

# Labtracersingsformulier voor TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

BESTEMD VOOR IN-VITRODIAGNOSTIEK  
UITSLUITEND BEDOELD VOOR EXPORT

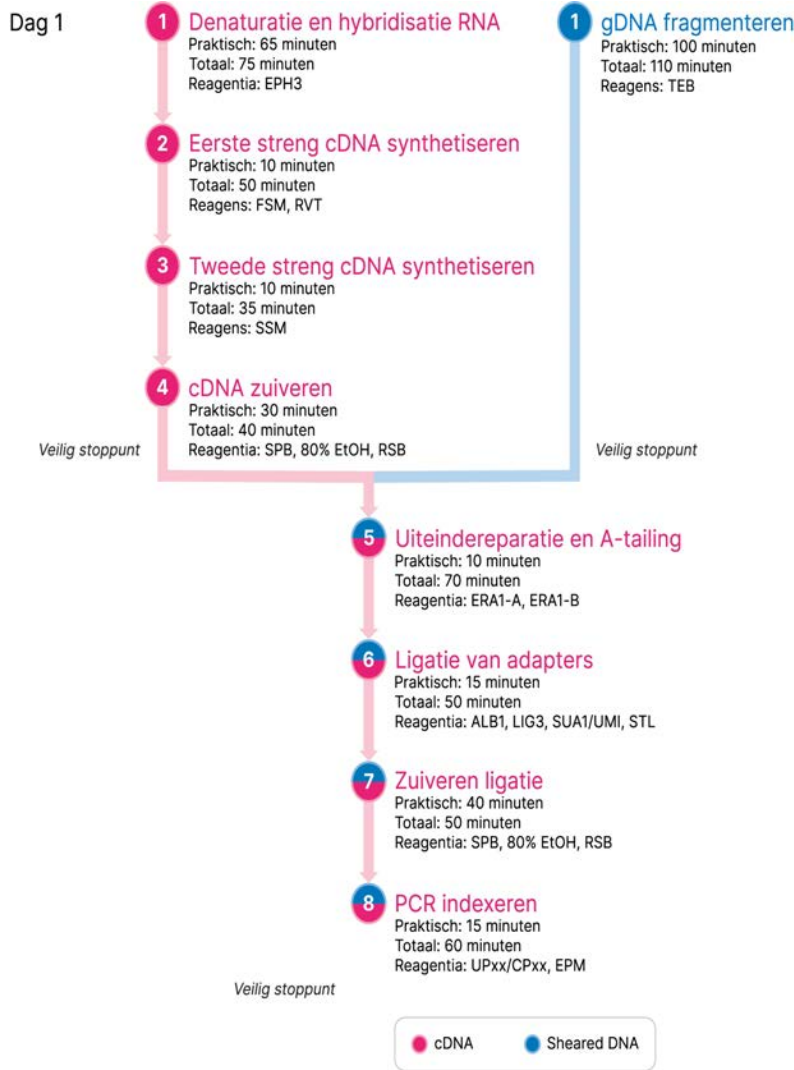
## Gebruiksaanwijzing

Een overzicht van de workflow van de TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive) wordt weergegeven in [Afbeelding 1](#) en [Afbeelding 2](#).

Voordat u met het protocol begint, moet u de waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen in de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documentnr. 200007789) volgen.

## Workflow voor bibliotheekvoorbereiding

Afbeelding 1 TSO Comprehensive Workflow (deel 1)



\* De praktische en totale tijdsduren zijn een schatting.

## Verrijking workflow

Afbeelding 2 TSO Comprehensive Workflow (deel 2)



● Verrijking ● Vorbereiding sequencing

## Thermocyclers programmeren

- 1 Sla voordat u begint met de assay de volgende programma's op thermocyclers voor pre-amplificatie en post-amplificatie op.

Tabel 1 Thermocyclerprogramma's voor pre-amplificatie

Procedurestap	Programmanaam	Dekseltemperatuur	Reactievolumen	Thermocyclerparameters
Denaturatie en hybridisatie RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 65 °C gedurende 5 minuten</li> <li>• 4 °C gedurende 1 minuut</li> <li>• 4 °C vasthouden</li> </ul>
Eerste streng cDNA synthetiseren	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 °C gedurende 10 minuten</li> <li>• 42 °C gedurende 15 minuten</li> <li>• 70 °C gedurende 15 minuten</li> <li>• 4 °C gedurende 1 minuut</li> <li>• 4 °C vasthouden</li> </ul>
Tweede streng cDNA synthetiseren	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 16 °C gedurende 25 minuten</li> <li>• 4 °C gedurende 1 minuut</li> <li>• 4 °C vasthouden</li> </ul>

Als de dekseltemperatuur voor 2ndSS niet kan worden ingesteld op 30 °C, moet de optie voor voorverwarmd deksel worden uitgeschakeld.

Tabel 2 Thermocyclerprogramma's voor post-amplificatie

Procedurestap	Programmanaam	Dekseltemperatuur	Reactievolumen	Thermocyclerparameters
PCR indexeren	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C gedurende 30 seconden</li> <li>• 15 cycli van: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C gedurende 10 seconden</li> <li>• 60 °C gedurende 30 seconden</li> <li>• 72 °C gedurende 30 seconden</li> </ul> </li> <li>• 72 °C gedurende 5 minuten</li> <li>• 10 °C vasthouden</li> </ul>
Eerste hybridisatie uitvoeren	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C gedurende 10 minuten</li> <li>• 85 °C gedurende 2 min 30 seconden</li> <li>• 75 °C gedurende 2 min 30 seconden</li> <li>• 65 °C gedurende 2 min en 30 seconden</li> <li>• 57 °C aanhouden gedurende 8 tot 24 uur</li> </ul>
Tweede hybridisatie uitvoeren	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C gedurende 10 minuten</li> <li>• 85 °C gedurende 2 min 30 seconden</li> <li>• 75 °C gedurende 2 min 30 seconden</li> <li>• 65 °C gedurende 2 min 30 seconden</li> <li>• 57 °C aanhouden gedurende 1,5 tot 4 uur</li> </ul>

Procedurestap	Programmanaam	Dekseltemperatuur	Reactievolumen	Thermocyclerparameters
Verrijkte bibliotheek amplificeren	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C gedurende 30 s</li> <li>• 18 cycli van: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C gedurende 10 s</li> <li>• 60 °C gedurende 30 s</li> <li>• 72 °C gedurende 30 s</li> </ul> </li> <li>• 72 °C gedurende 5 min</li> <li>• 10 °C vasthouden</li> </ul>

## Runinformatie invoeren

NextSeq 550Dx instrument Local Run Manager is de software die wordt gebruikt om een TSO Comprehensive-run in te stellen. Raadpleeg voor meer informatie de *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (documentnr. 200008661)*.

Voer de configuratie-informatie voor de run en het monster direct in de analysemodule van TruSight Oncology Comprehensive in.

### Runparameters instellen

- 1 Log in bij Local Run Manager op het instrument of vanaf een netwerkcomputer.
- 2 Selecteer **Create Run** (Run aanmaken) en daarna **TSO Comp (EU)**.
- 3 Voer een runnaam in die de run van sequencing tot en met analyse identificeert. De naam moet voldoen aan de volgende criteria.
  - ▶ 1–40 karakters.
  - ▶ Alleen alfanumerieke karakters, underscores (lage streepjes) of koppeltekens.
  - ▶ Underscores en koppeltekens moeten worden voorafgegaan en gevolgd door een alfanumeriek karakter.
  - ▶ Uniek bij alle runs op het instrument.
- 4 **[Optioneel]** Voer een runbeschrijving in om de run te helpen identificeren en gebruik daarbij de volgende criteria.
  - ▶ 1–150 karakters.
  - ▶ Alleen alfanumerieke karakters of spaties.
  - ▶ Spaties moeten worden voorafgegaan en gevolgd door een alfanumeriek karakter.

### Monsters voor de run specificeren

Specificeer monsters voor de run op een van de volgende manieren.

- ▶ **Monsters handmatig invoeren:** gebruik de lege tabel in het scherm Create Run (Run aanmaken).
- ▶ **Monsters importeren:** navigeer naar een extern bestand met een kommagescheiden (\*.csv) indeling. In het scherm Create Run (Run aanmaken) kan een sjabloon worden gedownload.



LET OP

Verkeerde combinaties tussen de monsters en indexprimers veroorzaken onjuiste resultaatrapportage als gevolg van verlies van positieve monsteridentificatie. Voer monster-ID's in en wijs indexen toe in Local Run Manager voordat u met de bibliotheekpreparatie begint. Registreer ter referentie monster-ID's, indexen en plaats van de plaatwells tijdens de bibliotheekpreparatie.



LET OP

Controleer, om gegevensverlies te voorkomen, of er geen installatie van een kennisbank gaande is voordat een run wordt opgeslagen.

### Monsters handmatig invoeren

- 1 Voer een unieke monster-ID in in het veld Sample ID en pas daarbij de volgende criteria toe. **Alle controlemonsters moeten eerst worden toegevoegd.** Zie [Controlemonsters op pagina 7](#) voor meer informatie.
  - ▶ 1–25 tekens.
  - ▶ Alleen alfanumerieke karakters, underscores (lage streepjes) of koppeltekens.
  - ▶ Underscores en koppeltekens moeten worden voorafgegaan en gevolgd door een alfanumeriek karakter.
- 2 **[Optioneel]** Voer in het veld Sample Description een monsterbeschrijving in en pas daarbij de volgende criteria toe.
  - ▶ 1–50 tekens.
  - ▶ Alleen alfanumerieke karakters, koppeltekens, underscores of spaties.
  - ▶ Spaties, underscores en koppelstreepjes moeten worden voorafgegaan en gevolgd door een alfanumeriek karakter.
- 3 Selecteer een index voor de DNA library en/of RNA library die uit het monster is bereid. Zorg dat RNA- en DNA-monsters in afzonderlijke kolommen staan. Het veld DNA i7+i5 Sequence wordt automatisch ingevuld nadat een DNA-index-ID is geselecteerd. Het veld RNA i7+i5 Sequence wordt automatisch ingevuld nadat een RNA-index-ID is geselecteerd. Raadpleeg naast deze samenvatting de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documentnr. 200007789) voor index-ID-selectie.
  - ▶ Voor een DNA library selecteert u een unieke index-ID (UPxx- of CPxx-indexen) in de vervolgkeuzelijst DNA Index ID.
  - ▶ Voor een RNA library selecteert u een unieke index-ID (alleen UPxx) in de vervolgkeuzelijst RNA Index ID.
  - ▶ Als de run in totaal drie bibliotheken heeft, volgt u de richtlijnen voor indexselectie in de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documentnr. 200007789).
- 4 Wijs met behulp van het veld Tumor Type een tumortype toe voor elk monster, en selecteer daarbij het meest specifieke tumortype dat beschikbaar is. Zie [Een tumortype selecteren op pagina 7](#)
- 5 Wijs met behulp van het veld Tumor Type voor elke controle een van de volgende controletypen toe. Zie [Controlemonsters op pagina 7](#).
  - DNA External Control (DNA-externe controle)
  - RNA External Control (RNA-externe controle)
  - DNA No-Template Control (DNA-amplificatiereagenscontrole)
  - RNA No-Template Control (RNA-amplificatiereagenscontrole)

Indien de Consumable Prefix DNA Control (Voorvoegsel verbruiksartikel DNA-controle) wordt gebruikt, is het controletype DNA External Control (DNA-externe controle). Indien de Consumable Prefix RNA Control (Voorvoegsel verbruiksartikel RNA-controle) wordt gebruikt, is het controletype RNA External Control (RNA-externe controle).
- 6 Wijs het geslacht toe.
- 7 **[Optioneel]** Selecteer **Export to CSV** (Exporteren naar CSV) om monsterinformatie naar een extern bestand te exporteren.
- 8 Controleer de informatie op het scherm Create Run (Run aanmaken). Onjuiste informatie kan de resultaten beïnvloeden.
- 9 Selecteer **Save Run** (Run opslaan).

