmista, että näytelevyn asettelu ja kunkin näytteen indeksit vastaavat Local Run Managerissa ajon valmistelun aikana suunniteltua ajoa.
- 2 Palauta näyte noudattamalla sonikaattorin valmistajan ohjeita. Joissakin sonikaattorin putkityypeissä voidaan tarvita sentrifugointi, jotta näyte saadaan yhdistettyä putkeen.
- 3 Siirrä jokaisesta fragmentoidusta gDNA-näytteestä ohutkärkisellä p20-pipetillä 3 kertaa 16,7 µl LP MIDI -levyn tyhjään kuoppaan.
- 4 Aseta LP MIDI -levyn liimapintainen levyn sulkukansi.

### TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, aseta LP PCR -levyn liimapintainen levyn sulkukansi ja sentrifugoi arvolla 280 × g 1 minuutin ajan. Säilytä -25 °C... -15 °C -lämpötilassa enintään 7 vuorokautta.

Lopetuspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

## Protokollavaiheiden valmisteleminen

- 1 Valmistele jääastia.
- 2 Poista reagenssiputki pakkauksesta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 7 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (tuotenumero 20031118)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
ERA1-A	-25...-15 °C	Säilytä jäissä.	Päiden korjauksen ja A-hännänmuodostuksen suorittaminen
ERA1-B	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Päiden korjauksen ja A-hännänmuodostuksen suorittaminen
ALB1	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Sovitinten ligaatio
LIG3	-25...-15 °C	Säilytä jäissä.	Sovitinten ligaatio
SUA1 (sininen korkki)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Sovitinten ligaatio
UMI (valkoinen korkki)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Sovitinten ligaatio
STL	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Sovitinten ligaatio
EPM	-25...-15 °C	Säilytä jäissä.	PCR:n indeksointi

Taulukko 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (tuotenumero 20031119)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
SPB (vaaleanvihreä etiketti)	2–8 °C	Säilytä huoneenlämmössä 30 minuuttia.	Ligaation puhdistaminen
RSB	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Ligaation puhdistaminen

Taulukko 9 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (osanumero 20031120)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
UPxx	-25...-15 °C	Sulata sopivat indeksialukeputket huoneenlämpötilaan.	PCR:n indeksointi

Taulukko 10 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (tuotenumero 20031126)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
CPxx	-25...-15 °C	Sulata sopivat indeksialukeputket huoneenlämpötilaan.	PCR:n indeksointi

## Päiden korjauksen ja A-hännänmuodostuksen suorittaminen

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Esilämmitä 2 mikronäytteen inkubaattoria MIDI-lämpölohkon inserteillä seuraavasti.
  - ▶ Esilämmitä mikronäytteen inkubaattori 30 °C -lämpötilaan.
  - ▶ Esilämmitä mikronäytteen inkubaattori 72 °C -lämpötilaan.
- 2 Valmistele seuraavat reagenssit.
  - ▶ ERA1-A – Sentrifugoi lyhyesti ja sekoita sitten pipetoimalla. Säilytä jäissä.
  - ▶ ERA1-B – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Tarkista saostumat. Jos niitä näkyy, lämmitä putki 37 °C -lämpötilaan. Sekoita sitten pipetoimalla, kunnes saostumat ovat liuenneet.
- 3 Valmista ERA1 master mix -sekoite mikrosentrifugiputkessa.

Taulukko 11 ERA1 Master Mix -sekoite

Master Mix -komponentti	3 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

Taulukon määrät ovat hieman ylimitoituja. Katso laskelmia varten *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkaselosteen (asiakirjanumero 200007789)* reagenssien käsittelistä koskeva osio.

- 4 Sekoita pipetoimalla hitaasti 10 kertaa, sentrifugoi lyhyesti ja aseta sitten ERA1 master mix -sekoite jäihin.
- 5 Valmistele levy toisella seuraavista tavoista.
  - ▶ **Vaihtoehto 1:** Näytteet ovat MIDI-levyissä.
    - a Merkitse MIDI-levyyn uudelleen merkintä LP2 (kirjaston valmisteleminen 2).  
Jos jotkin näytteet ovat erillisissä MIDI -levyissä, siirrä kaikki näytteet saman MIDI-levyn erillisiin kuoppiin levyasettelun mukaan.
    - ▶ **Vaihtoehto 2:** Levy on jäädytetty.
      - a Sulata PCF PCR -levy tai LP PCR -levy huoneenlämpötilaan.
      - b Sentrifugoi levyä arvolla 280 x g 1 minuutin ajan.
      - c Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
      - d Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä LP2 (kirjaston valmisteleminen 2).
      - e Siirrä kunkin näytteen kaikki 50 µl PCF PCR -levystä tai LP PCR -levystä LP2 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
      - f Hävitä PCF PCR- tai LP PCR -levy.

### Toimenpide

- 1 Lisää 10 µl ERA1 master mix -sekoitetta kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuoppaan.
- 2 Hävitä jäljelle jäävä ERA1 master mix -sekoite.
- 3 Aseta LP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.
- 4 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 5 Inkuboi 30 °C -lämpötilaan esilämmitetyssä mikronäytteen inkubaattorissa 30 minuuttia.
- 6 Siirrä välittömästi toiseen esilämmitettyyn mikronäytteen inkubaattoriin ja inkuboi 72 °C -lämpötilassa 20 minuuttia.
- 7 Aseta LP2 MIDI -levy jäihin 5 minuutiksi.

## Sovitinten ligaatio

Tässä prosessissa sovitimet liitetään cDNA- ja/tai gDNA-fragmenttien päihin.

TSO Comprehensive -määritys sisältää SUA1- ja UMI-sovitimet.

- ▶ Käytä SUA1-sovitimia RNA -näytteissä.
- ▶ Käytä UMI-sovitimia DNA-näytteissä.

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Valmistele seuraavat reagenssit.
  - ▶ ALB1 – Sekoita vähintään 10 sekuntia vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ LIG3 – Sentrifugoi lyhyesti ja sekoita sitten pipetoimalla. Säilytä jäissä.
  - ▶ SUA1 – Sekoita vähintään 10 sekuntia vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ UMI – Sekoita vähintään 10 sekuntia vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ STL – Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.

