

# Φόρμα παρακολούθησης εργαστηρίου **TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)**

ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ  
ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ

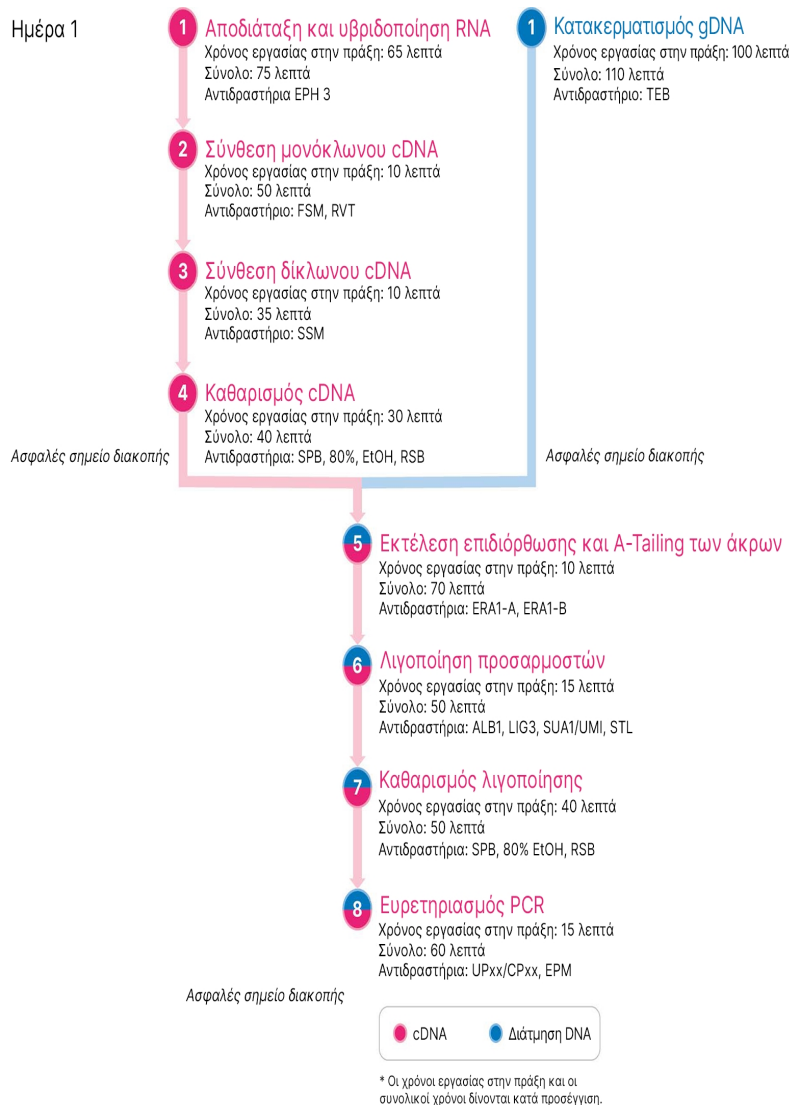
## Οδηγίες χρήσης

Μια επισκόπηση της ροής εργασιών **TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive)** παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1** και στην **Εικόνα 2**.

Πριν ξεκινήσετε το πρωτόκολλο, διαβάστε τις προειδοποιήσεις και τις προφυλάξεις που περιλαμβάνονται στο Ένθετο συσκευασίας **TruSight Oncology Comprehensive (EU)** (αρ. εγγράφου **200007789**).

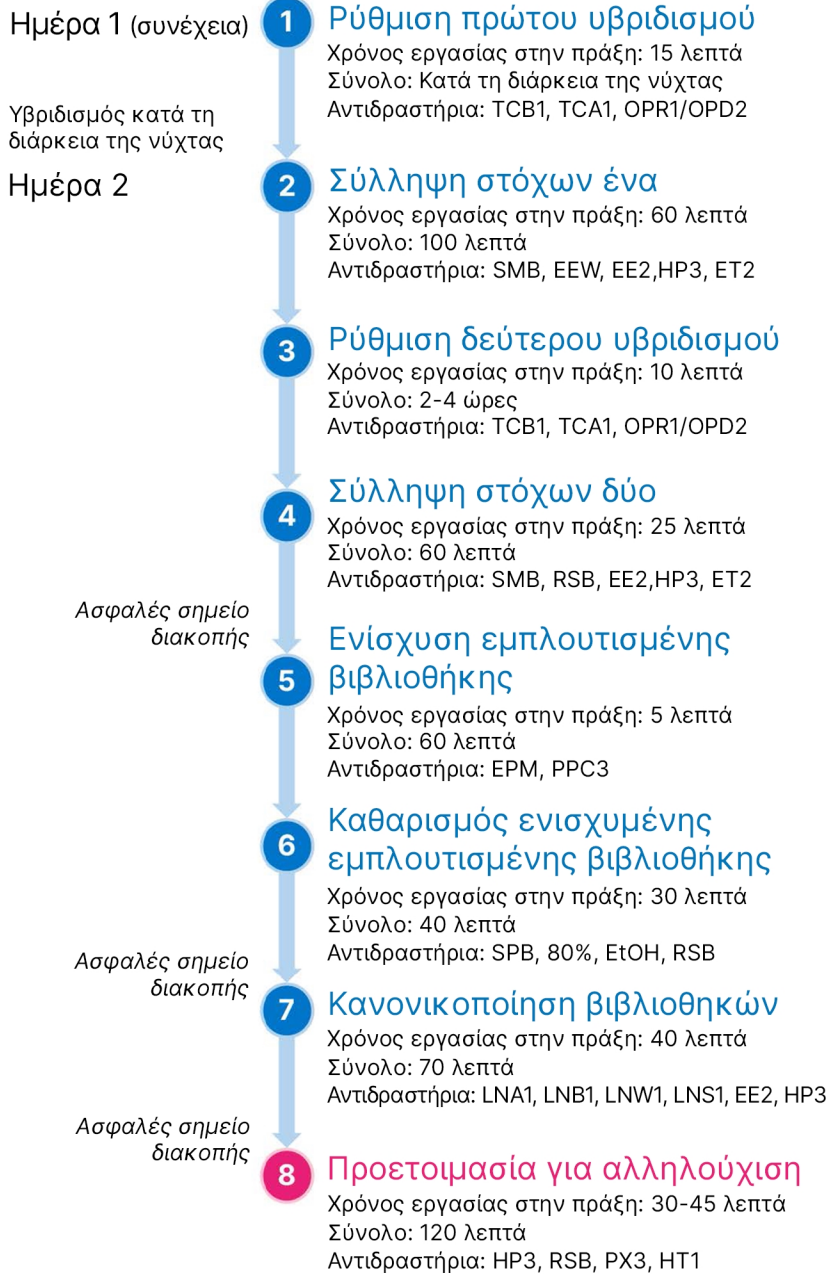
## Ροή εργασιών προετοιμασίας βιβλιοθηκών