### Monsters importeren

- 1 Selecteer **Import CSV** (CSV importeren) en blader naar de locatie van het monsterinformatiebestand. U kunt twee soorten bestanden importeren.
  - Selecteer **Download CSV** (CSV downloaden) op het scherm Create Run (Run aanmaken) om een nieuw monsterinformatiesjabloon te downloaden. Het CSV-bestand bevat de vereiste kolomkoppen en de vereiste opmaak om te importeren. Voer in elke kolom monsterinformatie in voor de monsters in de run. Voer in de

kolom Tumor Type de tumortypeterm of de code ervan in (zie [Tumortypen downloaden op pagina 1](#)). Met het veld Tumor Type kunnen ook monsters als controles worden toegewezen (zie [Controlemonsters op pagina 7](#)).

- Gebruik een bestand met monsterinformatie dat is geëxporteerd uit de TSO Comprehensive-analysemodule met behulp van de functie Export to CSV.
- 2 Controleer de geïmporteerde informatie op het scherm Create Run (Run aanmaken). Onjuiste informatie kan de resultaten beïnvloeden.
- 3 **[Optioneel]** Selecteer **Export to CSV** (Exporteren naar CSV) om monsterinformatie naar een extern bestand te exporteren.
- 4 Selecteer **Save Run** (Run opslaan).

#### Controlemonsters

Voor TSO Comprehensive is het gebruik van panelcontrole nodig. Door een monster toe te wijzen als controle wordt Sex (Geslacht) van het monster automatisch op Unknown (Onbekend) gezet. Om een monster als controle toe te wijzen, selecteert u een van de vier controletypes in het veld Tumor Type (Tumortype): DNA External Control (DNA-externe controle), DNA No-Template Control (DNA-amplificatiereagenscontrole), RNA External Control (RNA-externe controle) of RNA No-Template Control (RNA-amplificatiereagenscontrole). Zie [Een tumortype selecteren op pagina 7](#) voor meer informatie over het instellen van tumortypes voor alle soorten monsters tijdens het instellen van een run.

Binnen een run mag er van elk controletype slechts één worden gespecificeerd. Voor een DNA External Control of een DNA No-Template Control mag alleen een DNA-bibliotheek worden gespecificeerd. Voor een RNA External Control of een RNA No-Template Control mag alleen een RNA-bibliotheek worden gespecificeerd. Bibliotheken die worden toegewezen als DNA of RNA No-Template Controls worden niet meegeteld voor het maximale aantal bibliotheken in een run.

#### Een tumortype selecteren

Voor elk monster moet een tumortype worden gespecificeerd. Met uitzondering van de controletypes, zijn de beschikbare tumortypes afgeleid van de geïnstalleerde Knowledge Base (Kennisbank - KB) en kunnen deze na updates van de KB veranderen.

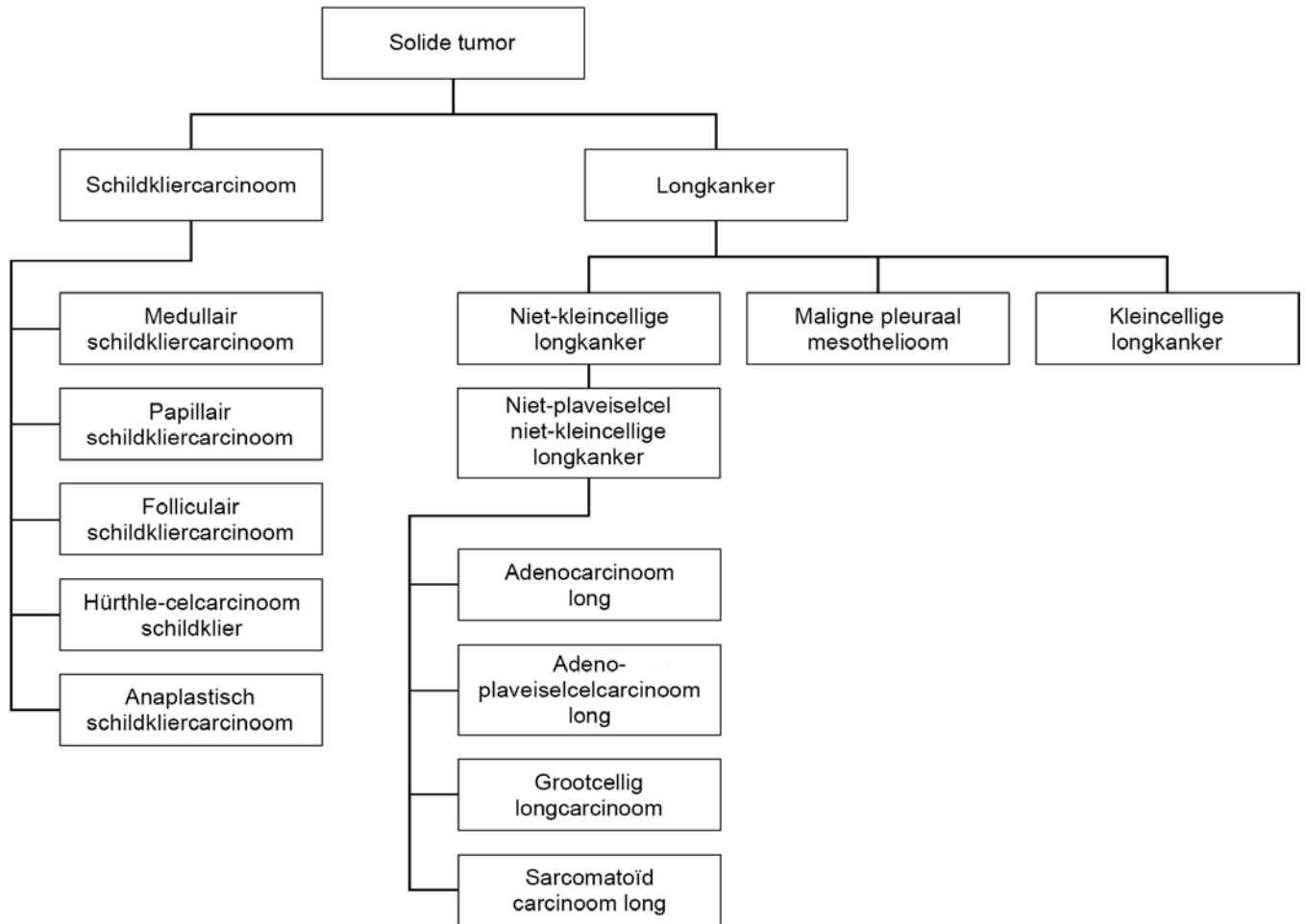


#### LET OP

Een onjuiste selectie van het tumortype kan onjuiste resultaten veroorzaken. Handel eventuele waarschuwingen die verschijnen bij het specificeren van de tumortypes af om analysefouten te voorkomen.

De tumortypetermen maken deel uit van een hiërarchische ziekte-ontologie in de KB, die is opgemaakt als een set ouder/kind-relaties. De term niet-kleincellige longkanker is bijvoorbeeld een kind van longkanker, aangezien niet-kleincellige longkanker een soort longkanker is. [Afbeelding 3](#) laat een subset van een voorbeeldziekte-ontologie zien, waarbij 'Solid tumor' (Solide tumor) wordt getoond als de grondterm, plus de termen die worden geassocieerd met longkanker en schildklierkanker (andere tumortypen worden niet getoond). Een term die via de ouder/kind-relaties verbonden is met lager liggende termen wordt een voorouder genoemd. De gekoppelde lager liggende termen zijn afstammelingen van de voorouderterm. Longkanker is bijvoorbeeld een voorouder van adenocarcinoom van de long en kleincellige longkanker, en medullair schildklier carcinoom is een afstammeling van zowel schildklier carcinoom als solide tumor.

Afbeelding 3 Subset van een voorbeeldziekte-ontologie



Het geselecteerde tumortype voor een patiëntmonster heeft invloed op:

- ▶ Welke voor begeleidende diagnostiek beoogde gebruiken worden geëvalueerd voor het monster. Alleen patiëntmonsters met een tumortype dat een exacte match met of een afstamming is van het tumortype voor een voor begeleidende diagnostiek beoogd gebruik zullen worden geëvalueerd voor die claim.
- ▶ Welke tumorprofielerende varianten worden opgenomen in het TSO Comprehensive-rapport.

De volgende instructies beschrijven het selecteren van een tumortype via het scherm Create Run (Run aanmaken). Het tumortype kan ook worden ingesteld door een csv-bestand te importeren dat een tumortype bevat (zie [Monsters importeren op pagina 6](#)).

- 1 De beschikbare tumortypen zijn weer te geven door te dubbelklikken in de cel Tumor Type in de rij voor het monster. De beschikbare tumortypen worden in een alfabetisch gerangschikte hiërarchische lijst weergegeven. Met het veld Tumor Type kan ook een controletype voor controlemonsters worden toegewezen (zie [Controlemonsters op pagina 7](#)).
- 2 Zoek en selecteer het gewenste tumortype door de lijst te gebruiken of met behulp van de zoekbalk bovenin het scherm Tumor Type.

## Vorbereiden op protocolstappen

- 1 Ontsmet de werkgebieden grondig met een RNase/DNase-remmend reinigingsmiddel.



**LET OP**

Alle procedures in de workflow vereisen een RNase/DNase-vrije omgeving.