### Toimenpide

- 1 Poista LP2 MIDI -levy jäistä.
- 2 Lisää 60 µl ALB1:tä jokaiseen LP2 MIDI -levyn näytekuoppaan pipetoimalla hitaasti.
- 3 Lisää 5 µl LIG3:a kuhunkin näytekuoppaan.
- 4 Lisää sovitimet.
  - Älä** yhdistä erityyppisiä sovitimia.
    - RNA-näytekuopat – 10 µl SUA1:tä (sininen korkki) jokaiseen RNA:sta peräisin olevaan näytteeseen.
    - DNA-näytekuopat – 10 µl UMI:a (valkoinen korkki) jokaiseen DNA:sta peräisin olevaan näytteeseen.
- 5 Aseta LP2 MIDI -levyn liimapintainen levyn sulkukansi. Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 6 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 7 Inkuboi huoneenlämmössä 30 minuuttia.
- 8 Sekoita STL vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 9 Lisää 5 µl STL:ää kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuoppaan.
- 10 Aseta LP2 MIDI -levyn liimapintainen levyn sulkukansi. Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.
- 11 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.

## Ligaation puhdistaminen

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Valmistele seuraavat reagenssit.
  - ▶ SPB – Varmista, että rakeet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
  - ▶ RSB – Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- 2 Valmista uusi 80 %:n EtOH 15 ml:n tai 50 ml:n kartiotupkeen.

Reagenssi	3 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
100 %:n etanolialkoholi, puhdas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNaasiton/DNaasiton vesi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Sekoita vorteksoimalla uusi 80 %:n EtOH.



- 4 Aseta magneetti.

## Toimenpide

### Sidonta

- 1 Suspensoi rakeet uudelleen vorteksoimalla SPB:tä 1 minuutin ajan.
- 2 Lisää välittömästi 112 µl SPB:tä kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuoppaan.  
Jos annostelet SMB:tä kourulla, kerro tarvittava näytekohtainen materiaalmäärä kertoimella 1,05. Hävitä kaikki jäljelle jäävä materiaali, kun SPB:tä on lisätty kuhunkin näytekuoppaan.
- 3 Aseta LP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 4 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 5 Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
- 6 Aseta LP2 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 10 minuutin ajaksi.
- 7 Poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta P200-pipetillä, jonka arvoksi on asetettu 200 µl, koskematta rakeeseen.

### Peseminen

- 1 Pese rakeet seuraavasti.
  - a Pidä magneettisella jalustalla ja lisää 200 µl uutta 80 %:n EtOH:ta kuhunkin näytekuoppaan.
  - b Odota 30 sekuntia.
  - c Poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin kuopasta koskematta rakeeseen.
- 2 Pese rakeet **toisen** kerran.
- 3 Poista EtOH-jäämät kustakin kuopasta.  
Käytä ohutkärkistä P20-pipettiä.
- 4 Hävitä käyttämätön 80 %:n EtOH.

### Eluointi

- 1 Irrota LP2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
- 2 Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
- 3 Lisää 27,5 µl RSB:tä kuhunkin näytekuoppaan.
- 4 Aseta LP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 5 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 6 Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.
- 7 Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
- 8 Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä LS (kirjastonäytteet).
- 9 Siirrä LP2 MIDI -levystä 25 µl kutakin elutaattia LS PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
- 10 Hävitä tyhjä LP2 MIDI -levy.
- 11 Aseta LS PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.

## PCR:n indeksointi

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Valmistele seuraavat reagenssit.
  - ▶ EPM — Säilytä jäissä.
  - ▶ UPxx — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi lyhyesti. UPxx on indeksialuke, joka valitaan Local Run Manager -ohjelmiston Create Run (Luo ajo) -näytössä ajon valmistelun aikana.

- ▶ CPxx – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi lyhyesti. CPxx on indeksialuke, joka valitaan Local Run Manager -ohjelmiston Create Run (Luo ajo) -näytössä ajon valmistelun aikana.
- 2 Varmista, että kunkin näytteen indeksit vastaavat Local Run Managerissa ajon valmistelun aikana suunniteltua ajoa. Muista noudattaa *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkauselosteen (asiakirjanro 200007789)* indeksin valintaa koskevia ohjeita.

**HUOMIO**

Näytteiden ja indeksialukkeiden väliset yhteensopimattomuudet johtavat virheellisen tuloksen raportointiin positiivisen näytteen tunnistuksen menetyksen vuoksi.

**Toimenpide**

- 1 Lisää 5 µl sopivaa indeksialuketta (UPxx tai CPxx) LS PCR -levyn vastaavaan näytekuoppaan Local Run Manager -ohjelmiston Create Run (Luo ajo) -näytössä ajon valmistelun aikana valittujen indeksien mukaisesti.

**HUOMIO**

Käsittele ja avaa vain yksi indeksialukeputki kerrallaan. Aseta välittömästi kunkin indeksiputken korkki takaisin paikoilleen käytön jälkeen. Älä yhdistele indeksialukkeita.

- 2 Sekoita EPM vorteksoimalla 5 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 3 Lisää 20 µl EPM:ää kuhunkin näytekuoppaan.
- 4 Aseta LS PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi. Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.
- 5 Ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
- 6 Palauta monistusta edeltävät reagenssit säilytykseen.

**HUOMIO**

Suorita kaikki seuraavat vaiheet monistuksen jälkeisellä alueella, jotta monistetun tuotteen siirtyminen voidaan estää.

- 7 Sentrifugoi LS PCR -levyä arvolla 280 × g 1 minuutin ajan.
- 8 Aseta esiohjelmoituun monistuksen jälkeiseen lämpösyklilaitteeseen ja suorita I-PCR-ohjelma. Katso kohta *Lämpösyklilaitteiden ohjelmointi* sivulla 4.

**HUOMAUTUS** Jos jatkat kohdan *Ensimmäisen hybridisaation määritys* sivulla 19 mukaisesti, noudata Protokollavaiheiden valmisteleminen -kohdan sulatusta koskevia ohjeita.

- 9 Kun I-PCR-ohjelma on suoritettu, sentrifugoi LS PCR -levyä arvolla 280 × g 1 minuutin ajan.
- 10 Merkitse levyn uudelleen merkintä ALS (monistetut kirjastonäytteet).

**TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA**

Jos pysäytät, säilytä ALS PCR -levyä -25...-15 °C -lämpötilassa enintään 30 vuorokautta.

Lopetuspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

**Protokollavaiheiden valmisteleminen**

- 1 Varmista, että monistuksen jälkeiset lämpösyklilaitteen ohjelmat on määritetty. Katso kohta *Lämpösyklilaitteiden ohjelmointi* sivulla 4.
- 2 Poista reagenssiputki pakkauksesta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 12 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (tuotenumero 20031123)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
TCB1	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Ensimmäisen hybridisaation määritys

Taulukko 13 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (tuotenumero 20031121)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
TCA1	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

Taulukko 14 TruSight Oncology Comp Content Set Box (tuotenumero 20031122)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
OPR1 (punainen korkki)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen
OPD2 (valkoinen korkki)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

## Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Valmistele seuraavat reagenssit.
  - ▶ TCB1 – Lämmitä putkea 37 °C -lämpötilassa 5 minuuttia. Sekoita vorteksoimalla 10 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ TCA1 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ OPR1 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ OPD2 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 2 Jos ALS PCR -levy on säilytetty, sulata huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi arvolla 280 × g 1 minuutin ajan. Sekoita sitten pipetoimalla.
- 3 Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä HYB1 (hybridisaatio 1).