Εικόνα 1 Ροή εργασιών TSO Comprehensive (Μέρος 1)



## Ροή εργασιών εμπλουτισμού

Εικόνα 2 Ροή εργασιών TSO Comprehensive (Μέρος 2)



## Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών

- 1 Πριν από την έναρξη του προσδιορισμού, αποθηκεύστε τα ακόλουθα προγράμματα στους θερμικούς κυκλοποιητές πριν και μετά την ενίσχυση.

Πίνακας 1 Προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή προενίσχυσης

Βήμα διαδικασίας	Όνομα προγράμματος	Θερμοκρασία καπακιού	Όγκος αντίδρασης	Παράμετροι θερμικού κυκλοποιητή
Αποδιάταξη και υβριδοποίηση RNA	LQ-RNA	100 °C	17 μl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 65 °C για 5 λεπτά</li> <li>• 4 °C για 1 λεπτό</li> <li>• 4 °C Αναμονή</li> </ul>
Σύνθεση μονόκλωνου cDNA	1stSS	100 °C	25 μl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 °C για 10 λεπτά</li> <li>• 42 °C για 15 λεπτά</li> <li>• 70 °C για 15 λεπτά</li> <li>• 4 °C για 1 λεπτό</li> <li>• 4 °C Αναμονή</li> </ul>
Σύνθεση δίκλωνου cDNA	2ndSS	30 °C	50 μl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 16 °C για 25 λεπτά</li> <li>• 4 °C για 1 λεπτό</li> <li>• 4 °C Αναμονή</li> </ul>

Εάν η θερμοκρασία του καπακιού για το 2ndSS δεν μπορεί να ρυθμιστεί στους 30 °C, απενεργοποιήστε την επιλογή προθέρμανσης καπακιού.

Πίνακας 2 Προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή μετά την ενίσχυση

Βήμα διαδικασίας	Όνομα προγράμματος	Θερμοκρασία καπακιού	Όγκος αντίδρασης	Παράμετροι θερμικού κυκλοποιητή
Ευρετηριασμός PCR	I-PCR	100 °C	50 μl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C για 30 δευτερόλεπτα</li> <li>• 15 κύκλοι: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C για 10 δευτερόλεπτα</li> <li>• 60 °C για 30 δευτερόλεπτα</li> <li>• 72 °C για 30 δευτερόλεπτα</li> </ul> </li> <li>• 72 °C για 5 λεπτά</li> <li>• 10 °C Αναμονή</li> </ul>
Εκτέλεση πρώτου υβριδισμού	HYB1	100 °C	50 μl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C για 10 λεπτά</li> <li>• 85 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα</li> <li>• 75 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα</li> <li>• 65 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα</li> <li>• 57 °C Αναμονή για 8 έως 24 ώρες</li> </ul>
Εκτέλεση δεύτερου υβριδισμού	HYB2	100 °C	50 μl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C για 10 λεπτά</li> <li>• 85 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα</li> <li>• 75 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα</li> <li>• 65 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα</li> <li>• 57 °C Αναμονή για 1,5 έως 4 ώρες</li> </ul>

Βήμα διαδικασίας	Όνομα προγράμματος	Θερμοκρασία καπακιού	Όγκος αντίδρασης	Παράμετροι θερμοκού κυκλοποιητή
Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης	EL-PCR	100 °C	50 μl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 C για 30 δευτερόλεπτα</li> <li>• 18 κύκλοι: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C για 10 δευτερόλεπτα</li> <li>• 60 °C για 30 δευτερόλεπτα</li> <li>• 72 °C για 30 δευτερόλεπτα</li> </ul> </li> <li>• 72 °C για 5 λεπτά</li> <li>• 10 °C Αναμονή</li> </ul>

## Εισαγωγή πληροφοριών εκτέλεσης

Το Όργανο **NextSeq 550Dx Local Run Manager** είναι το λογισμικό που χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση μιας εκτέλεσης **TSO Comprehensive**. Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. *Οδηγός ροής εργασιών μονάδας ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου **200008661**).

Εισαγάγετε τις πληροφορίες ρύθμισης εκτέλεσης και δείγματος απευθείας στη μονάδα ανάλυσης **TruSight Oncology Comprehensive**.

### Καθορισμός παραμέτρων εκτέλεσης

- 1 Συνδεθείτε στο **Local Run Manager** από το όργανο ή από υπολογιστή δικτύου.
- 2 Επιλέξτε **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης) και, στη συνέχεια, επιλέξτε **TSO Comp (EU)**.
- 3 Εισαγάγετε ένα όνομα εκτέλεσης που ταυτοποιεί την εκτέλεση από την αλληλούχηση μέσω ανάλυσης με τα ακόλουθα κριτήρια.
  - ▶ 1–40 χαρακτήρες.
  - ▶ Μόνο αλφαριθμητικούς χαρακτήρες, κάτω παύλες ή παύλες.
  - ▶ Πρέπει να προηγούνται οι κάτω παύλες και οι παύλες και να ακολουθεί ένας αλφαριθμητικός χαρακτήρας.
  - ▶ Μοναδικό σε όλες τις εκτελέσεις στο όργανο.
- 4 **[Προαιρετικό]** Εισαγάγετε μια περιγραφή της εκτέλεσης για ευκολότερη ταυτοποίηση της εκτέλεσης με τα ακόλουθα κριτήρια.
  - ▶ 1–150 χαρακτήρες.
  - ▶ Μόνο αλφαριθμητικοί χαρακτήρες ή διαστήματα.
  - ▶ Τα διαστήματα πρέπει να προηγούνται και να ακολουθούνται από έναν αλφαριθμητικό χαρακτήρα.