- 2 Stel de thermocyclerprogramma's voorafgaand aan de amplificatie in. Raadpleeg *Thermocyclers programmeren op pagina 4*.
- 3 Volg de instructies van de fabrikant om de ultrasonicator in te stellen.
- 4 Ga bij het verwerken van alleen DNA-monsters direct verder naar *gDNA fragmenteren op pagina 13*.
- 5 Verwijder de RNA-controles uit de opslag.
- 6 Verwijder de reagensbuisjes uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 3 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (onderdeelnr. 20031127)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
EPH3	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Denaturatie en hybridisatie RNA
FSM	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste streng cDNA synthetiseren
RVT	-25 °C tot -15 °C	Bewaar op ijs.	Eerste streng cDNA synthetiseren
SSM	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede streng cDNA synthetiseren

Tabel 4 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (onderdeelnr. 20031119)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SPB (lichtgroen label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	cDNA zuiveren
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	cDNA zuiveren

## Denaturatie en hybridisatie RNA

### Vorbereiden

- 1 Prepareer de volgende reagentia.
  - ▶ EPH3—Zet opzij.
  - ▶ FSM—Vortex om te mengen. Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Inspecteer op bezinksel. Indien aanwezig, pipetteren om te mengen tot het bezinksel is opgelost.
  - ▶ RVT—Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Bewaar op ijs.

**OPMERKING** RVT is een viskeuze oplossing. Pipetteer altijd langzaam om de vorming van luchtballen te voorkomen.

- 2 Combineer de volgende volumes in een microcentrifugebuisje om een FSM+RVT-mastermengsel te bereiden:

Tabel 5 FSM+RVT-mastermengsel

Mastermengselcomponent	3 RNA-monsters (µl)	8 RNA-monsters (µl)	16 RNA-monsters (µl)	24 RNA-monsters (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

Deze tabel bevat het volumeoverschot. Zie het gedeelte Reagentia hanteren van de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU) (documentnr. 200007789)* voor berekeningen.

- 3 Pipetteer tien keer om te mengen.
- 4 Plaats het FSM+RVT-mastermengsel op ijs tot *Eerste streng cDNA synthetiseren op pagina 10*.

### Procedure

- 1 Ontdooi de geëxtraheerde RNA-monsters en RNA-controles op ijs.  
Verwerk de RNA-controles als monsters voor de rest van het protocol.

Zie de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documentnr. 200007789) om monsters te kwantificeren.

- 2 Pipetteer elk RNA-monster 10 keer om te mengen.
- 3 Gebruik RNase/DNase-vrij water om 40 ng van elk RNA-monster te bereiden tot een definitief volume van 8,5 µl (4,7 ng/µl).  
Gebruik voor RNA-controles de concentratie die staat vermeld in de buisjestabel.
- 4 Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'CF' (cDNA-fragmenten).
- 5 Voeg 8,5 µl van elk RNA-monster toe aan een unieke well van de CF PCR-plaat.
- 6 Zorg dat de plaatlay-out en indexen voor elk monster overeenkomen met de run die is gepland in Local Run Manager tijdens het instellen van de run.
- 7 Vortex EPH3 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 8 Voeg 8,5 µl EPH3 toe aan elke monsterwell.
- 9 Breng klevende plaatafdichting aan op de CF PCR-plaat.



LET OP

Zorg dat de randen en wells volledig zijn afgedicht om evaporatie te voorkomen.

- 10 Schud 1 minuut lang bij 1200 tpm.
- 11 Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
- 12 Plaats op de thermocycler en voer het LQ-RNA-programma uit.  
Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 4.
- 13 Wanneer het monster 4 °C bereikt, dit 1 minuut vasthouden en vervolgens onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.

## Eerste streng cDNA synthetiseren

### Procedure

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Verwijder de CF PCR-plaat uit de thermocycler.
- 2 Pipetteer 5 keer om het FSM+RVT-mastermengsel te mengen.
- 3 Voeg 8 µl FSM+RVT-mastermengsel toe aan elke monsterwell.
- 4 Pipetteer 5 keer om te mengen.
- 5 Gooi resterend FSM+RVT-mastermengsel weg.
- 6 Breng klevende plaatafdichting aan op de CF PCR-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- 7 Schud 1 minuut lang bij 1200 tpm.
- 8 Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
- 9 Plaats op een thermocycler en voer het 1stSS-programma uit.  
Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 4.
- 10 Wanneer de monsters 4 °C bereiken, moet u onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.  
De monster van de eerste streng kunnen maximaal 5 minuten worden bewaard bij 4 °C.

## Tweede streng cDNA synthetiseren

### Vorbereiden

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Bereid het volgende reagens voor.
  - ▶ SSM—Inverteer 10 keer om te mengen. Centrifugeer kort.

### Procedure

- 1 Verwijder de CF PCR-plaat uit de thermocycler.

- 2 Voeg 25 µl SSM toe aan elke monsterwell.
- 3 Breng klevende plaatafdichting aan op de CF PCR-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- 4 Schud 1 minuut lang bij 1200 tpm.
- 5 Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
- 6 Plaats op een thermocycler en voer het 2ndSS-programma uit.  
Raadpleeg *Thermocyclers programmeren op pagina 4*.
- 7 Wanneer het monster 4 °C bereikt, dit 1 minuut vasthouden en vervolgens onmiddellijk doorgaan naar de volgende stap.

## cDNA zuiveren

### Vorbereiden

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Prepareer de volgende reagentia.
  - ▶ SPB—Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
  - ▶ RSB—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
- 2 Bereid verse 80% EtOH in een conisch buisje van 15 ml of 50 ml.

Reagens	3 monsters	8 monsters	16 monsters	24 monsters
100% ethanolalcohol, puur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-vrij water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Vortex verse 80% EtOH om te mengen.
- 4 Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat als 'BIND1' (cDNA-binding).
- 5 Dek af en zet opzij.
- 6 Pak de magneet.

### Procedure

#### Binden

- 1 Verwijder de CF PCR-plaat uit de thermocycler.
- 2 Vortex de SPB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
- 3 Voeg onmiddellijk 90 µl SPB toe aan elke monsterwell van de BIND1 MIDI-plaat.  
Als een bak wordt gebruikt om SPB te doseren, neem dan een overmaatfactor van 1,05 op bij het aliquoteren van voldoende materiaal per monster. Gooi resterend materiaal weg nadat de SPB is toegevoegd aan elke monsterwell.
- 4 Breng het volledige volume (50 µl) van elk monster over van de CF PCR-plaat naar de overeenkomende well van de BIND1 MIDI-plaat.
- 5 Gooi de lege CF PCR-plaat weg.
- 6 Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND1 MIDI-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 7 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 8 Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur.
- 9 Plaats de BIND1 MIDI-plaat gedurende 5 minuten op een magnetische standaard.
- 10 Gebruik een P200-pipet ingesteld op 200 µl om alle supernatans te verwijderen uit elke monsterwell zonder het parelpetlet te verstoren en gooi dit weg.

Wassen

- 1 Was de parels als volgt.
  - a Houd ze op de magnetische standaard en voeg 200 µl verse 80% EtOH toe aan elke well.
  - b Wacht 30 seconden.
  - c Verwijder alle supernatans uit de wells en gooi dit weg.
- 2 Was de parels een **tweede** keer.
- 3 Verwijder resterend EtOH uit elke well.  
Gebruik een P20-pipet met fijne tips.
- 4 Gooi ongebruikte 80% EtOH weg.

Elueren

- 1 Verwijder de BIND1 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
- 2 Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
- 3 Voeg 22 µl RSB toe aan elke monsterwell.
- 4 Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND1 MIDI-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 5 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 6 Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur.
- 7 Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
- 8 Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'PCF' ('Purified cDNA Fragments', gezuiverde cDNA-fragmenten).  
Gebruik een PCR-plaat als u stopt bij het **VEILIG STOPPUNT** op pagina 12.
- 9 Breng 20 µl eluaat over van elke monsterwell van de BIND1 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de PCF-plaat.
- 10 Gooi de lege BIND1 MIDI-plaat weg.
- 11 Voeg 30 µl RSB toe aan elke monsterwell van de PCF-plaat.
- 12 Pipetteer 10 keer om te mengen.
- 13 Breng klevende plaatafdichting aan op de PCF-plaat en bewaar deze op ijs.
- 14 Breng de EPH3, FSM, RVT en SSM terug naar de opslag.
- 15 Als u alleen monsters verwerkt die zijn afgeleid van RNA (cDNA) en niet stopt bij het veilige stoppunt, ga dan door naar **Uiteindereparatie en A-tailing** op pagina 15.

**VEILIG STOPPUNT**

Als u stopt, moet u de PCF PCR-plaat 1 minuut lang op 280 × g centrifugeren en bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 7 dagen.

Einddatum en -tijd \_\_\_\_\_

Voorbereiden op protocolstappen

- 1 Verwijder de DNA-controles uit de opslag.
- 2 Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 6 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (onderdeelnr. 20031119)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
TEB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	gDNA fragmenteren

## gDNA fragmenteren

### Vorbereiding

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Zorg ervoor dat u de aanbevelingen in de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU) (documentnr. 200007789)* opvolgt om monsters te kwantificeren.
- 2 Bereid het volgende reagens voor.
  - ▶ TEB—Inverteer of vortex om te mengen.

### Procedure

De plaat voorbereiden

- 1 **Selecteer een van de volgende drie opties om de plaat voor te bereiden.**
  - ▶ **Optie 1:** Verwerk gDNA-monsters tegelijkertijd met cDNA-monsters in de PCF MIDI-plaat.
    - a Label de PCF MIDI-plaat met 'LP' ('Library Preparation', bibliotheekpreparatie).
    - b Plaats op ijs en zet opzij voor gebruik bij *Gefragmenteerd DNA overbrengen op pagina 14*.
  - ▶ **Optie 2:** Verwerk gDNA-monsters tegelijkertijd met cDNA-monsters en de PCF PCR-plaat is bevroren.
    - a Ontdooi de PCF PCR-plaat tot kamertemperatuur.
    - b Centrifugeer 1 minuut lang op 280 x g.
    - c Pipetteer 10 keer om te mengen.
    - d Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'LP' ('Library Preparation', bibliotheekpreparatie).
    - e Breng de volledige hoeveelheid van 50 µl van elk monster over van de PCF PCR-plaat naar de overeenkomende well van de LP MIDI-plaat.
    - f Gooi de PCF PCR-plaat weg.
    - g Breng klevende plaatafdichting aan en plaats op ijs tot *Gefragmenteerd DNA overbrengen op pagina 14*.
  - ▶ **Optie 3:** Verwerk alleen gDNA-monsters.
    - a Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'LP' ('Library Preparation', bibliotheekpreparatie).
    - b Gebruik een PCR-plaat als u stopt bij het *VEILIG STOPPUNT op pagina 14*.
    - c Dek af en zet opzij voor gebruik bij *Gefragmenteerd DNA overbrengen op pagina 14*.

gDNA verdunnen

- 1 Ontdooi de gDNA-monsters en DNA-controles bij kamertemperatuur.  
Verwerk de DNA-controles net als monsters voor de rest van het protocol.
- 2 Pipetteer elk gDNA-monster 10 keer om te mengen.
- 3 Centrifugeer het buisje kort om druppels te verzamelen.
- 4 Inverteer of vortex de TEB om te mengen.
- 5 Gebruik TEB om 40 ng van elk gDNA-monster voor te bereiden in een uiteindelijk volume van 52 µl (0,77 ng/µl).  
De test vereist een minimale extractieconcentratie van 3,33 ng/µl om minimaal 40 µl TEB van het volume van 52 µl mogelijk te maken. Gebruik voor DNA-controles de concentratie die op het label van het buisje staat vermeld.  
Pipetteer om monsterverlies te voorkomen niet minder dan 2 µl monster in deze verdunning.