### Toimenpide

- 1 Siirrä kustakin ALS PCR -levyn cDNA- ja/tai gDNA-kirjastosta 20 µl HYB1 PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
- 2 Aseta ALS PCR -levyyn liimapintainen levy sulukansi ja aseta se sivuun. Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 3 Tarkista TCB1:n saostumat. Jos niitä näkyy, lämmitä putki uudelleen ja vorteksoi putkea, kunnes kiteet liukenevat.
- 4 Lisää 15 µl TCB1:tä kuhunkin HYB1 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
- 5 Lisää 10 µl TCA1:tä kuhunkin HYB1 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
- 6 Lisää anturit.
  - Älä** yhdistä erityyppisiä antureita.
    - ▶ **RNA-kirjastokuopat** – 5 µl OPR1:tä jokaiseen RNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
    - ▶ **DNA-kirjastokuopat** – 5 µl OPD2:tä jokaiseen DNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
- 7 Aseta HYB1 PCR -levyyn liimapintainen levy sulukansi.



#### HUOMIO

Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.

- 8 Ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 9 Aseta lämpösyklilaitteeseen ja suorita HYB1-ohjelma. Katso kohta [Lämpösyklilaitteiden ohjelmointi sivulla 4](#).
- 10 Hybridisoi 57 °C -lämpötilassa vähintään 8 ja enintään 24 tunnin ajan.
- 11 Palauta hybridisaation reagenssit säilytykseen.
- 12 Säilytä ALS PCR -levy -25 °C:n ja -15 °C:n välillä enintään 30 päivää.

## Protokollavaiheiden valmisteleminen

- 1 Poista toisen päivän alussa reagenssiputki pakkauksesta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (tuotenumero 20031123)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
SMB (tummansininen etiketti)	2–8 °C	Säilytä huoneenlämmössä 30 minuuttia.	Kohteiden 1 kaappaaminen Kohteiden 2 kaappaminen
ET2	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kohteiden 1 kaappaaminen Kohteiden 2 kaappaminen
HP3	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kohteiden 1 kaappaaminen Kohteiden 2 kaappaminen Kirjastojen normalisointi
TCB1	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Toisen hybridisaation määrittäminen
RSB	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kohteiden 2 kaappaminen Monistetun rikastetun kirjaston puhdistaminen

Taulukko 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (tuotenumero 20031121)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
EE2	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Kohteiden 1 kaappaaminen Kohteiden 2 kaappaminen Kirjastojen normalisointi
EEW	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Kohteiden 1 kaappaaminen
TCA1	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Toisen hybridisaation määrittäminen

Taulukko 17 TruSight Oncology Comp Content Set Box (tuotenumero 20031122)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
OPR1 (punainen korkki)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Toisen hybridisaation määrittäminen
OPD2 (valkoinen korkki)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Toisen hybridisaation määrittäminen

## Kohteiden 1 kaappaaminen

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Esilämmitä mikronäytteen inkubaattori MIDI-lämpölohkon insertillä 57 °C -lämpötilaan.
- 2 Valmistele seuraavat reagenssit.
- ▶ EEW – Sekoita vorteksoimalla 1 minuutin ajan.
  - ▶ EE2 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ HP3 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ SMB – Varmista, että rakeet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
    - ▶ Muista käyttää toimenpiteessä **SMB:tä**, ei **SPB:tä**.
  - ▶ ET2 – Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- 3 Valmista uusi EE2+HP3 Elution Mix -sekoite mikrosentrifugin putkessa.

Taulukko 18 EE2+HP3 Elution Mix -sekoite kohteiden 1 kaappaamiseen

Elution Mix -komponentti	3 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Taulukon määrät ovat hieman ylivoimittuja. Katso laskelmia varten *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkaselosteen (asiakirjanumero 200007789)* reagenssien käsittelistä koskeva osio.

- 4 Vorteksoi EE2+HP3 elution mix -sekoite ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Aseta sivuun *Eluointi*-vaihetta varten.
- 5 Merkitse uusi 96-kuoppainen MIDI-levy merkinnällä CAP1 (kaappaus 1).
- 6 Aseta magneetti.

## Toimenpide

### Sidonta

- 1 Poista HYB1 PCR -levy lämpösyklilaitteesta.
- 2 Sentrifugoi HYB1 PCR -levyä arvolla 280 × g 1 minuutin ajan.
- 3 Suspensoi rakeet uudelleen vorteksoimalla SMB:tä 1 minuutin ajan.
- 4 Lisää välittömästi 150 µl SMB:tä kuhunkin CAP1 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.  
Jos annostelet SMB:tä kourulla, kerro tarvittava näytekohtainen materiaalmäärä kertoimella 1,15. Hävitä kaikki jäljelle jäävä materiaali, kun SMB:tä on lisätty kaikkiin näytekuppiin.
- 5 Aseta pipetin arvoksi 50 µl ja siirrä HYB1 PCR -levyn kustakin kirjastosta koko tilavuus CAP1 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
- 6 Hävitä tyhjä HYB1 PCR -levy.
- 7 Aseta CAP1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.
- 8 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 9 Inkuboi 57 °C:n lämpötilaan esilämmitetyssä mikronäytteen inkubaattorissa 25 minuutin ajan.
- 10 Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
- 11 Pidä CAP1 MID -levy magneettisessa jalustassa ja poista sekä hävitä kaikki supernatantti P200 µl -pipetillä, jonka arvoksi on asetettu 200 µl, koskematta rakeeseen.



### HUOMIO

Siirry välittömästi seuraavaan (*Peseminen*)-vaiheeseen. Älä anna rakeen olla pitkään ilman nestettä.

### Peseminen

- 1 Pese rakeet seuraavasti.
  - a Irrota CAP1 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
  - b Lisää 200 µl EEW:tä kuhunkin kuoppaan.
  - c Aseta pipetin tilavuudeksi 150 µl ja sekoita pipetoimalla vähintään 10 kertaa. Varmista, että kaikki rakeet on suspendoitu uudelleen.



### HUOMIO

Varmista, ettei rakeita ole aspiroimalla varovasti kaikki kuopan raeliuos kärkeen. Katso sitten, onko minkään kuopan pohjalla rautaa. Kallista pipetin kärkeä rautaa kohden pesuvaiheen aikana, jotta rae irtoaa. Varmista, että rae on kokonaan liuoksessa. Liuoksen tulisi näyttää tummanruskealta ja sen koostumuksen tulisi olla homogeenistä.