### Καθορισμός δειγμάτων για την εκτέλεση

Καθορίστε τα δείγματα για την εκτέλεση χρησιμοποιώντας μία από τις ακόλουθες επιλογές.

- ▶ **Enter samples manually** (Μη αυτόματη εισαγωγή δειγμάτων) — Χρησιμοποιήστε τον κενό πίνακα στην οθόνη **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης).
- ▶ **Import samples** (Εισαγωγή δειγμάτων) — Μεταβείτε σε ένα εξωτερικό αρχείο με μορφή τιμών χωρισμένων με κόμμα (\*.csv). Στην οθόνη **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης) υπάρχει ένα πρότυπο προς λήψη.



#### ΠΡΟΣΟΧΗ

Τυχόν εσφαλμένες αντιστοιχίσεις μεταξύ δειγμάτων και εκκινήτων ευρετηριασμού έχουν ως αποτέλεσμα εσφαλμένη αναφορά αποτελεσμάτων λόγω απουσίας θετικής ταυτοποίησης δειγμάτων. Εισαγάγετε αναγνωριστικά δειγμάτων και εκχωρήστε ευρετήρια στο **Local Run Manager** πριν ξεκινήσετε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης. Καταγράψτε τα αναγνωριστικά δειγμάτων, τα ευρετήρια και τον προσανατολισμό των βοθρίων της πλάκας ώστε να μπορείτε να ανατρέξετε κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της βιβλιοθήκης.



**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Για να αποφύγετε την απώλεια δεδομένων, βεβαιωθείτε ότι η εγκατάσταση της **KB** δεν βρίσκεται σε εξέλιξη πριν αποθηκεύσετε μια εκτέλεση.

**Μη αυτόματη εισαγωγή δειγμάτων**

- 1 Εισαγάγετε ένα μοναδικό αναγνωριστικό δείγματος στο πεδίο **Sample ID** (Αναγνωριστικό δείγματος) με τα ακόλουθα κριτήρια. **Όλα τα δείγματα μαρτύρων θα πρέπει να προστεθούν πρώτα.** Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα **Δείγματα μαρτύρων στη σελίδα 7.**
  - ▶ 1–25 χαρακτήρες.
  - ▶ Μόνο αλφαριθμητικούς χαρακτήρες, κάτω παύλες ή παύλες.
  - ▶ Πρέπει να προηγούνται οι κάτω παύλες και οι παύλες και να ακολουθεί ένας αλφαριθμητικός χαρακτήρας.
- 2 **[Προαιρετικό]** Εισαγάγετε μια περιγραφή δείγματος στο πεδίο **Sample Description** (Περιγραφή δείγματος) με τα ακόλουθα κριτήρια.
  - ▶ 1–50 χαρακτήρες.
  - ▶ Μόνο αλφαριθμητικούς χαρακτήρες, παύλες, κάτω παύλες ή διαστήματα.
  - ▶ Πριν από τα διαστήματα, τις κάτω παύλες και τις παύλες πρέπει να προηγείται και να ακολουθείται ένας αλφαριθμητικός χαρακτήρας.
- 3 Επιλέξτε ένα ευρετήριο για τη βιβλιοθήκη **DNA** ή/και **RNA** που έχει προετοιμαστεί από το δείγμα. Βεβαιωθείτε ότι τα δείγματα **RNA** και **DNA** βρίσκονται σε ξεχωριστές στήλες. Το πεδίο αλληλούχισης **DNA i7+i5** συμπληρώνεται αυτόματα μετά την επιλογή ενός αναγνωριστικού ευρετηρίου **DNA**. Το πεδίο αλληλούχισης **RNA i7+i5** συμπληρώνεται αυτόματα μετά την επιλογή ενός αναγνωριστικού ευρετηρίου **RNA**.  
 Εκτός από τη σύνοψη εδώ, βλ. *Ένθετο συσκευασίας TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου **200007789**) για την επιλογή αναγνωριστικού ευρετηρίου.
  - ▶ Για βιβλιοθήκη δειγμάτων **DNA**, επιλέξτε ένα μοναδικό αναγνωριστικό ευρετηρίου (ευρετήρια **UPxx** ή **CPxx**) από την αναπτυσσόμενη λίστα Αναγνωριστικό ευρετηρίου **DNA**.
  - ▶ Για βιβλιοθήκη δειγμάτων **RNA**, επιλέξτε ένα μοναδικό αναγνωριστικό ευρετηρίου (μόνο **UPxx**) από την αναπτυσσόμενη λίστα Αναγνωριστικό ευρετηρίου **RNA**.
  - ▶ Εάν υπάρχουν συνολικά τρεις βιβλιοθήκες στην εκτέλεση, ακολουθήστε τις οδηγίες επιλογής ευρετηρίου στο *Ένθετο συσκευασίας TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου **200007789**).
- 4 Χρησιμοποιήστε το πεδίο **Tumor Type** (Τύπος όγκου) για να εκχωρήσετε τύπο όγκου για κάθε δείγμα, επιλέγοντας τον πιο ειδικό διαθέσιμο τύπο όγκου. Βλ. *Επιλογή τύπου όγκου στη σελίδα 7.*
- 5 Χρησιμοποιήστε το πεδίο **Tumor Type** (Τύπος όγκου) για να εκχωρήσετε έναν από τους παρακάτω τύπους μαρτύρων για κάθε μάρτυρα. Βλ. *Δείγματα μαρτύρων στη σελίδα 7.*
  - Εξωτερικός μάρτυρας **DNA**
  - Εξωτερικός μάρτυρας **RNA**
  - Μάρτυρας **DNA** χωρίς πρότυπο
  - Μάρτυρας **RNA** χωρίς πρότυπο
 Εάν χρησιμοποιείτε τον μάρτυρα **DNA** Πρόθεμα αναλώσιμου, ο τύπος μάρτυρα είναι ο εξωτερικός μάρτυρας **DNA**. Εάν χρησιμοποιείτε τον μάρτυρα **RNA** Πρόθεμα αναλώσιμου, ο τύπος μάρτυρα είναι ο εξωτερικός μάρτυρας **RNA**.
- 6 Εκχωρήστε φύλο.
- 7 **[Προαιρετικό]** Επιλέξτε **Export to CSV** (Εξαγωγή σε CSV) για να εξαγάγετε πληροφορίες δείγματος σε εξωτερικό αρχείο.
- 8 Ελέγξτε τις πληροφορίες στην οθόνη **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης). Τυχόν εσφαλμένες πληροφορίες μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.
- 9 Επιλέξτε **Save Run** (Αποθήκευση εκτέλεσης).