Fragmenteren

- 1 Voeg 52 µl van elk gDNA-monster toe aan een afzonderlijke well van het ultrasonicatorbuisje.
- 2 Noteer de oriëntatie van de strip.
- 3 Fragmenteer gDNA met een ultrasonicator tot fragmenten.

Gefragmenteerd DNA overbrengen

- 1 Zorg dat de plaatlay-out en indexen voor elk monster overeenkomen met de run die is gepland in Local Run Manager tijdens het instellen van de run.
- 2 Volg de instructies van de fabrikant van de ultrasonicator om het monster te herstellen.  
Bij sommige buistypes voor de ultrasonicator kan centrifugeren nodig zijn om het monster in het buisje te consolideren.
- 3 Gebruik bij elk gefragmenteerd gDNA-monster een P20-pipet met fijne tips om 3 overdrachten van 16,7 µl naar een lege well van de LP MIDI-plaat uit te voeren.
- 4 Breng klevende plaatafdichting aan op de LP MIDI-plaat.

**VEILIG STOPPUNT**

Als u stopt moet u klevende plaatafdichting aanbrengen op de LP PCR-plaat en deze 1 minuut lang centrifugeren op 280 x g. Bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 7 dagen.

Einddatum en -tijd \_\_\_\_\_

**Voorbereiden op protocolstappen**

- 1 Bereid een ijsemmer voor.
- 2 Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 7 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (onderdeelnr. 20031118)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
ERA1-A	-25 °C tot -15 °C	Bewaar op ijs.	Uiteindereparatie en A-tailing
ERA1-B	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Uiteindereparatie en A-tailing
ALB1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
LIG3	-25 °C tot -15 °C	Bewaar op ijs.	Ligatie van adapters
SUA1 (blauwe dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
UMI (witte dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
STL	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Ligatie van adapters
EPM	-25 °C tot -15 °C	Bewaar op ijs.	PCR indexeren

Tabel 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (onderdeelnr. 20031119)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SPB (lichtgroen label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Zuiveren ligatie
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Zuiveren ligatie

Tabel 9 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (onderdeelnr. 20031120)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
UPxx	-25 °C tot -15 °C	Ontdooi de betreffende indexprimerbuisjes tot kamertemperatuur.	PCR indexeren

Tabel 10 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (onderdeelnr. 20031126)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
CPxx	-25 °C tot -15 °C	Ontdooi de betreffende indexprimerbuisjes tot kamertemperatuur.	PCR indexeren

## Uiteindereparatie en A-tailing

### Vorbereiden

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Verwarm als volgt 2 micromonsterincubators voor met MIDI-verwarmingsblokinzetten.
  - ▶ Verwarm een micromonsterincubator voor tot 30 °C.
  - ▶ Verwarm een micromonsterincubator voor tot 72 °C.
- 2 Prepareer de volgende reagentia.
  - ▶ ERA1-A—Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Bewaar op ijs.
  - ▶ ERA1-B—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren. Inspecteer op bezinksel. Verwarm het buisje, indien aanwezig, tot 37 °C en daarna pipetteren om te mengen tot het bezinksel is opgelost.
- 3 Bereid een ERA1-mastermengsel voor in een microcentrifugebuisje.

Tabel 11 ERA1-mastermengsel

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

Deze tabel bevat het volumeoverschot. Zie het gedeelte Reagentia hanteren van de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documentnr. 200007789) voor berekeningen.

- 4 Pipetteer langzaam 10 keer om te mengen, centrifugeer kort en plaats vervolgens het ERA1-mastermengsel op ijs.
- 5 Selecteer uit de volgende twee opties de geschikte optie om de plaat voor te bereiden.
  - ▶ **Optie 1:** Indien monsters in een MIDI-plaat zitten.
    - a Label de MIDI-plaat opnieuw, nu met 'LP2' ('Library Preparation 2', bibliotheekpreparatie 2). Wanneer sommige monster in afzonderlijke MIDI-platen zitten, moeten alle monsters naar afzonderlijke wells van dezelfde MIDI-plaat worden overgebracht volgens de plaatlay-out.
  - ▶ **Optie 2:** Indien de plaat bevroren is.
    - a Ontdooi de PCF PCR-plaat of de LP PCR-plaat tot kampertemperatuur.
    - b Centrifugeer de plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.
    - c Pipetteer 10 keer om te mengen.
    - d Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'LP2' ('Library Preparation 2', bibliotheekpreparatie 2).
    - e Breng de volledige hoeveelheid van 50 µl van elk monster over van de PCF PCR-plaat of de LP PCR-plaat naar de overeenkomende well van de LP2 MIDI-plaat.
    - f Gooi de PCF PCR- of de LP PCR-plaat weg.

### Procedure

- 1 Voeg 10 µl ERA1-mastermengsel toe aan elke monsterwell in de LP2 MIDI-plaat.
- 2 Gooi resterend ERA1-mastermengsel weg.
- 3 Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat. Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- 4 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 5 Incubeer in de voorverwarmde micromonsterincubator bij 30 °C gedurende 30 minuten.
- 6 Breng onmiddellijk over naar een tweede, voorverwarmde micromonsterincubator en incubeer bij 72 °C gedurende 20 minuten.
- 7 Plaats de LP2 MIDI-plaat op ijs gedurende 5 minuten.

## Ligatie van adapters

In dit proces worden adapters geligeerd aan de uiteinden van de cDNA- en/of gDNA-fragmenten. De TSO Comprehensive-assay omvat SUA1-adapters en UMI-adapters.

- ▶ Gebruik SUA1-adapters bij RNA-monsters.
- ▶ Gebruik UMI-adapters bij DNA-monsters.

### Preparatie

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Prepareer de volgende reagentia.
  - ▶ ALB1—Vortex minimaal 10 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ LIG3—Kort centrifugeren en daarna pipetteren om te mengen. Bewaar op ijs.
  - ▶ SUA1—Vortex minimaal 10 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ UMI—Vortex minimaal 10 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ STL—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.

### Procedure

- 1 Haal de LP2 MIDI-plaat van het ijs.
- 2 Voeg 60 µl ALB1 toe aan elke monsterwell van de LP2 MIDI-plaat. Pipetteer daarbij langzaam.
- 3 Voeg 5 µl LIG3 toe aan elke monsterwell.
- 4 Voeg de adapters toe.
 

Verschillende soorten adapters **niet** met elkaar combineren.

  - RNA-monsterwells—10 µl SUA1 (blauwe dop) bij elk monster afgeleid van RNA.
  - DNA-monsterwells—10 µl UMI (witte dop) bij elk monster afgeleid van DNA.
- 5 Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat. Dicht de randen en wells volledig af.
- 6 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 7 Incubeer gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.
- 8 Vortex de STL om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 9 Voeg 5 µl STL toe aan elke monsterwell van de LP2 MIDI-plaat.
- 10 Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat. Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- 11 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.

## Zuiveren ligatie

### Vorbereiden

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Prepareer de volgende reagentia.
  - ▶ SPB—Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
  - ▶ RSB—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
- 2 Bereid verse 80% EtOH in een conisch buisje van 15 ml of 50 ml.

Reagens	3 bibliotheken	8 bibliotheken	16 bibliotheken	24 bibliotheken	48 bibliotheken
100% ethanolalcohol, puur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-vrij water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Vortex verse 80% EtOH om te mengen.
- 4 Pak de magneet.



## Procedure

### Binden

- 1 Vortex de SPB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
- 2 Voeg onmiddellijk 112 µl SPB toe aan elke monsterwell van de LP2 MIDI-plaat.  
Als een bak wordt gebruikt om SPB te doseren, neem dan een overmaatfactor van 1,05 op bij het aliquoteren van voldoende materiaal per monster. Gooi resterend materiaal weg nadat de SPB is toegevoegd aan elke monsterwell.
- 3 Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 4 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 5 Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur.
- 6 Plaats de LP2 MIDI-plaat gedurende 10 minuten op de magnetische standaard.
- 7 Gebruik een P200-pipet ingesteld op 200 µl om alle supernatans te verwijderen uit elke monsterwell zonder het parelpetlet te verstoren en gooi dit weg.

### Wassen

- 1 Was de parels als volgt.
  - a Houd ze op de magnetische standaard en voeg 200 µl verse 80% EtOH toe aan elke monsterwell.
  - b Wacht 30 seconden.
  - c Verwijder alle supernatans uit elke well zonder het parelpetlet te verstoren en gooi dit weg.
- 2 Was de parels een **tweede** keer.
- 3 Verwijder resterend EtOH uit elke well.  
Gebruik een P20-pipet met fijne tips.
- 4 Gooi ongebruikte 80% EtOH weg.

### Elueren

- 1 Verwijder de LP2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
- 2 Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
- 3 Voeg 27,5 µl RSB toe aan elke monsterwell.
- 4 Breng klevende plaatafdichting aan op de LP2 MIDI-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 5 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 6 Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur.
- 7 Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
- 8 Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'LS' ('Library Samples', bibliotheekmonsters).
- 9 Breng 25 µl van elk eluaat over van de LP2 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de LS PCR-plaat.
- 10 Gooi de lege LP2 MIDI-plaat weg.
- 11 Breng klevende plaatafdichting aan op de LS PCR-plaat.

## PCR indexeren

### Vorbereiden

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Prepareer de volgende reagentia.
  - ▶ EPM—Bewaar op ijs.
  - ▶ UPxx—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren. UPxx is de indexprimer die tijdens het instellen van de run is geselecteerd op het scherm 'Create Run' (Run aanmaken) in de Local Run Manager-software.