- d Aseta CAP1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
- e Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.
- f Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 4 minuutin ajan.

- g Inkuboi mikronäytteen inkubaattorissa 57 °C -lämpötilassa 5 minuuttia.
  - h Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
  - i Pidä magneettisessa jalustassa ja poista sekä hävitä kaikki supernatantti kaikista kuopista koskematta rakeeseen.
- 2 Pese rakeet **toisen** kerran.
  - 3 Pese rakeet **kolmannen** kerran.
  - 4 Poista jäljelle jäänyt supernatantti kustakin kuopasta.  
Käytä ohutkärkistä P20-pipettiä.

#### Eluointi

- 1 Irrota CAP1 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
- 2 Vorteksoi uusi EE2+HP3 Elution Mix -sekoite ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 3 Lisää varovasti 17 µl EE2+HP3 Elution Mix -sekoitetta kuhunkin CAP1 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
- 4 Hävitä jäljelle jäänyt EE2+HP3 Elution Mix -sekoite.
- 5 Aseta CAP1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 6 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 7 Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
- 8 Merkitse uusi 96-kuoppainen PCR-levy merkinnällä ELU1 (eluointi 1).
- 9 Sekoita ET2 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 10 Lisää 5 µl ET2:ta kuhunkin uuden ELU1 PCR -levyn vastaavaan kirjastokuoppaan.
- 11 Siirrä varovasti CAP1 MIDI -levyn kustakin kirjastokuopasta 15 µl elutaattia ELU1 PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
- 12 Hävitä tyhjä CAP1 MIDI -levy.
- 13 Aseta ELU1 PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
- 14 Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.
- 15 Ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 16 Palauta EEW säilytykseen.

## Toisen hybridisaation määrittäminen

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Valmistele seuraavat reagenssit.
  - ▶ TCB1 – Lämmitä putkea 37 °C -lämpötilassa 5 minuuttia. Sekoita vorteksoimalla 10 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ TCA1 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ OPR1 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ OPD2 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

### Toimenpide

- 1 Tarkista TCB1:n saostumat. Jos niitä näkyy, lämmitä putki uudelleen ja vorteksoi, kunnes kiteet liukenevat.
- 2 Lisää 15 µl TCB1:tä kuhunkin ELU1 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
- 3 Lisää 10 µl TCA1:tä jokaiseen kirjastokuoppaan.
- 4 Lisää anturit.  
**Älä** yhdistä erityyppisiä antureita.
  - ▶ **RNA-kirjastokuopat** – 5 µl OPR1:tä jokaiseen RNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
  - ▶ **DNA-kirjastokuopat** – 5 µl OPD2:ta jokaiseen DNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
- 5 Aseta ELU1 PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.

Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.

- 6 Ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 7 Aseta lämpösyklilaitteeseen ja suorita HYB2-ohjelma.  
Katso kohta [Lämpösyklilaitteiden ohjelmointi sivulla 4](#).
- 8 Hybridisoi 57 °C -lämpötilassa vähintään 1,5 ja enintään 4 tunnin ajan.
- 9 Palauta TCA1, TCB1, OPR1 ja OPD2 säilytykseen.

## Kohteiden 2 kaappaminen

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Esilämmitä mikronäytteen inkubaattori MIDI-lämpölohkon inserteillä 57 °C -lämpötilaan.
- 2 Valmistele seuraavat reagenssit.
  - ▶ EE2 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ HP3 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ SMB – Varmista, että rakeet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
    - ▶ Muista käyttää toimenpiteessä **SMB:tä**, ei SPB:tä.
  - ▶ RSB – Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
  - ▶ ET2 – Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- 3 Valmista uusi EE2+HP3 elution mix -sekoite mikrosentrifugin putkessa.

Taulukko 19 EE2+HP3 Elution Mix -sekoite kohteiden 2 kaappaamiseen

Elution Mix -komponentti	3 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Taulukon määrät ovat hieman ylimitoituja. Katso laskelmia varten *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkaselosteen (asiakirjanumero 200007789)* reagenssien käsittelistä koskeva osio.

- 4 Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Aseta sivuun *Eluointi*-vaihetta varten.
- 5 Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä CAP2 (kaappaus 2).
- 6 Aseta magneetti.

### Toimenpide

#### Sidonta

- 1 Poista ELU1 PCRR -levy lämpösyklilaitteesta.
- 2 Sentrifugoi ELU1 PCR -levyä arvolla 280 × g 1 minuutin ajan.
- 3 Suspensoi rakeet uudelleen vorteksoimalla SMB:tä 1 minuutin ajan.
- 4 Lisää välittömästi 150 µl SMB:tä kuhunkin CAP2 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.  
Jos annostelet SMB:tä kourulla, kerro tarvittava näytekohtainen materiaalmäärä kertoimella 1,15. Hävitä kaikki jäljelle jäävä materiaali, kun SMB:tä on lisätty kaikkiin näytekouppiin.
- 5 Aseta pipetin arvoksi 50 µl ja siirrä kustakin ELU1 PCR -levyn kirjastosta koko tilavuus CAP2 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
- 6 Hävitä tyhjä ELU1 PCR -levy.
- 7 Aseta CAP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.
- 8 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 9 Inkuboi mikronäytteen inkubaattorissa 57 °C -lämpötilassa 25 minuuttia.

**HUOMAUTUS** Jos jatkat kohdan *Rikastetun kirjaston monistaminen sivulla 25* mukaisesti, noudata Protokollavaiheiden valmisteleminen -kohdan reagenssien sulatusta koskevia ohjeita.

- 10 Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
- 11 Pidä CAP2 MID -levy magneettisessa jalustassa ja poista sekä hävitä kaikki supernatantti kustakin kirjastokuopasta P200-pipetillä, jonka arvoksi on asetettu 200 µl, koskematta rakeeseen.



**HUOMIO**

Siirry välittömästi seuraavaan (*Peseminen*)-vaiheeseen. Älä anna rakeen olla pitkään ilman nestettä.

**Peseminen**

- 1 Irrota CAP2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
- 2 Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
- 3 Lisää 200 µl RSB:tä kuhunkin näytekuppaan.
- 4 Aseta CAP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi. Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 5 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 4 minuutin ajan.
- 6 Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
- 7 Pidä CAP2 MID -levy magneettisessa jalustassa ja poista sekä hävitä kaikki supernatantti koskematta rakeeseen.
- 8 Poista jäljelle jäänyt supernatantti kustakin kuopasta. Käytä ohutkärkistä P20-pipettiä.