### Εισαγωγή δειγμάτων

- 1 Επλέξτε (Εισαγωγή προτύπου) **Import CSV** (Εισαγωγή **CSV**) και μεταβείτε στη θέση του αρχείου με τις πληροφορίες του δείγματος. Υπάρχουν δύο τύποι αρχείων που μπορείτε να εισαγάγετε.
  - Επλέξτε (Λήψη προτύπου) **Download CSV** (Λήψη **CSV**) στην οθόνη **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης) για λήψη νέας προτύπου πληροφοριών δείγματος. Το αρχείο προτύπου περιέχει τις επικεφαλίδες στηλών και τη μορφή που απαιτούνται για εισαγωγή. Εισαγάγετε τις πληροφορίες δείγματος σε κάθε στήλη για τα δείγματα της εκτέλεσης. Για τη στήλη **Tumor Type** (Τύπος όγκου), εισαγάγετε τον όρο τύπου όγκου ή τον σχετικό κωδικό (βλ. *Λήψη τύπων όγκου στη σελίδα 1*). Το πεδίο **Tumor Type** (Τύπος όγκου) χρησιμοποιείται επίσης για τον καθορισμό δειγμάτων ως μαρτύρων (βλ. *Δείγματα μαρτύρων στη σελίδα 7*).
  - Χρησιμοποιήστε ένα αρχείο πληροφοριών δείγματος που είχε εξαχθεί από τη Μονάδα ανάλυσης **TSO Comprehensive** χρησιμοποιώντας τη λειτουργία (Εξαγωγή σε πρότυπο) **Export to CSV** (Εξαγωγή σε **CSV**).
- 2 Στην οθόνη **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης), ελέγξτε τις πληροφορίες που έχουν εισαχθεί. Τυχόν εσφαλμένες πληροφορίες μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.
- 3 [**Προαιρετικό**] Επλέξτε (Εξαγωγή σε πρότυπο) **Export to CSV** (Εξαγωγή σε **CSV**) για να εξαγάγετε πληροφορίες δείγματος σε εξωτερικό αρχείο.
- 4 Επλέξτε **Save Run** (Αποθήκευση εκτέλεσης).

### Δείγματα μαρτύρων

Το **TSO Comprehensive** απαιτεί τη χρήση του Διάλυμα ελέγχου πάνελ. Ο χαρακτηρισμός ενός δείγματος ως μάρτυρα ρυθμίζει αυτόματα το πεδίο **Sex** (Φύλο) του δείγματος σε **Unknown** (Άγνωστο). Για να ορίσετε ένα δείγμα ως μάρτυρα, επιλέξτε έναν από τους τέσσερις τύπους μάρτυρα από το πεδίο **Tumor Type** (Τύπος όγκου): Εξωτερικός μάρτυρας **DNA** (θετικός μάρτυρας **DNA**), Μάρτυρας **DNA** χωρίς πρότυπο, Εξωτερικός μάρτυρας **RNA** (θετικός μάρτυρας **RNA**) ή Μάρτυρας **RNA** χωρίς πρότυπο. Βλ. *Επιλογή τύπου όγκου στη σελίδα 7* για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη ρύθμιση των τύπων όγκου για όλους τους τύπους δειγμάτων κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης.

Μόνο ένας από κάθε τύπο μάρτυρα μπορεί να καθοριστεί σε μια εκτέλεση. Μόνο μια βιβλιοθήκη **DNA** μπορεί να καθοριστεί για έναν εξωτερικό μάρτυρα **DNA** ή έναν μάρτυρα **DNA** χωρίς πρότυπο. Μόνο μια βιβλιοθήκη **RNA** μπορεί να καθοριστεί για έναν εξωτερικό μάρτυρα **RNA** ή έναν μάρτυρα **RNA** χωρίς πρότυπο. Οι βιβλιοθήκες που χαρακτηρίζονται ως μάρτυρες **DNA** ή **RNA** χωρίς πρότυπο δεν υπολογίζονται έναντι του μέγιστου αριθμού βιβλιοθηκών σε μια εκτέλεση.

### Επιλογή τύπου όγκου

Για κάθε δείγμα πρέπει να καθορίζεται ένας τύπος όγκου. Εκτός από τους τύπους μαρτύρων, οι διαθέσιμοι τύποι όγκου προέρχονται από την εγκατεστημένη γνωσιακή βάση (**KB**) και ενδέχεται να αλλάξουν με τις ενημερωμένες εκδόσεις της **KB**.