- ▶ CPxx—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren. CPxx is de indexprimer die tijdens het instellen van de run is geselecteerd op het scherm 'Create Run' (Run aanmaken) in de Local Run Manager-software.
- 2 Zorg dat de indexen voor elk monster overeenkomen met de run die is gepland in Local Run Manager tijdens het instellen van de run. Volg de instructies voor indexselectie in de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documentnr. 200007789).



**LET OP**

Verkeerde combinaties tussen monsters en indexeringsprimers veroorzaken onjuiste resultaatrapportages vanwege een verlies van positieve monsteridentificatie.

### Procedure

- 1 Voeg 5 µl van de geschikte indexprimer (UPxx of CPxx) toe aan de overeenkomende monsterwell in de LS PCR-plaat in overeenstemming met de indexen die tijdens het instellen van de run zijn geselecteerd op het scherm 'Create Run' (Run aanmaken) in de Local Run Manager-software.



**LET OP**

Hanteer en open slechts één indexprimerbuisje per keer. Doe na gebruik onmiddellijk de dop terug op elk indexbuisje. Combineer indexprimers niet met elkaar.

- 2 Vortex de EPM 5 seconden om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 3 Voeg 20 µl EPM toe aan elke monsterwell.
- 4 Breng klevende plaatafdichting aan op de LS PCR-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- 5 Schud 1 minuut lang bij 1200 tpm.
- 6 Breng de pre-amplificatiereagentia terug naar de opslag.



**LET OP**

Voer alle daaropvolgende stappen uit in een post-amplificatiezone om overdracht van amplificatieproduct te voorkomen.

- 7 Centrifugeer de LS PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.
- 8 Plaats op de voorgeprogrammeerde post-amplificatiethermocycler en voer het I-PCR-programma uit.  
Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 4.

**OPMERKING** Als u verder gaat met *Eerste hybridisatie voorbereiden* op pagina 19, volg dan de instructies voor het ontdooien van reagentia in 'Stappen voor voorbereiden op protocol'.

- 9 Centrifugeer na voltooiing van het I-PCR-programma de LS PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.
- 10 Label de plaat opnieuw, nu met 'ALS' ('Amplified Library Samples', geamplificeerde bibliotheekmonsters).

### VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de ALS PCR-plaat bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 30 dagen.

Einddatum en -tijd \_\_\_\_\_

### Voorbereiden op protocolstappen

- 1 Zorg dat de thermocyclerprogramma's voor post-amplificatie zijn ingesteld. Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 4.
- 2 Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 12 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
TCB1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden

Tabel 13 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Freeze) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
TCA1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden

Tabel 14 TruSight Oncology Comp Content Set Box (onderdeelnr. 20031122)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
OPR1 (rode dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden
OPD2 (witte dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Eerste hybridisatie voorbereiden

## Eerste hybridisatie voorbereiden

### Vorbereiden

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Prepareer de volgende reagentia.
  - ▶ TCB1 – Verwarm het buisje 5 minuten lang op 37 °C. Vortex 10 seconden lang om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ TCA1 – Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ OPR1 – Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ OPD2 – Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 2 Als de ALS PCR-plaat opgeslagen is geweest, moet deze tot kamertemperatuur worden ontdooid en vervolgens 1 minuut lang worden gecentrifugeerd op 280 × g. Vervolgens pipetteren om te mengen.
- 3 Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'HYB1' (Hybridisatie 1).

### Procedure

- 1 Breng 20 µl van elke cDNA- en/of gDNA-bibliotheek over van de ALS PCR-plaat naar de overeenkomende well van de HYB1 PCR-plaat.
- 2 Breng klevende plaatafdichting aan op de ALS PCR-plaat en leg deze opzij.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 3 Inspecteer de TCB1 op bezinksel. Warm het buisje, indien aanwezig, opnieuw op en vortex het buisje tot de kristallen zijn opgelost.
- 4 Voeg 15 µl TCB1 toe aan elke bibliotheekwell in de HYB1 PCR-plaat.
- 5 Voeg 10 µl TCA1 toe aan elke bibliotheekwell in de HYB1 PCR-plaat.
- 6 Voeg de probes toe.  
Verschillende soorten probes **niet** met elkaar combineren.
  - ▶ **RNA-bibliotheekwells** – 5 µl OPR1 bij elke bibliotheek afgeleid van RNA.
  - ▶ **DNA-bibliotheekwells** – 5 µl OPD2 bij elke bibliotheek afgeleid van DNA.
- 7 Breng klevende plaatafdichting aan op de HYB1 PCR-plaat.



**LET OP**

Zorg dat de randen en wells volledig zijn afgedicht om evaporatie te voorkomen.

- 8 Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
- 9 Plaats op de thermocycler en voer het HYB1-programma uit.  
Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 4.

- 10 Hybridiseer bij 57 °C gedurende minimaal 8 uur tot maximaal 24 uur.
- 11 Breng de hybridisatiereagentia terug naar de opslag.
- 12 Bewaar de ALS PCR-plaat bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 30 dagen.

## Vorbereiden op protocolstappen

- 1 Verwijder aan het begin van dag 2 het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SMB (donkerblauw label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Capture doelen – één Capture doelen – twee
ET2	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Capture doelen – één Capture doelen – twee
HP3	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Capture doelen – één Capture doelen – twee Bibliotheken normaliseren
TCB1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Capture doelen – twee Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren

Tabel 16 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Freeze) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
EE2	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Capture doelen – één Capture doelen – twee Bibliotheken normaliseren
EEW	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Capture doelen – één
TCA1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden

Tabel 17 TruSight Oncology Comp Content Set Box (onderdeelnr. 20031122)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
OPR1 (rode dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden
OPD2 (witte dop)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Tweede hybridisatie voorbereiden

## Capture doelen – één

### Vorbereiden

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Verwarm een micromonsterincubator met MIDI-verwarmingsblokinzet voor tot 57 °C.
- 2 Prepareer de volgende reagentia.
  - ▶ EEW—Vortex om te mengen gedurende 1 minuut.
  - ▶ EE2—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ HP3—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ SMB—Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
    - ▶ Zorg dat voor deze procedure **SMB** wordt gebruikt, niet SPB.
  - ▶ ET2—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
- 3 Bereid vers EE2+HP3-elutiemengsel in een microcentrifugebuisje.

Tabel 18 EE2+HP3-elutiemengsel voor Capture doelen – één

Elutiemengselcomponent	3 bibliotheken	8 bibliotheken	16 bibliotheken	24 bibliotheken	48 bibliotheken
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Deze tabel bevat het volumeoverschot. Zie het gedeelte Reagentia hanteren van de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documentnr. 200007789) voor berekeningen.

- 4 Vortex het EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren. Leg opzij voor de stap *Elueren*.
- 5 Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'CAP1' ('Capture 1').
- 6 Pak de magneet.

## Procedure

### Binden

- 1 Verwijder de HYB1 PCR-plaat uit de thermocycler.
- 2 Centrifugeer de HYB1 PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.
- 3 Vortex de SMB 1 minuut lang om de parels te resuspenden.
- 4 Voeg onmiddellijk 150 µl SMB toe aan elke bibliotheekwell van de CAP1 MIDI-plaat.  
Als een bak wordt gebruikt om SMB te doseren, neem dan een overmaatfactor van 1,15 op bij het aliquoteren van voldoende materiaal per monster. Gooi resterend materiaal weg nadat de SMB is toegevoegd aan elke well.
- 5 Stel de pipet in op 50 µl en breng het volledige volume van elke bibliotheek over van de HYB1 PCR-plaat naar de overeenkomende well van de CAP1 MIDI-plaat.
- 6 Gooi de lege HYB1 PCR-plaat weg.
- 7 Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP1 MIDI-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- 8 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 9 Incubeer in de voorverwarmde micromonsterincubator bij 57 °C gedurende 25 minuten.
- 10 Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
- 11 Houd de CAP1 MIDI-plaat op de magnetische standaard en gebruik een P200-pipet ingesteld op 200 µl om alle supernatans te verwijderen zonder het parelpetlet te verstoren en gooi dit weg.



#### LET OP

Ga direct door naar de volgende stap (*Wassen*). Laat het parelpetlet niet al te lange tijd zitten zonder dat er vloeistof aanwezig is.

### Wassen

- 1 Was de parels als volgt.
  - a Verwijder de CAP1 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
  - b Voeg 200 µl EEW toe aan elke well.
  - c Stel het pipetvolume in op 150 µl en pipetteer minimaal 10 keer om te mengen. Zorg dat alle parels geresuspendeerd zijn.



#### LET OP

Zorg dat er geen parelpetlets aanwezig zijn door de totale pareloplossing voorzichtig uit de well naar de tip te aspireren. Kijk dan in elke well of er nog een petlet aanwezig is. Breng de pipettip in een hoek aan op het parelpetlet tijdens de stappen van het wassen om het petlet los te maken. Zorg dat het parelpetlet volledig ondergedompeld is in de oplossing. De oplossing moet er donkerbruin uitzien met een homogene consistentie.

- d Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP1 MIDI-plaat.

- e Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
  - f Schud bij 1800 tpm gedurende 4 minuten.
  - g Incubeer in een micromonsterincubator bij 57 °C gedurende 5 minuten.
  - h Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
  - i Houd deze op een magnetische standaard en verwijder alle supernatans uit elke well zonder het parelpetlet te verstoren en gooi dit weg.
- 2 Was de parels een **tweede** keer.
  - 3 Was de parels een **derde** keer.
  - 4 Verwijder resterend supernatans uit elke well.  
Gebruik een P20-pipet met fijne tips.

#### Elueren

- 1 Verwijder de CAP1 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
- 2 Vortex het verse EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren.
- 3 Voeg voorzichtig 17 µl EE2+HP3-elutiemengsel toe aan elke bibliotheekwell van de CAP1 MIDI-plaat.
- 4 Gooi resterend EE2+HP3-elutiemengsel weg.
- 5 Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP1 MIDI-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 6 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 7 Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
- 8 Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'ELU1' (Elutie 1).
- 9 Vortex de ET2 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 10 Voeg 5 µl ET2 toe aan elke overeenkomende bibliotheekwell in de nieuwe ELU1 PCR-plaat.
- 11 Breng voorzichtig 15 µl eluaat over van elke bibliotheekwell van de CAP1 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de ELU1 PCR-plaat.
- 12 Gooi de lege CAP1 MIDI-plaat weg.
- 13 Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU1 PCR-plaat.
- 14 Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- 15 Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
- 16 Breng de EEW terug naar de opslag.

## Tweede hybridisatie voorbereiden

### Vorbereiding

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Prepareer de volgende reagentia.
  - ▶ TCB1—Verwarm het buisje 5 minuten lang op 37 °C. Vortex 10 seconden lang om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ TCA1—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ OPR1—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ OPD2—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.