**Eluointi**

- 1 Irrota CAP2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
- 2 Vorteksoi uusi EE2+HP3 Elution Mix -sekoite ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 3 Lisää 22 µl EE2+HP3 Elution Mix -sekoitetta kuhunkin CAP2 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
- 4 Hävitä jäljelle jäänyt EE2+HP3 Elution Mix -sekoite.
- 5 Aseta CAP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi. Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 6 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 7 Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
- 8 Merkitse uusi 96-kuoppainen PCR-levy merkinnällä ELU2 (eluointi 2).
- 9 Sekoita ET2 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 10 Lisää 5 µl ET2:ta kuhunkin uuden ELU2 PCR -levyn vastaavaan kirjastokuoppaan.
- 11 Siirrä varovasti CAP2 MIDI -levyn kustakin kirjastokuopasta 20 µl elutaattia ELU2 PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
- 12 Hävitä tyhjä CAP2 MIDI -levy.
- 13 Aseta ELU2 PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi. Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.
- 14 Ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 15 Palauta SMB, EE2, HP3 ja ET2 säilytykseen.

**TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA**

Jos pysäytät, sentrifugoi ELU2 PCR -levyä arvolla 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä -25 °C:n ja -15 °C:n välillä enintään 7 päivän ajan. Palauta RSB säilytykseen.

Lopetuspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_



## Protokollavaiheiden valmisteleminen

- 1 Valmistele jääastia.
- 2 Poista reagenssiputki pakkauksesta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (tuotenumero 20031121)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
PPC3	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Rikastetun kirjaston monistaminen
EPM	-25...-15 °C	Säilytä jäissä.	Rikastetun kirjaston monistaminen

Taulukko 21 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (tuotenumero 20031123)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
SPB (vaaleanvihreä etiketti)	2-8 °C	Säilytä huoneenlämmössä 30 minuuttia.	Monistetun rikastetun kirjaston puhdistaminen
RSB	2-8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Monistetun rikastetun kirjaston puhdistaminen Valmistelu sekvensointia varten

## Rikastetun kirjaston monistaminen

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Jos ELU2-levyä on säilytetty, sulata huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sitten arvolla 280 × g 1 minuutin ajan.

### Toimenpide

- 1 Sekoita PPC3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 2 Lisää 5 µl PPC3:a jokaiseen ELU2 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
- 3 Sekoita EPM vorteksoimalla 5 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 4 Lisää 20 µl EPM:ää jokaiseen kirjastokuoppaan.
- 5 Aseta ELU2 PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi. Sulje reunat ja kuopat kokonaan haihtumisen estämiseksi.
- 6 Ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 7 Aseta lämpösyklilaitteeseen ja suorita EL-PCR-ohjelma. Katso kohta [Lämpösyklilaitteiden ohjelmointi sivulla 4](#).

**HUOMAUTUS** Jos jatkat kohdan [Kirjastojen normalisointi sivulla 27](#) mukaisesti, noudata Protokollavaiheiden valmisteleminen -kohdan sulatusta koskevia ohjeita.

- 8 Palauta PPC3 ja EPM säilytykseen.

## Monistetun rikastetun kirjaston puhdistaminen

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Valmistele seuraavat reagenssit.
  - ▶ SPB – Varmista, että rakeet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
    - ▶ Muista käyttää toimenpiteessä **SPB:tä**, ei **SMB:tä**.
  - ▶ RSB – Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.

- 2 Valmista uusi 80 %:n etanoli 15 ml:n tai 50 ml:n kartioputkeen.

Reagenssi	3 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
100 %:n etanolialkoholi, puhdas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNAasiton/DNAasiton vesi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Sekoita vorteksoimalla uusi 80 %:n EtOH.  
 4 Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä BIND2 (sidonnan puhdistus).  
 5 Aseta magneetti.

## Toimenpide

### Sidonta

- 1 Poista ELU2 PCRR -levy lämpösyklilaitteesta.  
 2 Sentrifugoi ELU2 PCR -levyä arvolla 280 × g 1 minuutin ajan.  
 3 Suspensoi rakeet uudelleen vorteksoimalla SPB:tä 1 minuutin ajan.  
 4 Lisää välittömästi 110 µl SPB:tä kuhunkin BIND2 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.  
 5 Siirrä kustakin ELU2 PCR -levyn kirjastosta 50 µl BIND2 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.  
 6 Hävitä tyhjä ELU2 PCR -levy.  
 7 Aseta BIND2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi. Peitä reunat ja kuopat kokonaan.  
 8 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.  
 9 Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.  
 10 Aseta levy magneettiselle jalustalle 5 minuutin ajaksi.  
 11 Poista ja hävitä **kaikki** supernatantti kustakin kirjastokuopasta P200-pipetillä, jonka arvoksi on asetettu 200 µl, koskematta rakeeseen.

### Peseminen

- 1 Pese rakeet seuraavasti.
- a Pidä magneettisella jalustalla ja lisää 200 µl uutta 80 %:n EtOH:ta kuhunkin kuoppaan.
  - b Odota 30 sekuntia.
  - c Poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekupasta koskematta rakeeseen.
- 2 Pese rakeet **toisen** kerran.  
 3 Poista EtOH-jäämät kustakin kuopasta. Käytä ohutkärkistä P20-pipettiä.  
 4 Hävitä käyttämätön 80 %:n EtOH.

### Eluointi

- 1 Irrota BIND2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.  
 2 Sekoita RSB vorteksoimalla tai kääntämällä.  
 3 Lisää 32 µl RSB:tä jokaiseen kirjastokuoppaan.  
 4 Aseta BIND2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi. Peitä reunat ja kuopat kokonaan.  
 5 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.  
 6 Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.  
 7 Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.  
 8 Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä PL (puhdistetut kirjastot).  
 9 Siirrä BIND2 MIDI -levystä 30 µl kutakin elutaattia PL PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.

- 10 Hävitä tyhjä BIND2 MIDI -levy.
- 11 Aseta PL PCR -levyn liimapintainen levyn sulkukansi.
- 12 Palauta SPB säilytykseen.

### TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, sentrifugoi PL PCR -levyä arvolla 280 x g 1 minuutin ajan ja säilytä -25 °C:n ja -15 °C:n välillä enintään 30 päivän ajan. Palauta RSB säilytykseen.

Lopetuspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

## Protokollavaiheiden valmisteleminen

- 1 Poista reagenssiputki pakkauksesta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 22 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (tuotenumero 20031121)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
LNA1	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Kirjastojen normalisointi
EE2	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan.	Kirjastojen normalisointi

Taulukko 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (tuotenumero 20031123)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
LNB1	2-8 °C	Säilytä huoneenlämmössä 30 minuuttia.	Kirjastojen normalisointi
HP3	2-8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi Valmistelu sekvensointia varten
LNW1	2-8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi
LNS1	2-8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi

- 2 Jos jatkat samana päivänä kohdan *Valmistelu sekvensointia varten sivulla 30* mukaisesti, noudata Protokollavaiheiden valmisteleminen -kohdan sulatusta koskevia ohjeita.