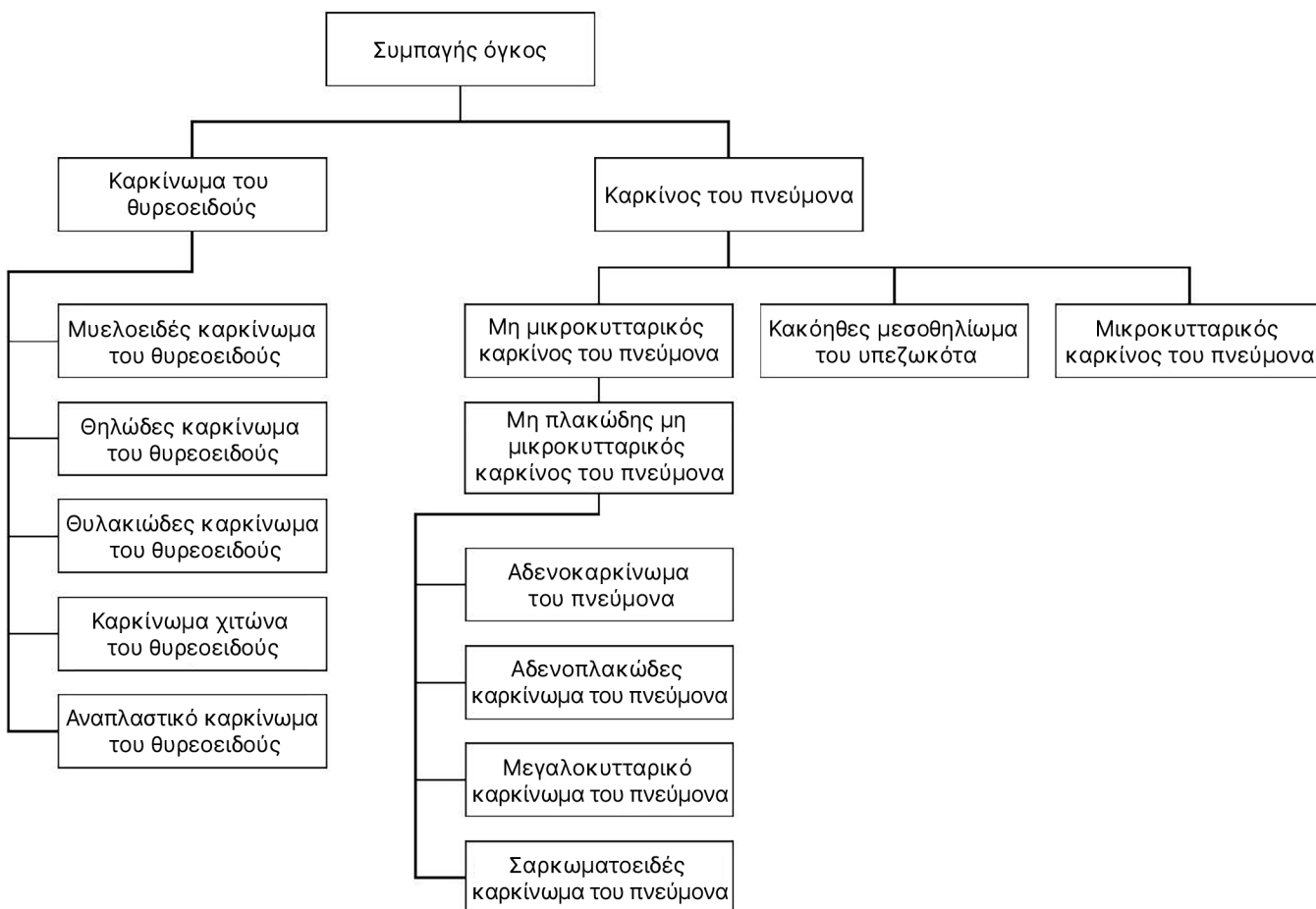
#### ΠΡΟΣΟΧΗ

Η εσφαλμένη επιλογή του τύπου όγκου μπορεί να προκαλέσει εσφαλμένα αποτελέσματα. Επιδίστε τυχόν προειδοποιήσεις που εμφανίζονται κατά τον καθορισμό των τύπων όγκου για να αποφύγετε την αποτυχία της ανάλυσης.

Οι όροι του τύπου του όγκου αποτελούν μέρος μιας ιεραρχικής οντολογίας της νόσου στην **KB**, η οποία κατασκευάζεται ως ένα σύνολο γονικών-θυγατρικών σχέσεων. Για παράδειγμα, ο όρος **μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα** είναι παιδί του καρκίνου του πνεύμονα, καθώς ο **μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα** είναι ένας τύπος καρκίνου του πνεύμονα. Η **Εικόνα 3** απεικονίζει ένα υποσύνολο ενός παραδείγματος οντολογίας της νόσου, που παρουσιάζει τον συμπαγή όγκο ως τον ριζικό όρο και τους όρους που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα και τον καρκίνο του θυρεοειδούς (δεν εμφανίζονται άλλοι τύποι όγκων). Ένας όρος που συνδέεται μέσω σχέσεων γονέα-παιδιού με όρους χαμηλότερου επιπέδου ονομάζεται πρόγονος. Οι συνδεδεμένοι όροι κατώτερου επιπέδου είναι απόγονοι του όρου του προγόνου. Για

παράδειγμα, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πρόγονος του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα και του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και το μυελοειδές καρκίνωμα του θυρεοειδούς είναι απόγονος τόσο του καρκινώματος του θυρεοειδούς όσο και του συμπαγούς όγκου.

Εικόνα 3 Υποσύνολο ενός παραδείγματος οντολογίας νόσου



Ο επιλεγμένος τύπος όγκου για ένα δείγμα ασθενούς επηρεάζει:

- ▶ Ποιες προβλεπόμενες χρήσεις συνοδευτικής διαγνωστικής εξέτασης αξιολογούνται για το δείγμα. Μόνο δείγματα ασθενών με τύπο όγκου που αντιστοιχεί ακριβώς ή απόγονος του τύπου όγκου για προβλεπόμενη χρήση συνοδευτικής διαγνωστικής εξέτασης θα αξιολογηθούν για τη συγκεκριμένη αξίωση.
- ▶ Ποιες παραλλαγές για τον προσδιορισμό του προφίλ του όγκου περιλαμβάνονται στην αναφορά TSO Comprehensive.

Οι παρακάτω οδηγίες περιγράφουν τη διαδικασία επιλογής ενός τύπου όγκου μέσω της οθόνης **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης). Ο τύπος όγκου μπορεί επίσης να οριστεί με την εισαγωγή ενός αρχείου CSV που περιέχει έναν τύπο όγκου (βλ. [Εισαγωγή δειγμάτων στη σελίδα 7](#)).