### Procedure

- 1 Inspecteer de TCB1 op bezinksel. Warm het buisje, indien aanwezig, opnieuw op en vortex het tot de kristallen zijn opgelost.
- 2 Voeg 15 µl TCB1 toe aan elke bibliotheekwell in de ELU1 PCR-plaat.
- 3 Voeg 10 µl TCA1 toe aan elke bibliotheekwell.

- 4 Voeg de probes toe.  
Verschillende soorten probes **niet** met elkaar combineren.
  - ▶ **RNA-bibliotheekwells**— 5 µl OPR1 bij elke bibliotheek afgeleid van RNA.
  - ▶ **DNA-bibliotheekwells**— 5 µl OPD2 bij elke bibliotheek afgeleid van DNA.
- 5 Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU1 PCR-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- 6 Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
- 7 Plaats op een thermocycler en voer het HYB2-programma uit.  
Raadpleeg *Thermocyclers programmeren* op pagina 4.
- 8 Hybridiseer bij 57 °C gedurende minimaal 1,5 uur tot maximaal 4 uur.
- 9 Breng de TCA1, TCB1, OPR1 en OPD2 terug naar de opslag.

## Capture doelen – twee

### Vorbereiden

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Verwarm een micromonsterincubator met MIDI-verwarmingsblokinzet voor tot 57 °C.
- 2 Prepareer de volgende reagentia.
  - ▶ **EE2**—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ **HP3**—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ **SMB**—Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
    - ▶ Zorg dat voor deze procedure **SMB** wordt gebruikt, niet SPB.
  - ▶ **RSB**—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
  - ▶ **ET2**—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
- 3 Bereid vers EE2+HP3-elutiemengsel in een microcentrifugebuisje.

Tabel 19 EE2+HP3-elutiemengsel voor Capture doelen – twee

Elutiemengselcomponent	3 bibliotheken	8 bibliotheken	16 bibliotheken	24 bibliotheken	48 bibliotheken
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Deze tabel bevat het volumeoverschot. Zie het gedeelte Reagentia hanteren van de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU) (documentnr. 200007789)* voor berekeningen.

- 4 Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren. Leg opzij voor de stap *Elueren*.
- 5 Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'CAP2' ('Capture 2').
- 6 Pak de magneet.

### Procedure

#### Binden

- 1 Verwijder de ELU1 PCR-plaat uit de thermocycler.
- 2 Centrifugeer de ELU1 PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut.
- 3 Vortex de SMB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.
- 4 Voeg onmiddellijk 150 µl SMB toe aan elke bibliotheekwell van de CAP2 MIDI-plaat.  
Als een bak wordt gebruikt om SMB te doseren, neem dan een overmaatfactor van 1,15 op bij het aliquoteren van voldoende materiaal per monster. Gooi resterend materiaal weg nadat de SMB is toegevoegd aan elke well.
- 5 Stel de pipet in op 50 µl en breng het volledige volume van elke bibliotheek over van de ELU1 PCR-plaat naar de overeenkomende well van de CAP2 MIDI-plaat.
- 6 Gooi de lege ELU1 PCR-plaat weg.
- 7 Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP2 MIDI-plaat.

Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.

- 8 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 9 Incubeer in een micromonsterincubator bij 57 °C gedurende 25 minuten.

OPMERKING Als u verder gaat met *Verrijkte bibliotheek amplificeren op pagina 25*, volg dan de instructies voor reagentia in de paragraaf 'Stappen voor voorbereiden op protocol'.

- 10 Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
- 11 Houd de CAP2 MIDI-plaat op een magnetische standaard en gebruik een P200-pipet ingesteld op 200 µl om alle supernatans te verwijderen uit elke bibliotheekwell zonder het parelpetlet te verstoren en gooi dit weg.



LET OP

Ga direct door naar de volgende stap (*Wassen*). Laat het parelpetlet niet al te lange tijd zitten zonder dat er vloeistof aanwezig is.

#### Wassen

- 1 Verwijder de CAP2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
- 2 Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
- 3 Voeg 200 µl RSB toe aan elke well.
- 4 Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP2 MIDI-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 5 Schud bij 1800 tpm gedurende 4 minuten.
- 6 Plaats gedurende 2 minuten op de magnetische standaard.
- 7 Houd de CAP2 MIDI-plaat op de magnetische standaard en verwijder alle supernatans zonder het parelpetlet te verstoren en gooi dit weg.
- 8 Verwijder resterend supernatans uit elke well.  
Gebruik een P20-pipet met fijne tips.

#### Elueren

- 1 Verwijder de CAP2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.
- 2 Vortex het verse EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren.
- 3 Voeg 22 µl EE2+HP3-elutiemengsel toe aan elke bibliotheekwell van de CAP2 MIDI-plaat.
- 4 Gooi resterend EE2+HP3-elutiemengsel weg.
- 5 Breng klevende plaatafdichting aan op de CAP2 MIDI-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 6 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 7 Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
- 8 Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'ELU2' (Elutie 2).
- 9 Vortex de ET2 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 10 Voeg 5 µl ET2 toe aan elke overeenkomende bibliotheekwell in de nieuwe ELU2 PCR-plaat.
- 11 Breng voorzichtig 20 µl eluaat over van elke bibliotheekwell van de CAP2 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de ELU2 PCR-plaat.
- 12 Gooi de lege CAP2 MIDI-plaat weg.
- 13 Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU2 PCR-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- 14 Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
- 15 Breng de SMB, EE2, HP3 en ET2 terug naar de opslag.



**VEILIG STOPPUNT**

Als u stopt, moet u de ELU2 PCR-plaat 1 minuut lang op 280 x g centrifugeren en bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 7 dagen. Breng de RSB terug naar de opslag.

Einddatum en -tijd \_\_\_\_\_

**Voorbereiden op protocolstappen**

- 1 Bereid een ijsemmer voor.
- 2 Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 20 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Freeze) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
PPC3	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Verrijkte bibliotheek amplificeren
EPM	-25 °C tot -15 °C	Bewaar op ijs.	Verrijkte bibliotheek amplificeren

Tabel 21 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Refrigerate) (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
SPB (lichtgroen label)	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren
RSB	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren Voorbereiden op sequencing

**Verrijkte bibliotheek amplificeren****Voorbereiden**

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Als de ELU2-plaat opgeslagen is geweest, moet deze tot kamertemperatuur worden ontdooid en vervolgens 1 minuut lang worden gecentrifugeerd op 280 x g.

**Procedure**

- 1 Vortex PPC3 om te mengen en centrifugeer daarna kort.
- 2 Voeg 5 µl PPC3 toe aan elke bibliotheekwell van de ELU2 PCR-plaat.
- 3 Vortex EPM 5 seconden lang om te mengen en centrifugeer daarna kort.
- 4 Voeg 20 µl EPM toe aan elke bibliotheekwell.
- 5 Breng klevende plaatafdichting aan op de ELU2 PCR-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af om evaporatie te voorkomen.
- 6 Schud 2 minuten lang bij 1200 tpm.
- 7 Plaats op een thermocycler en voer het EL-PCR-programma uit.  
Raadpleeg *Thermocyclers programmeren op pagina 4*.

**OPMERKING** Als u verder gaat met *Bibliotheken normaliseren op pagina 27*, volg dan de instructies voor ontdooien in de paragraaf 'Stappen voor voorbereiden op protocol'.

- 8 Zet de PPC3 en EPM terug in de opslag.

## Geamplificeerde verrijkte bibliotheek zuiveren

### Vorbereiden

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 **Prepareer de volgende reagentia.**
  - ▶ **SPB**—Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
    - ▶ Zorg dat voor deze procedure **SPB** wordt gebruikt, niet **SMB**.
    - ▶ **RSB**—Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
- 2 **Bereid verse 80% ethanol in een conisch buisje van 15 ml of 50 ml.**

Reagens	3 bibliotheken	8 bibliotheken	16 bibliotheken	24 bibliotheken	48 bibliotheken
100% ethanolalcohol, puur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-vrij water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 **Vortex verse 80% EtOH om te mengen.**
- 4 **Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'BIND2' (Zuivering binding).**
- 5 **Pak de magneet.**

### Procedure

#### Binden

- 1 **Verwijder de ELU2 PCR-plaat uit de thermocycler.**
- 2 **Centrifugeer de ELU2 PCR-plaat 1 minuut lang op 280 × g.**
- 3 **Vortex de SPB 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.**
- 4 **Voeg onmiddellijk 110 µl SPB toe aan elke bibliotheekwell van de BIND2 MIDI-plaat.**
- 5 **Breng 50 µl van elke bibliotheek over van de ELU2 PCR-plaat naar de overeenkomende well van de BIND2 MIDI-plaat.**
- 6 **Gooi de lege ELU2 PCR-plaat weg.**
- 7 **Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND2 MIDI-plaat.**  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 8 **Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.**
- 9 **Incubeer gedurende 5 minuten op kamertemperatuur.**
- 10 **Plaats de plaat gedurende 5 minuten op een magnetische standaard.**
- 11 **Gebruik een P200-pipet ingesteld op 200 µl om *alle* supernatans te verwijderen uit elke bibliotheekwell zonder het parelpetlet te verstoren en gooi dit weg.**

#### Wassen

- 1 **Was de parels als volgt.**
  - a **Houd ze op de magnetische standaard en voeg 200 µl verse 80% ethanol toe aan elke well.**
  - b **Wacht 30 seconden.**
  - c **Verwijder alle supernatans uit elke monsterwell zonder het parelpetlet te verstoren en gooi dit weg.**
- 2 **Was de parels een *tweede* keer.**
- 3 **Verwijder resterend EtOH uit elke well.**  
Gebruik een P20-pipet met fijne tips.
- 4 **Gooi ongebruikte 80% EtOH weg.**

#### Elueren

- 1 **Verwijder de BIND2 MIDI-plaat van de magnetische standaard.**

- 2 Inverteer of vortex om RSB te mengen.
- 3 Voeg 32 µl RSB toe aan elke bibliotheekwell.
- 4 Breng klevende plaatafdichting aan op de BIND2 MIDI-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 5 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 6 Incubeer gedurende 2 minuten op kamertemperatuur.
- 7 Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
- 8 Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'PL' ('Purified Libraries', gezuiverde bibliotheken).
- 9 Breng 30 µl van elk eluaat over van de BIND2 MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de PL PCR-plaat.
- 10 Gooi de lege BIND2 MIDI-plaat weg.
- 11 Breng klevende plaatafdichting aan op de PL PCR-plaat.
- 12 Breng de SPB terug naar de opslag.

### VEILIG STOPPUNT

Als u stopt, moet u de PL PCR-plaat 1 minuut lang op 280 × g centrifugeren en bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 30 dagen. Breng de RSB terug naar de opslag.