## Kirjastojen normalisointi

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Valmistele seuraavat reagenssit.
  - ▶ LNB1 – Varmista, että rakeet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
  - ▶ LNA1 – Sekoita vorteksoimalla.
  - ▶ EE2 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ HP3 – Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - ▶ LNW1 – Sekoita vorteksoimalla. Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
  - ▶ LNS1 – Sekoita vorteksoimalla. Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- 2 Suspensoi rakeet uudelleen vorteksoimalla LNB1:tä 1 minuutin ajan. Kääntelee LNB1-putkea ja varmista, että kaikki rakeet ovat suspendoituneet uudelleen.
- 3 Pipetoi LNB1:tä ylös ja alas 10 kertaa P1000-pipetillä, jonka arvoksi on asetettu 800 µl, ja varmista uudelleensuspensio.
- 4 Valmista välittömästi uusi LNA1+LNB1 Master Mix -sekoite kartioputkeen.



### HUOMIO

Suspendoi LNB1-putken pohjalla oleva rae kokonaan uudelleen, jotta epäyhdenmukainen klusteritiheys voidaan estää.

Taulukko 24 LNA1+LNB1 Master Mix -sekoite

Master Mix -komponentti	3 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
LNA1	229 µl	610 µl	1 219 µl	1 829 µl	3 658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Taulukon määrät ovat hieman ylivoimittuja. Katso laskelmia varten *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkaselosteen (asiakirjanumero 200007789)* reagenssien käsittelistä koskeva osio.

- 5 Vorteksoi LNA1+LNB1 Master Mix -sekoite. Aseta sivuun *Sidonta*-vaihetta varten.
- 6 Valmista uusi EE2+HP3 Elution Mix -sekoite mikrosentrifugin putkessa.

Taulukko 25 EE2+HP3 Elution Mix -sekoite kirjastojen normalisoimiseen

Elution Mix -komponentti	3 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1 824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Taulukon määrät ovat hieman ylivoimittuja. Katso laskelmia varten *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkaselosteen (asiakirjanumero 200007789)* reagenssien käsittelistä koskeva osio.

- 7 Vorteksoi uusi elution mix -sekoite ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Aseta sivuun *Luointi*-vaihetta varten.
- 8 Jos PL PCR -levy on säilytetty, sulata huoneenlämpötilaan, sentrifugoi arvolla 280 × g 1 minuutin ajan ja sekoita sitten pipetoimalla.
- 9 Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä BBN (raepohjainen normalisointi).
- 10 Aseta magneetti.

## Toimenpide

### Sidonta

- 1 Vorteksoi LNA1+LNB1 master mix -sekoite.
- 2 Lisää välittömästi 45 µl LNA1+LNB1 Master Mix -sekoitetta kuhunkin BBN MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
- 3 Hävitä jäljelle jäävä LNA1+LNB1 master mix -sekoite.
- 4 Lisää kustakin PL PCR -levyn kirjastosta 20 µl BBN MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
- 5 Aseta BBN MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 6 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 30 minuutin ajan.
- 7 Aseta PL PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi ja palauta säilytykseen.
- 8 Aseta levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
- 9 Pidä magneettisessa jalustassa ja poista sekä hävitä kaikki supernatantti kustakin kuopasta P200-pipetillä koskematta rakeeseen.

### Peseminen

- 1 Pese rakeet seuraavasti.
  - a Irrota BBN MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
  - b Lisää 45 µl LN1:tä jokaiseen kirjastokuoppaan.
  - c Aseta BBN MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
  - d Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
  - e Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 5 minuutin ajan.
  - f Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
  - g Poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin kuopasta koskematta rakeeseen.
- 2 Pese rakeet *toisen* kerran.
- 3 Poista jäljelle jäänyt supernatantti kustakin kuopasta.

Käytä ohutkärkistä P20-pipettiä.

#### Eluointi

- 1 Irrota BBN MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
- 2 Vorteksoi uusi EE2+HP3 Elution Mix -sekoite ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 3 Lisää 32 µl EE2+HP3-liuosta kuhunkin BBN MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
- 4 Hävitä jäljelle jäänyt elution mix -sekoite.
- 5 Aseta BBN MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 6 Ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
- 7 Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
- 8 Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä NL (normalisoidut kirjastot).
- 9 Siirrä varovasti BBN MIDI -levyn kustakin kirjastokuopasta 30 µl elutaattia NL PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.



#### HUOMIO

Jos rakeet ovat aspiroituneet pipetin kärkiin, annostele rakeet takaisin magneettisessa jalustassa olevaan levyyn ja odota, kunnes neste on kirkasta (~2 minuuttia). Jatka vasta tämän jälkeen toimenpiteen seuraavaan vaiheeseen.

- 10 Hävitä tyhjä BBN MIDI -levy.
- 11 Sekoita LNS1 vorteksoimalla.
- 12 Lisää 30 µl LNS1:tä kuhunkin NL PCR -levyn kirjastokuoppaan.
- 13 Sekoita pipetoimalla 5 kertaa.
- 14 Aseta NL PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 15 Palauta LNB1, LNA1, EE2, LNW1 ja LNS1 säilytykseen.

#### TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, sentrifugoi NL PCR -levyä arvolla 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä -25 °C:n ja -15 °C:n välillä enintään 30 päivän ajan.

Lopetuspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

## Protokollavaiheiden valmisteleminen

Aloita tarvikkeiden sekvensoinnin valmistelu tarvikkeesta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (tuotenumero 20028871) vähintään tunti ennen käyttöä.

- 1 Poista kirjaston laimennuspuskuri (HT1) -25 °C... -15 °C -lämpötilassa säilytyksestä, sulata huoneenlämpötilaan ja aseta sitten jäihin.
- 2 Nouda muiden sarjan tarvikkeiden osalta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteoppaan (asiakirjanumero 1000000009513)* valmisteluohjeita.
  - ▶ NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
  - ▶ NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
  - ▶ NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
- 3 Poista reagenssiputki pakkauksesta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (tuotenumero 20031121)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
Sisäinen PhiX-kontrolli (PhiX)	-25 °C...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilaan. Säilytä jäissä.	Valmistelu sekvensointia varten

Taulukko 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (tuotenumero 20031123)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
HP3	2-8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Valmistelu sekvensointia varten
RSB (vaaleanpunainen etiketti)	2-8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Valmistelu sekvensointia varten

## Valmistelu sekvensointia varten

### Valmisteleminen

Aloituspäivämäärä ja -aika \_\_\_\_\_

- 1 Katso *TruSight Oncology Comprehensive (EU) -pakkausselosteen (asiakirjanro 200007789)* kirjastojen määrää ja indeksien valintaa koskevat ohjeet.
- 2 Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä dHP3 (laimennettu HP3).
- 3 Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä dPhiX (laimennettu dPhiX).
- 4 Esilämmitä lämpölohko 96 °C -lämpötilaan mikrosentrifugiputkia varten.
- 5 Valmistele jääastia.