- 1 Εμφανίστε τους διαθέσιμους τύπους όγκου κάνοντας διπλό κλικ μέσα στο κελί **Tumor Type** (Τύπος όγκου) στη σειρά για το δείγμα. Οι διαθέσιμοι τύποι όγκων εμφανίζονται σε μια ιεραρχική λίστα οργανωμένη αλφαβητικά. Το πεδίο **Tumor Type** (Τύπος όγκου) χρησιμοποιείται επίσης για τον καθορισμό ενός τύπου μάρτυρα για δείγματα μαρτύρων (βλ. [Δείγματα μαρτύρων στη σελίδα 7](#)).
- 2 Εντοπίστε και επιλέξτε τον επιθυμητό τύπο όγκου μέσω αλληλεπίδρασης με τη λίστα ή χρησιμοποιώντας τη γραμμή αναζήτησης στο επάνω μέρος του παραθύρου **Tumor Type** (Τύπος όγκου).



## Προετοιμασία για τα βήματα του πρωτοκόλλου

- 1 Απολυμάνετε ενδελεχώς τους χώρους εργασίας με καθαριστικό που αναστέλλει την **RNase/DNase**.



### ΠΡΟΣΟΧΗ

Όλες οι διαδικασίες στη ροή εργασιών απαιτούν περιβάλλον χωρίς **RNase/DNase**.

- 2 Ρυθμίστε τα προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή προενίσχυσης. Βλ. *Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 4*.
- 3 Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή για να ρυθμίσετε τη συσκευή παραγωγής υπερήχων.
- 4 Εάν υποβάλλετε σε επεξεργασία μόνο δείγματα **DNA**, μεταβείτε απευθείας στην ενότητα *Κατακερματισμός gDNA στη σελίδα 13*.
- 5 Αφαιρέστε τους μάρτυρες **RNA** από τον χώρο αποθήκευσης.
- 6 Αφαιρέστε τα σωληνάρια αντιδραστηρίων από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακας 3 TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης RNA (Κωδικός είδους 20031127)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
EPH3	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Αποδιάταξη και υβριδοποίηση RNA
FSM	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύνθεση μονόκλωνου cDNA
RVT	-25 °C έως -15 °C	Διατηρήστε σε πάγο.	Σύνθεση μονόκλωνου cDNA
SSM	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύνθεση δίκλωνου cDNA

Πίνακας 4 TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης (Ψύξη) (Κωδικός είδους 20031119)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
SPB (ετικέτα ανοιχτού πράσινου χρώματος)	2 °C έως 8 °C	Αφήστε για 30 λεπτά ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός cDNA
RSB	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός cDNA

## Αποδιάταξη και υβριδοποίηση RNA

### Προετοιμασία

- 1 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
- ▶ **EPH3** — Βάλτε το στην άκρη.
  - ▶ **FSM** — Περιδινήστε για ανάμειξη. Φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα και, στη συνέχεια, πιπετάρετε για ανάμειξη. Επιθεωρήστε για ιζήματα. Εάν υπάρχουν, πιπετάρετε για ανάμειξη έως ότου διαλυθούν τα ιζήματα.
  - ▶ **RVT** — Φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα και, στη συνέχεια, πιπετάρετε για ανάμειξη. Διατηρήστε σε πάγο.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ** Το **RVT** είναι ένα παχύρρευστο διάλυμα. Πιπετάρετε πάντα αργά για να αποφύγετε τη δημιουργία φυσαλίδων.

- 2 Σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης, συνδυάστε τους παρακάτω όγκους για να προετοιμάσετε βασικό μείγμα **FSM+RVT**.

Πίνακας 5 Βασικό μείγμα FSM+RVT

Συστατικό βασικού μείγματος	3 δείγματα RNA (μl)	8 δείγματα RNA (μl)	16 δείγματα RNA (μl)	24 δείγματα RNA (μl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Βλ. ενότητα Χειρισμός αντιδραστηρίων του Ένθετο συσκευασίας *TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου 200007789) για τους υπολογισμούς.

- 3 Πιπετάρετε δέκα φορές για ανάμειξη.
- 4 Τοποθετήστε το βασικό μείγμα **FSM+RVT** σε πάγο μέχρι τη *Σύνθεση μονόκλωνου cDNA* στη σελίδα 10.

### Διαδικασία

- 1 Αποψύξτε τα εκχυλισμένα δείγματα **RNA** και τους μάρτυρες **RNA** σε πάγο. Υποβάλλετε σε επεξεργασία τους μάρτυρες **RNA** ως δείγματα για το υπόλοιπο του πρωτοκόλλου. Βλ. *Ένθετο συσκευασίας TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου 200007789) για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.
- 2 Πιπετάρετε κάθε δείγμα **RNA** 10 φορές για ανάμειξη.
- 3 Χρησιμοποιήστε νερό χωρίς **RNase/DNase** για να παρασκευάσετε 40 ng από κάθε δείγμα **RNA** σε τελικό όγκο 8,5 μl (4,7 ng/μl). Για μάρτυρες **RNA**, χρησιμοποιήστε τη συγκέντρωση που παρέχεται στην επισήμανση του σωληναρίου.
- 4 Επισημάνετε μια νέα πλάκα **PCR 96** βοθρίων **CF** (Θραύσματα **cDNA**).
- 5 Προσθέστε 8,5 μl από κάθε δείγμα **RNA** σε ένα μοναδικό βοθρίο της πλάκας **CF PCR**.
- 6 Βεβαιωθείτε ότι η διάταξη και τα ευρετήρια της πλάκας δείγματος για κάθε δείγμα αντιστοιχούν στην εκτέλεση που έχει προγραμματιστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης **Local Run Manager**.
- 7 Περιδινήστε το **EPH3** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 8 Προσθέστε 8,5 μl **EPH3** σε κάθε βοθρίο δείγματος.
- 9 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα **CF PCR**.



#### ΠΡΟΣΟΧΗ

Φροντίστε να σφραγίσετε πλήρως τις άκρες και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.

- 10 Ανακινήστε στις 1.200 σ.α.λ. για 1 λεπτό.
- 11 Φυγοκεντρήστε στα 280 x g για 1 λεπτό.
- 12 Τοποθετήστε στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα **LQ-RNA**. Βλ. *Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών* στη σελίδα 4.
- 13 Όταν τα δείγματα φτάσουν στους 4 °C, περιμένετε για ένα λεπτό και μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα.