Einddatum en -tijd \_\_\_\_\_

## Voorbereiden op protocolstappen

- 1 Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 22 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Freeze) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
LNA1	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren
EE2	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren

Tabel 23 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Refrigerate) (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
LNB1	2 °C tot 8 °C	Breng gedurende 30 minuten op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren
HP3	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren Voorbereiden op sequencing
LNW1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren
LNS1	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Bibliotheken normaliseren

- 2 Als u op dezelfde dag verder gaat met *Voorbereiden op sequencing op pagina 30*, volg dan de instructies voor ontdooien in de paragraaf 'Stappen voor voorbereiden op protocol'.

## Bibliotheken normaliseren

### Voorbereiden

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Prepareer de volgende reagentia.
  - ▶ LNB1—Zorg dat de parels ten minste 30 minuten op kamertemperatuur zijn.
  - ▶ LNA1—Vortex om te mengen.
  - ▶ EE2—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ HP3—Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
  - ▶ LNW1—Vortex om te mengen. Leg opzij voor gebruik bij de procedure.
  - ▶ LNS1—Vortex om te mengen. Leg opzij voor gebruik bij de procedure.

- 2 Vortex de LNB1 1 minuut lang om de parels te resuspenderen.  
Inverteer het LNB1-buisje om er zeker van te zijn dat alle parels geresuspendeerd zijn.
- 3 Pipetteer met een P1000 ingesteld op 800 µl LNB1 10 keer omhoog en omlaag om resuspensie te garanderen.
- 4 Prepareer onmiddellijk vers LNA1+LNB1-mastermengsel in een conisch buisje.



**LET OP**

Resuspender het LNB1-parelpellet op de bodem van het buisje volledig om een inconsistente clusterdichtheid te voorkomen.

Tabel 24 LNA1+LNB1-mastermengsel

Mastermengselcomponent	3 bibliotheken	8 bibliotheken	16 bibliotheken	24 bibliotheken	48 bibliotheken
LNA1	229 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Deze tabel bevat het volumeoverschot. Zie het gedeelte Reagentia hanteren van de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documentnr. 200007789) voor berekeningen.

- 5 Vortex het LNA1+LNB1-mastermengsel. Leg opzij voor de stap *Binden*.
- 6 Bereid vers EE2+HP3-elutiemengsel in een microcentrifugebuisje.

Tabel 25 EE2+HP3-elutiemengsel voor het normaliseren van bibliotheken

Elutiemengselcomponent	3 bibliotheken	8 bibliotheken	16 bibliotheken	24 bibliotheken	48 bibliotheken
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Deze tabel bevat het volumeoverschot. Zie het gedeelte Reagentia hanteren van de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documentnr. 200007789) voor berekeningen.

- 7 Vortex het verse elutiemengsel en daarna kort centrifugeren. Leg opzij voor de stap *Elueren*.
- 8 Als de PL PCR-plaat opgeslagen is geweest, moet deze tot kamertemperatuur worden ontdooid, daarna 1 minuut lang centrifugeren op 280 x g en vervolgens pipetteren om te mengen.
- 9 Label een nieuwe 96-wells MIDI-plaat met 'BBN' ('Bead Based Normalization', normalisatie op basis van parels).
- 10 Pak de magneet.

## Procedure

### Binden

- 1 Vortex het LNA1+LNB1-mastermengsel.
- 2 Voeg onmiddellijk 45 µl LNA1+LNB1-mastermengsel toe aan elke bibliotheekwell van de BBN MIDI-plaat.
- 3 Gooi resterend LNA1+LNB1-mastermengsel weg.
- 4 Breng 20 µl van elke bibliotheek over van de PL PCR-plaat naar de overeenkomende well van de BBN MIDI-plaat.
- 5 Breng klevende plaatafdichting aan op de BBN MIDI-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 6 Schud bij 1800 tpm gedurende 30 minuten.
- 7 Breng klevende plaatafdichting aan op de PL PCR-plaat en breng deze terug naar de opslag.
- 8 Plaats de plaat gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
- 9 Houd deze op een magnetische standaard en gebruik een P200-pipet om alle supernatans te verwijderen uit elke well zonder het parelpellet te verstoren en gooi dit weg.

### Wassen

- 1 Was de parels als volgt.
  - a Verwijder de BBN MIDI-plaat van de magnetische standaard.

- b Voeg 45 µl LNW1 toe aan elke bibliotheekwell.
  - c Breng klevende plaatafdichting aan op de BBN MIDI-plaat.
  - d Dicht de randen en wells volledig af.
  - e Schud bij 1800 tpm gedurende 5 minuten.
  - f Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
  - g Verwijder alle supernatans uit elke well zonder het parelpetlet te verstoren en gooi dit weg.
- 2 Was de parels een **tweede** keer.
  - 3 Verwijder resterend supernatans uit elke well.  
Gebruik een P20-pipet met fijne tips.

## Elueren

- 1 Verwijder de BBN MIDI-plaat van de magnetische standaard.
- 2 Vortex het verse EE2+HP3-elutiemengsel en daarna kort centrifugeren.
- 3 Voeg 32 µl EE2+HP3-oplossing toe aan elke bibliotheekwell van de BBN MIDI-plaat.
- 4 Gooi resterend elutiemengsel weg.
- 5 Breng klevende plaatafdichting aan op de BBN MIDI-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 6 Schud bij 1800 tpm gedurende 2 minuten.
- 7 Plaats gedurende 2 minuten op een magnetische standaard.
- 8 Label een nieuwe 96-wells PCR-plaat met 'NL' ('Normalized Libraries', genormaliseerde bibliotheken).
- 9 Breng voorzichtig 30 µl eluaat over van elke bibliotheekwell van de BBN MIDI-plaat naar de overeenkomende well van de NL PCR-plaat.



## LET OP

Als de parels in de pipettips worden geaspireerd, moet u de parels terugdoen op de plaat op de magnetische standaard en wachten tot de vloeistof helder is (ca. 2 minuten) voordat u verder gaat naar de volgende stap van de procedure.

- 10 Gooi de lege BBN MIDI-plaat weg.
- 11 Vortex de LNS1 om te mengen.
- 12 Voeg 30 µl LNS1 toe aan elke bibliotheekwell in de NL PCR-plaat.
- 13 Pipetteer 5 keer om te mengen.
- 14 Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 15 Breng de LNB1, LNA1, EE2, LNW1 en LNS1 terug naar de opslag.

**VEILIG STOPPUNT**

Als u stopt, moet u de NL PCR-plaat 1 minuut lang op 280 x g centrifugeren en bewaren bij -25 °C tot -15 °C gedurende maximaal 30 dagen.

Einddatum en -tijd \_\_\_\_\_

## Vorbereiden op protocolstappen

Start de preparatie van de verbruiksmaterialen voor sequencing uit de NextSeq 550Dx-reagenskit met hoge capaciteit v2.5 (300 cycli) (onderdeelnr. 20028871) ten minste een uur voor gebruik.

- 1 Verwijder de bibliotheekverdunningsbuffer (HT1) uit de opslag van -25 °C tot -15 °C, laat ontdooien tot kamertemperatuur en plaats vervolgens op ijs.
- 2 Volg de preparatie-instructies in de *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument* (documentnr. 100000009513) voor andere verbruiksmaterialen in de kit.
  - ▶ NextSeq 550Dx-reagenscartridge met hoge capaciteit v2 (300 cycli)
  - ▶ NextSeq 550Dx-buffercartridge v2 (300 cycli)
  - ▶ NextSeq 550Dx-stroomcelcartridge met hoge capaciteit v2.5 (300 cycli)
- 3 Verwijder het reagensbuisje uit de doos en volg de instructies voor ontdooien.

Tabel 26 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Freeze) (onderdeelnr. 20031121)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
PhiX Internal Control (PhiX)	-25 °C tot -15 °C	Ontdooien tot kamertemperatuur. Bewaar op ijs.	Vorbereiden op sequencing

Tabel 27 TruSight Oncology Comp Enrichment Box (Refrigerate) (onderdeelnr. 20031123)

Reagens	Opslag	Instructies voor ontdooien	Protocolstap
HP3	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Vorbereiden op sequencing
RSB (roze label)	2 °C tot 8 °C	Breng op kamertemperatuur.	Vorbereiden op sequencing

## Vorbereiden op sequencing

### Vorbereiden

Begindatum en -tijd \_\_\_\_\_

- 1 Bekijk de richtlijnen voor het aantal bibliotheken en de selectie van indexen in de *Bijsluiter voor TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (documentnr. 200007789).
- 2 Label een microcentrifugebuisje met 'dHP3' ('diluted HP3', verdunde HP3).
- 3 Label een microcentrifugebuisje met 'dPhiX' ('diluted PhiX', verdunde PhiX).
- 4 Verwarm een verwarmingsblok voor tot 96 °C voor microcentrifugebuisjes.
- 5 Bereid een ijsemmer voor.

### PhiX-controle verdunnen en denatureren

- 1 Vortex de HP3 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 2 Combineer de volgende volumes in het dHP3-microcentrifugebuisje.
  - ▶ 10 µl HP3
  - ▶ 190 µl RNase/DNasevrij-water
- 3 Vortex de dHP3 om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 4 Inverteer of vortex de RSB om te mengen.
- 5 Vortex de PhiX-controle om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 6 Combineer de volgende volumes in het dPhiX-microcentrifugebuisje.
  - ▶ 8 µl RSB
  - ▶ 2 µl PhiX-controle
- 7 Voeg 10 µl dHP3 toe aan het dPhiX-buisje.
- 8 Gooi het dHP3-buisje weg.

- 9 Vortex het dPhiX-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 10 Incubeer de dPhiX 5 minuten lang bij kamertemperatuur om te denatureren.
- 11 Vortex de HT1 om te mengen.
- 12 Voeg onmiddellijk 980 µl voorgekoelde HT1 toe aan de dPhiX.
- 13 Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 14 Plaats de dPhiX op ijs tot gebruik bij het voorbereiden van de tweede verdunning.  
De uiteindelijke concentratie is 20 pM dPhiX.
- 15 Breng de PhiX, HP3 en RSB terug naar de opslag.

### Bibliotheken poolen en denatureren

- 1 Als de NL PCR-plaat opgeslagen is geweest, moet deze tot kamertemperatuur worden ontdooid en vervolgens 1 minuut lang worden gecentrifugeerd op 280 x g.
- 2 Pipetteer/meng de bibliotheken in de NL PCR-plaat 5 keer met een meerkanaalse pipet ingesteld op 30 µl. Gebruik verse tips voor elke bibliotheek.



LET OP

Zorg dat de bibliotheken goed gemengd zijn, voor een optimale prestatie.