### PhiX-kontrollin laimennus ja denaturointi

- 1 Sekoita HP3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 2 Yhdistä seuraavat määrät dHP3-mikrosentrifugiputkessa.
  - ▶ 10 µl HP3:a
  - ▶ 190 µl RNAasitonta/DNaasitonta- vettä
- 3 Sekoita dHP3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 4 Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
- 5 Sekoita PhiX-kontrolli vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 6 Yhdistä seuraavat määrät dPhiX-mikrosentrifugiputkessa.
  - ▶ 8 µl RSB:tä
  - ▶ 2 µl PhiX-kontrollia
- 7 Lisää 10 µl dHP3:a dPhiX-putkeen.
- 8 Hävitä dHP3-putki.
- 9 Sekoita dPhiX-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 10 Inkuboi dPhiX huoneenlämmössä 5 minuuttia.
- 11 Sekoita HT1 vorteksoimalla.
- 12 Lisää välittömästi 980 µl esijäähdytettyä HT1:tä dPhiX:ään.
- 13 Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 14 Aseta dPhiX jäihin, kunnes sitä käytetään toisen laimennuksen valmistamisessa.  
Lopullinen pitoisuus on 20 pM dPhiX.
- 15 Palauta PhiX, HP3 ja RSB säilytykseen.

### Kirjastojen yhdistäminen ja denaturointi

- 1 Jos NL PCR -levyä on säilytetty, sulata huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sitten arvolla 280 × g 1 minuutin ajan.
- 2 Käytä monikanavapipettiä, jonka arvoksi on asetettu 30 µl, ja sekoita varovasti NL PCR -levyn kirjastot pipetoimalla 5 kertaa.  
Käytä kussakin kirjastossa uusia kärkiä.



**HUOMIO**

Sekoita kirjastot hyvin optimaalisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

- 3 Valitse jokin seuraavista vaihtoehdoista kirjastojen yhdistämiseen, denaturointiin ja laimennukseen.

- ▶ **Vaihtoehto 1:** Sekvensoi RNA- ja DNA-näytteistä peräisin olevat kirjastot samanaikaisesti. Katso kohta *Vaihtoehto 1: DNA- ja RNA-kirjastot yhdessä sivulla 31.*
- ▶ **Vaihtoehto 2:** Sekvensoi vain DNA-näytteistä peräisin olevat kirjastot. Katso kohta *Vaihtoehto 2: vain DNA-kirjastot sivulla 31.*
- ▶ **Vaihtoehto 3:** Sekvensoi vain RNA-näytteistä peräisin olevat kirjastot. Katso kohta *Vaihtoehto 3: vain RNA-kirjastot sivulla 32.*

### Vaihtoehto 1: DNA- ja RNA-kirjastot yhdessä

- 1 Merkitse mikrosentrifugin putki merkinnällä PRL (RNA -poolikirjastot).
- 2 Merkitse mikrosentrifugin putki merkinnällä PDL (DNA -poolikirjastot).
- 3 Siirrä NL-levyn kustakin normalisoidusta RNA (cDNA) -kirjastosta 10 µl PRL-putkeen. Älä yhdistä kahta kirjastoa, joissa on sama indeksialuke.
- 4 Siirrä NL-levyn kustakin normalisoidusta DNA-kirjastosta 10 µl PDL-putkeen. Älä yhdistä kahta kirjastoa, joissa on sama indeksialuke.
- 5 Aseta NL PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi. Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 6 Sekoita vorteksoimalla kaikki PRL- ja PDL-putket.
- 7 Sentrifugoi PRL- ja PDL-putket lyhyesti.
- 8 Inkuboi PRL- ja PDL-putkia lämpölohkossa 96 °C -lämpötilassa 2 minuutin ajan.
- 9 Aseta PRL ja PDL jäihin 5 minuutiksi.
- 10 Sekoita PRL- ja PDL-putket vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 11 Palauta PRL- ja PDL-putket jäihin.

Ensimmäisen laimennuksen valmisteleminen

- 1 Merkitse 1,7 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL1 (laimennus 1).
- 2 Siirrä 20 µl PDL:ää tyhjään DIL1-putkeen.
- 3 Lisää 5 µl PRL:ää DIL1:een.
- 4 Hävitä PDL- ja PRL -putket.
- 5 Lisää 475 µl esijäähdytettyä HT1:tä DIL1-putkeen (laimennus 1:20).
- 6 Sekoita DIL1-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Toisen laimennuksen valmisteleminen

- 1 Merkitse 2,0 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL2 (laimennus 2).
- 2 Siirrä 40 µl DIL1:tä tyhjään DIL2-putkeen.
- 3 Hävitä DIL1-putki.
- 4 Lisää 1 660 µl esijäähdytettyä HT1:tä DIL2-putkeen (laimennus 1:850).
- 5 Sekoita valmistettu 20 pM dPhiX vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 6 Lisää 2,5 µl valmistettua 20 pM dPhiX:ää DIL2-putkeen.
- 7 Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 8 Lisää 1 300 µl DIL2:ta sulatettuun NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) -kasettiin. Katso lisätietoja *NextSeq 550Dx -laitteen viiteoppaasta (asiakirjanro 1000000009513).*
- 9 Hävitä DIL2-putki.
- 10 Sentrifugoi NL PCR -levyä arvolla 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä -25 °C:n ja -15 °C:n välillä enintään 30 päivän ajan.
- 11 Jatka sekvensointiin.  
Katso lisätietoja *NextSeq 550Dx -laitteen viiteoppaasta (asiakirjanro 1000000009513).*

### Vaihtoehto 2: vain DNA-kirjastot

- 1 Merkitse mikrosentrifugin putki merkinnällä PDL (DNA -poolikirjastot).
- 2 Siirrä NL-levyn kustakin normalisoidusta DNA-kirjastosta 10 µl PDL-putkeen.

Älä yhdistä kahta kirjastoa, joissa on sama indeksialuke.

- 3 Aseta NL PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 4 Sekoita PDL-putki vorteksoimalla.
- 5 Sentrifugoi PDL-putki lyhyesti.
- 6 Inkuboi PDL-putkea lämpölohkossa 96 °C -lämpötilassa 2 minuutin ajan.
- 7 Aseta PDL jäihin 5 minuutiksi.
- 8 Sekoita PDL-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 9 Palauta PDL-putki jäihin.