## Σύνθεση μονόκλωνου cDNA

### Διαδικασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Αφαφέστε την πλάκα **CF PCR** από τον θερμικό κυκλοποιητή.
- 2 Πιπετάρετε 5 φορές για να αναμείξετε το βασικό μείγμα **FSM+RVT**.
- 3 Προσθέστε 8 μl βασικού μείγματος **FSM+RVT** σε κάθε βοθρίο δείγματος.
- 4 Πιπετάρετε για ανάμειξη 5 φορές.
- 5 Απορρίψτε το υπόλοιπο βασικό μείγμα **FSM+RVT**.
- 6 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα **CF PCR**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- 7 Ανακινήστε στις 1.200 σ.α.λ. για 1 λεπτό.
- 8 Φυγοκεντρήστε στα 280 x g για 1 λεπτό.

- 9 Τοποθετήστε σε θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα **1stSS**.  
Βλ. *Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 4*.
- 10 Όταν τα δείγματα φτάσουν στους **4 °C**, μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα.  
Τα μονοκλωνικά δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους **4 °C** για έως και **5 λεπτά**.

## Σύνθεση δίκλωνου **cDNA**

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Παρασκευάστε το παρακάτω αντιδραστήριο.
- ▶ **SSM** — Αναστρέψτε **10 φορές** για ανάμειξη. Φυγοκεντρήστε σύντομα.

### Διαδικασία

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα **CF PCR** από τον θερμικό κυκλοποιητή.
- 2 Προσθέστε **25 μl SSM** σε κάθε βοθρίο δείγματος.
- 3 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα **CF PCR**.  
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- 4 Ανακινήστε στις **1.200 σ.α.λ.** για **1 λεπτό**.
- 5 Φυγοκεντρήστε στα **280 x g** για **1 λεπτό**.
- 6 Τοποθετήστε σε θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα **2ndSS**.  
Βλ. *Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 4*.
- 7 Όταν τα δείγματα φτάσουν στους **4 °C**, περιμένετε για ένα λεπτό και μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα.

## Καθαρισμός **cDNA**

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
- ▶ **SPB** — Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για **30 λεπτά**.
  - ▶ **RSB** — Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
- 2 Παρασκευάστε φρέσκο **EtOH 80%** σε κωνικό σωληνάριο των **15 ml** ή **50 ml**.

Αντιδραστήριο	3 δείγματα	8 δείγματα	16 δείγματα	24 δείγματα
100% Ethanol alcohol, καθαρή	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 μl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Περιδινήστε φρέσκο **EtOH 80%** για ανάμειξη.
- 4 Επιστημάνετε νέα πλάκα **MIDI 96** βοθρίων **BIND1** (Δέσμευση **cDNA**).
- 5 Καλύψτε την και αφήστε την στην άκρη.
- 6 Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

### Διαδικασία

#### Δέσμευση

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα **CF PCR** από τον θερμικό κυκλοποιητή.
- 2 Περιδινήστε το **SPB** για **1 λεπτό** για να επανεναιωρηθούν τα σφαιρίδια.
- 3 Προσθέστε αμέσως **90 μl SPB** σε κάθε βοθρίο της βιβλιοθήκης της πλάκας **BIND1 MIDI**.  
Εάν χρησιμοποιείτε δοχείο για τη διανομή του **SPB**, συμπεριλάβετε συντελεστή πλεονάσματος **1,05** κατά την κλασματοποίηση επαρκούς υλικού ανά δείγμα. Απορρίψτε τυχόν υπολειπόμενο υλικό μετά την προσθήκη του **SPB** σε κάθε βοθρίο δείγματος.

- 4 Μεταφέρετε ολόκληρο τον όγκο (50 µl) κάθε δείγματος από την πλάκα CF PCR στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας BIND1 MIDI.
- 5 Απορρίψτε την άδεια πλάκα PCR CF.
- 6 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα BIND1 MIDI. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 7 Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
- 8 Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- 9 Τοποθετήστε την πλάκα BIND1 MIDI σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
- 10 Χρησιμοποιήστε πιπέτα P200 ρυθμισμένη στα 200 µl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο δείγματος χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.

### Πλύση

- 1 Πλύνετε τα σφαιρίδια ως εξής.
  - a Διατηρήστε στη μαγνητική βάση και προσθέστε 200 µl φρέσκο EtOH 80% σε κάθε βοθρίο.
  - b Περιμένετε 30 δευτερόλεπτα.
  - c Αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο.
- 2 Πλύνετε τα σφαιρίδια για **δεύτερη** φορά.
- 3 Αφαιρέστε το υπολειπόμενο EtOH από κάθε βοθρίο. Χρησιμοποιήστε πιπέτα P20 με λεπτά ρύγχη.
- 4 Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο EtOH 80%.

### Έκλυση

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα BIND1 MIDI από τη μαγνητική βάση.
- 2 Αναστρέψτε ή περιδινήστε το RSB για ανάμειξη.
- 3 Προσθέστε 22 µl RSB σε κάθε βοθρίο δείγματος.
- 4 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα BIND1 MIDI. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 5 Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
- 6 Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
- 7 Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
- 8 Επιστημάνετε νέα πλάκα PCF MIDI 96 βοθρίων (Κεκαθαρμένα θραύσματα cDNA). Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία στο **ΑΣΦΑΛΕΣ ΣΗΜΕΙΟ ΔΙΑΚΟΠΗΣ** στη **σελίδα 12**, χρησιμοποιήστε πλάκα PCR.
- 9 Μεταφέρετε 20 µl εκλούσματος από κάθε βοθρίο δείγματος της πλάκας BIND1 MIDI στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας PCF.
- 10 Απορρίψτε την άδεια πλάκα BIND1 MIDI.
- 11 Προσθέστε 30 µl RSB σε κάθε βοθρίο δείγματος της πλάκας PCF.
- 12 Πιπετάρετε για ανάμειξη 10 φορές.
- 13 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCF και διατηρήστε την σε πάγο.
- 14 Επιστρέψτε τα EPH3, FSM, RVT και SSM στον χώρο αποθήκευσης.
- 15 Εάν υποβάλλετε σε επεξεργασία δείγματα που προέρχονται μόνο από RNA (cDNA) και δεν διακόπτετε τη διαδικασία στο ασφαλές σημείο διακοπής, μεταβείτε στο βήμα **Εκτέλεση επιδιόρθωσης και A-Tailing των άκρων** στη **σελίδα 15**.