- 3 Selecteer een van de volgende opties om de bibliotheken te poolen, denatureren en verdunnen.
  - ▶ **Optie 1:** Sequence de bibliotheken afgeleid van RNA-monsters en DNA-monsters tegelijkertijd. Raadpleeg *Optie 1: DNA- en RNA-bibliotheken samen op pagina 31.*
  - ▶ **Optie 2:** Sequence de bibliotheken afgeleid van alleen DNA-monsters. Raadpleeg *Optie 2: Alleen DNA-bibliotheken op pagina 32.*
  - ▶ **Optie 3:** Sequence de bibliotheken afgeleid van alleen RNA-monsters. Raadpleeg *Optie 3: Alleen RNA-bibliotheken op pagina 33.*

### Optie 1: DNA- en RNA-bibliotheken samen

- 1 Label een microcentrifugebuisje met 'PRL' ('Pooled RNA Libraries', gepoolde RNA-bibliotheken).
- 2 Label een microcentrifugebuisje met 'PDL' ('Pooled DNA Libraries', gepoolde DNA-bibliotheken).
- 3 Breng 10 µl van elke genormaliseerde RNA (cDNA)-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PRL-buisje.  
Pool niet twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
- 4 Breng 10 µl van elke genormaliseerde DNA-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PDL-buisje.  
Pool niet twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
- 5 Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 6 Vortex elk PRL- en PDL-buisje om te mengen.
- 7 Centrifugeer de PRL- en PDL-buisjes kort.
- 8 Incubeer de PRL- en PDL-buisjes in een verwarmingsblok op 96 °C gedurende 2 minuten.
- 9 Plaats de PRL en PDL op ijs gedurende 5 minuten.
- 10 Vortex de PRL- en PDL-buisjes om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 11 Zet de PRL- en PDL-buisjes terug op ijs.

### Eerste verdunning voorbereiden

- 1 Label een microcentrifugebuisje van 1,7 ml met 'DIL1' ('Dilution 1', verdunning 1).
- 2 Breng 20 µl PDL over naar het lege DIL1-buisje.
- 3 Voeg 5 µl PRL toe aan DIL1.
- 4 Gooi de PDL- en PRL-buisjes weg.
- 5 Voeg 475 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL1-buisje (verdunning 1:20).
- 6 Vortex het DIL1-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.

#### Tweede verdunning voorbereiden

- 1 Label een microcentrifugebuisje van 2,0 ml met 'DIL2' ('Dilution 2', verdunning 2).
- 2 Breng 40 µl DIL1 over naar het lege DIL2-buisje.
- 3 Gooi het DIL1-buisje weg.
- 4 Voeg 1660 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL2-buisje (verdunning 1:850).
- 5 Vortex geprepareerde 20 pM dPhiX om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 6 Voeg 2,5 µl geprepareerde 20 pM dPhiX toe aan het DIL2-buisje.
- 7 Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 8 Doe 1300 µl DIL2 op de NextSeq 550Dx-reagenscartridge met hoge capaciteit v2 (300 cycli).  
Raadpleeg voor meer informatie de *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument* (documentnr. 100000009513).
- 9 Gooi het DIL2-buisje weg.
- 10 Centrifugeer de NL PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut en bewaar maximaal 30 dagen bij -25 °C tot -15 °C.
- 11 Ga verder naar de sequencing.  
Raadpleeg voor meer informatie de *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument* (documentnr. 100000009513).

#### Optie 2: Alleen DNA-bibliotheken

- 1 Label een microcentrifugebuisje met 'PDL' ('Pooled DNA Libraries', gepoolde DNA-bibliotheken).
- 2 Breng 10 µl van elke genormaliseerde DNA-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PDL-buisje.  
Pool niet twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
- 3 Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 4 Vortex het PDL-buisje om te mengen.
- 5 Centrifugeer het PDL-buisje kort.
- 6 Incubeer het PDL-buisje in een verwarmingsblok op 96 °C gedurende 2 minuten.
- 7 Plaats de PDL op ijs gedurende 5 minuten.
- 8 Vortex het PDL-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 9 Zet het PDL-buisje terug op ijs.

#### Eerste verdunning voorbereiden

- 1 Label een microcentrifugebuisje van 1,7 ml met 'DIL1' ('Dilution 1', verdunning 1).
- 2 Breng 10 µl PDL over naar het lege DIL1-buisje.
- 3 Gooi het PDL-buisje weg.
- 4 Voeg 190 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL1-buisje (verdunning 1:20).
- 5 Vortex DIL1 om te mengen en daarna kort centrifugeren.

#### Tweede verdunning voorbereiden

- 1 Label een microcentrifugebuisje van 2,0 ml met 'DIL2' ('Dilution 2', verdunning 2).
- 2 Breng 40 µl DIL1 over naar het lege DIL2-buisje.
- 3 Gooi het DIL1-buisje weg.
- 4 Voeg 1660 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL2-buisje (verdunning 1:850).
- 5 Vortex geprepareerde 20 pM dPhiX en daarna kort centrifugeren.
- 6 Voeg 2,5 µl geprepareerde 20 pM dPhiX toe aan het DIL2-buisje.
- 7 Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 8 Doe 1300 µl DIL2 op de NextSeq 550Dx-reagenscartridge met hoge capaciteit v2 (300 cycli).  
Raadpleeg voor meer informatie de *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument* (documentnr. 100000009513).



- 9 Gooi het DIL2-buisje weg.
- 10 Centrifugeer de NL PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut en bewaar vervolgens maximaal 30 dagen bij -25 °C tot -15 °C.
- 11 Ga verder naar de sequencing.  
Raadpleeg voor meer informatie de *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument* (documentnr. 100000009513).

### Optie 3: Alleen RNA-bibliotheken

- 1 Label een microcentrifugebuisje met 'PRL' ('Pooled RNA Libraries', gepoolde RNA-bibliotheken).
- 2 Breng 10 µl van elke genormaliseerde RNA (cDNA)-bibliotheek over van de NL-plaat naar het PRL-buisje.  
Pool niet twee bibliotheken met dezelfde indexprimer.
- 3 Breng klevende plaatafdichting aan op de NL PCR-plaat.  
Dicht de randen en wells volledig af.
- 4 Vortex het PRL-buisje om te mengen.
- 5 Centrifugeer het PRL-buisje kort.
- 6 Incubeer het PRL-buisje in een verwarmingsblok op 96 °C gedurende 2 minuten.
- 7 Plaats de PRL op ijs gedurende 5 minuten.
- 8 Vortex het PRL-buisje om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 9 Zet het PRL-buisje terug op ijs.

#### Eerste verdunning voorbereiden

- 1 Label een microcentrifugebuisje van 1,7 ml met 'DIL1' ('Dilution 1', verdunning 1).
- 2 Breng 10 µl PRL over naar het lege DIL1-buisje.
- 3 Gooi het PRL-buisje weg.
- 4 Voeg 190 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL1-buisje (verdunning 1:20).
- 5 Vortex DIL1 om te mengen en daarna kort centrifugeren.

#### Tweede verdunning voorbereiden

- 1 Label een microcentrifugebuisje van 2,0 ml met 'DIL2' ('Dilution 2', verdunning 2).
- 2 Breng 40 µl DIL1 over naar het lege DIL2-buisje.
- 3 Gooi het DIL1-buisje weg.
- 4 Voeg 1646 µl voorgekoelde HT1 toe aan het DIL2-buisje (verdunning 1:843).
- 5 Vortex geprepareerde 20 pM dPhiX en daarna kort centrifugeren.
- 6 Voeg 16,7 µl geprepareerde 20 pM dPhiX toe aan het DIL2-buisje.
- 7 Vortex om te mengen en daarna kort centrifugeren.
- 8 Doe 1300 µl DIL2 in de NextSeq 550Dx-reagenscartridge met hoge capaciteit v2 (300 cycli).  
Raadpleeg voor meer informatie de *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument* (documentnr. 100000009513).
- 9 Gooi het DIL2-buisje weg.
- 10 Centrifugeer de NL PCR-plaat op 280 × g gedurende 1 minuut en bewaar maximaal 30 dagen bij -25 °C tot -15 °C.
- 11 Ga verder naar de sequencing.  
Raadpleeg voor meer informatie de *Referentiegids van het NextSeq 550Dx-instrument* (documentnr. 100000009513).

## Octrooien en handelsmerken

Dit document en de inhoud ervan zijn eigendom van Illumina, Inc. en haar dochterondernemingen ('Illumina'), en zijn alleen bedoeld voor contractueel gebruik door haar klanten in verband met het gebruik van de hierin beschreven producten en voor geen enkel ander doel. Dit document en de inhoud ervan mogen niet worden gebruikt of gedistribueerd voor welk ander doel dan ook en/of op een andere manier worden gecommuniceerd, geopenbaard of gereproduceerd zonder de voorafgaande schriftelijke toestemming van Illumina. Illumina geeft door middel van dit document geen licenties onder haar patent, handelsmerk, auteursrecht of gewoonterechten noch soortgelijke rechten van derden door.

De instructies in dit document moeten strikt en uitdrukkelijk worden opgevolgd door gekwalificeerd en voldoende opgeleid personeel om een correct en veilig gebruik van de hierin beschreven producten te waarborgen. Alle inhoud van dit document moet volledig worden gelezen en begrepen voordat dergelijke producten worden gebruikt.

**HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT KAN RESULTEREN IN SCHADE AAN DE PRODUCTEN, LETSEL AAN PERSONEN (INCLUSIEF GEBRUIKERS OF ANDEREN) EN SCHADE AAN ANDERE EIGENDOMMEN. BIJ HET NIET VOLLEDIG LEZEN EN UITDRUKKELIJK OPVOLGEN VAN ALLE INSTRUCTIES IN DIT DOCUMENT VERVALLEN ALLE GARANTIES DIE VAN TOEPASSING ZIJN OP HET PRODUCT.**

**ILLUMINA IS OP GEEN ENKELE MANIER AANSPRAKELIJK VOOR GEVOLGEN VAN EEN ONJUIST GEBRUIK VAN DE PRODUCTEN DIE HIERIN WORDEN BESCHREVEN (INCLUSIEF DELEN DAARVAN OF SOFTWARE).**

© 2022 Illumina, Inc. Alle rechten voorbehouden.

Alle handelsmerken zijn het eigendom van Illumina, Inc. of hun respectievelijke eigenaren. Ga naar [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html) voor meer informatie over specifieke handelsmerken.

## Contactgegevens



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, Californië 92122 VS  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (buiten Noord-Amerika)  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)  
[www.illumina.com](http://www.illumina.com)



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

## Productlabeling

Raadpleeg voor een volledige uitleg van symbolen die mogelijk worden weergegeven op de verpakkingen en labels van de producten het symbooloverzicht voor uw kit via [support.illumina.com](http://support.illumina.com).