Ensimmäisen laimennuksen valmisteleminen

- 1 Merkitse 1,7 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL1 (laimennus 1).
- 2 Siirrä 10 µl PDL:ää tyhjään DIL1-putkeen.
- 3 Hävitä PDL -putki.
- 4 Lisää 190 µl esijäähdytettyä HT1:tä DIL1-putkeen (laimennus 1:20).
- 5 Sekoita DIL1 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Toisen laimennuksen valmisteleminen

- 1 Merkitse 2,0 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL2 (laimennus 2).
- 2 Siirrä 40 µl DIL1:tä tyhjään DIL2-putkeen.
- 3 Hävitä DIL1-putki.
- 4 Lisää 1 660 µl esijäähdytettyä HT1:tä DIL2-putkeen (laimennus 1:850).
- 5 Vorteksoi valmistettu 20 pM dPhiX ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 6 Lisää 2,5 µl valmistettua 20 pM dPhiX:ää DIL2-putkeen.
- 7 Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 8 Lisää 1 300 µl DIL2:ta sulatettuun NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) -kasettiin.  
Katso lisätietoja *NextSeq 550Dx -laitteen viiteoppaasta (asiakirjanro 1000000009513)*.
- 9 Hävitä DIL2-putki.
- 10 Sentrifugoi NL PCR -levyä arvolla 280 x g 1 minuutin ajan ja säilytä sitten -25 °C:n ja -15 °C:n välillä enintään 30 päivän ajan.
- 11 Jatka sekvensointiin.  
Katso lisätietoja *NextSeq 550Dx -laitteen viiteoppaasta (asiakirjanro 1000000009513)*.

### Vaihtoehto 3: vain RNA -kirjastot

- 1 Merkitse mikrosentrifugin putki merkinnällä PRL (RNA -poolikirjastot).
- 2 Siirrä NL-levyn kustakin normalisoidusta RNA (cDNA) -kirjastosta 10 µl PRL-putkeen.  
Älä yhdistä kahta kirjastoa, joissa on sama indeksialuke.
- 3 Aseta NL PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.  
Peitä reunat ja kuopat kokonaan.
- 4 Sekoita PRL-putki vorteksoimalla.
- 5 Sentrifugoi PRL-putki lyhyesti.
- 6 Inkuboi PRL-putkea lämpölohkossa 96 °C -lämpötilassa 2 minuutin ajan.
- 7 Aseta PRL jäihin 5 minuutiksi.
- 8 Sekoita PRL-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 9 Palauta PRL-putki jäihin.

Ensimmäisen laimennuksen valmisteleminen

- 1 Merkitse 1,7 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL1 (laimennus 1).
- 2 Siirrä 10 µl PRL:ää tyhjään DIL1-putkeen.
- 3 Hävitä PRL -putki.



- 4 Lisää 190 µl esijäähdytettyä HT1:tä DIL1-putkeen (laimennus 1:20).
- 5 Sekoita DIL1 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Toisen laimennuksen valmisteleminen

- 1 Merkitse 2,0 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL2 (laimennus 2).
- 2 Siirrä 40 µl DIL1:tä tyhjään DIL2-putkeen.
- 3 Hävitä DIL1-putki.
- 4 Lisää 1 646 µl esijäähdytettyä HT1:tä DIL2-putkeen (laimennus 1:843).
- 5 Vorteksoi valmistettu 20 pM dPhiX ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 6 Lisää 16,7 µl valmistettua 20 pM dPhiX:ää DIL2-putkeen.
- 7 Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- 8 Lisää 1 300 µl DIL2:ta sulatettuun NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) -kasettiin.  
Katso lisätietoja *NextSeq 550Dx -laitteen viiteoppaasta (asiakirjanro 1000000009513)*.
- 9 Hävitä DIL2-putki.
- 10 Sentrifugoi NL PCR -levyä arvolla 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä -25 °C:n ja -15 °C:n välillä enintään 30 päivän ajan.
- 11 Jatka sekvensointiin.  
Katso lisätietoja *NextSeq 550Dx -laitteen viiteoppaasta (asiakirjanro 1000000009513)*.

## Patentit ja tavaramerkit

Tämä asiakirja ja sen sisältö ovat Illumina, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden ("Illumina") omaisuutta, ja ne on tarkoitettu ainoastaan Illuminan asiakkaiden sopimuskäyttöön tässä kuvattujen tuotteiden käyttöön liittyen eikä mihinkään muuhun tarkoitukseen. Tätä asiakirjaa ja sen sisältöä ei saa käyttää tai jakaa missään muussa tarkoituksessa ja/tai välittää, paljastaa tai jäljentää millään muulla tavoin ilman Illuminalta ennakkoon saatua kirjallista lupaa. Illumina ei tällä asiakirjalla luovuta mitään käyttöoikeuksia sen patentti-, tavaramerkki-, tekijänoikeus- tai tapaoikeuksien nojalla eikä vastaavien kolmansien osapuolten oikeuksien nojalla.

Tässä kuvattuja tuotteita saa käyttää vain pätevä ja asianmukaisesti koulutettu henkilökunta noudattamalla täsmällisesti tässä asiakirjassa annettuja ohjeita, jotta tuotteiden asianmukainen ja turvallinen käyttö voidaan taata. Asiakirjan sisältö on luettava ja ymmärrettävä kokonaisuudessaan ennen näiden tuotteiden käyttöä.

MIKÄLI TÄSSÄ ANNETTUJA OHJEITA EI LUETA JA TÄSMÄLLISESTI NOUDATETA, SEURAUKSENA VOI OLLA TUOTTEIDEN VAURIOITUMINEN, HENKILÖVAHINKOJA JOKO KÄYTTÄJILLE TAI MUILLE JA MUITA OMAISUUSVAHINKOJA, MINKÄ LISÄKSI TUOTTEITA MAHDOLLISESTI KOSKEVAT TAKUUT MITÄTÖITYVÄT.

ILLUMINA EI OLE VASTUUSSA TÄSSÄ KUVATTUJEN TUOTTEIDEN VÄÄRINKÄYTÖSTÄ (MUKAAN LUKIEN TUOTTEEN OSAT JA OHJELMISTO).

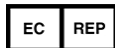
© 2022 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

Kaikki tavaramerkit ovat Illumina, Inc:n tai niiden vastaavien omistajien omaisuutta. Tarkemmat tavaramerkkitiedot annetaan osoitteessa [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Yhteystiedot



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A.  
+1 800 809.ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (Pohjois-Amerikan ulkopuolella)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

## Tuotteiden merkinnät

Katso tuotteen pakkauksessa ja merkinnöissä käytettyjen symbolien selitykset osoitteesta [support.illumina.com](http://support.illumina.com).