### ΑΣΦΑΛΕΣ ΣΗΜΕΙΟ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, φυγοκεντρήστε την πλάκα PCR PCF στα 280 × g για 1 λεπτό και φυλάξτε την σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως και 7 ημέρες.

Ημερομηνία και ώρα διακοπής \_\_\_\_\_

## Προετοιμασία για τα βήματα του πρωτοκόλλου

- 1 Αφαιρέστε τους μάρτυρες DNA από τον χώρο αποθήκευσης.
- 2 Αφαιρέστε το σωληνάριο αντιδραστηρίου από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακας 6 TruSight Oncology Comp Library Prep (Ψύξη) (Κωδικός είδους 20031119)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
TEB	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Κατακερματισμός gDNA

## Κατακερματισμός gDNA

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Βεβαιωθείτε ότι ακολουθείτε τις συστάσεις στο Ένθετο συσκευασίας *TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου **200007789**) για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.
- 2 Παρασκευάστε το παρακάτω αντιδραστήριο.
  - ▶ **TEB** — Αναστρέψτε ή περιδινήστε για ανάμειξη.

### Διαδικασία

#### Προετοιμασία της πλάκας

- 1 Επλέξτε μία από τις ακόλουθες τρεις επιλογές για να προετοιμάσετε την πλάκα.
  - ▶ **Επιλογή 1:** Επεξεργασία των δειγμάτων gDNA ταυτόχρονα με τα δείγματα cDNA στην πλάκα MIDI PCF.
    - a Επιστημάνετε την πλάκα MIDI PCF LP (Προετοιμασία βιβλιοθήκης).
    - b Τοποθετήστε σε πάγο και αφήστε τα στην άκρη για χρήση στο βήμα *Μεταφορά κατακερματισμένου DNA* στη σελίδα 14.
  - ▶ **Επιλογή 2:** Επεξεργασία των δειγμάτων gDNA ταυτόχρονα με τα δείγματα cDNA με κατεψυγμένη την πλάκα PCR PCF.
    - a Αποψύξτε την πλάκα PCR PCF σε θερμοκρασία δωματίου.
    - b Φυγοκεντρήστε στα 280 x g για 1 λεπτό.
    - c Πιπετάρετε 10 φορές για ανάμειξη.
    - d Επιστημάνετε μια νέα πλάκα MIDI 96 βοθρίων LP (Προετοιμασία βιβλιοθήκης).
    - e Μεταφέρετε ολόκληρη την ποσότητα των 50 μl κάθε δείγματος από την πλάκα PCR PCF στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας MIDI LP.
    - f Απορρίψτε την πλάκα PCR PCF.
    - g Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών και τοποθετήστε σε πάγο μέχρι να εκτελέσετε το βήμα *Μεταφορά κατακερματισμένου DNA* στη σελίδα 14.
  - ▶ **Επιλογή 3:** Επεξεργασία μόνο δειγμάτων gDNA.
    - a Επιστημάνετε μια νέα πλάκα MIDI 96 βοθρίων LP (Προετοιμασία βιβλιοθήκης).
    - b Εάν σταματήσετε στο βήμα *ΑΣΦΑΛΕΣ ΣΗΜΕΙΟ ΔΙΑΚΟΠΗΣ* στη σελίδα 14, χρησιμοποιήστε πλάκα PCR.
    - c Καλύψτε και αφήστε τα στην άκρη για χρήση στο βήμα *Μεταφορά κατακερματισμένου DNA* στη σελίδα 14.

### Αραίωση gDNA

- 1 Αποψύξτε τα δείγματα **gDNA** και τους μάρτυρες **DNA** σε θερμοκρασία δωματίου. Επεξεργαστείτε τους μάρτυρες **DNA** ως δείγματα για το υπόλοιπο του πρωτοκόλλου.
- 2 Πιπετάρετε κάθε δείγμα **gDNA** **10** φορές για ανάμειξη.
- 3 Φυγοκεντρήστε για λίγο το σωληνάριο για να συλλέξετε τα σταγονίδια.
- 4 Αναστρέψτε ή περιδινήστε το **TEB** για ανάμειξη.
- 5 Χρησιμοποιήστε **TEB** για να παρασκευάσετε **40 ng** από κάθε δείγμα **gDNA** με τελικό όγκο **52 μl (0,77 ng/μl)**. Ο προσδιορισμός απαιτεί ελάχιστη συγκέντρωση εκχύλισης **3,33 ng/μl**, για να επιτρέψει τουλάχιστον **40 μl TEB** του όγκου των **52 μl**. Για μάρτυρες **DNA**, χρησιμοποιήστε τη συγκέντρωση που παρέχεται στην επισήμανση του σωληναρίου. Για να αποφευχθεί η απώλεια δείγματος, μην μεταφέρετε με πιπέτα λιγότερο από **2 μl** δείγματος σε αυτήν την αραίωση.

### Θραύσμα

- 1 Προσθέστε **52 μl** από κάθε δείγμα **gDNA** σε ξεχωριστό βοθρίο του σωληναρίου της συσκευής παραγωγής υπερήχων.
- 2 Καταγράψτε τον προσανατολισμό της ταινίας.
- 3 Κατακερματίστε το **gDNA** σε θραύσματα με συσκευή παραγωγής υπερήχων.

### Μεταφορά κατακερματισμένου DNA

- 1 Βεβαιωθείτε ότι η διάταξη και τα ευρετήρια της πλάκας δείγματος για κάθε δείγμα αντιστοιχούν στην εκτέλεση που έχει προγραμματιστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης **Local Run Manager**.
- 2 Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή της συσκευής παραγωγής υπερήχων για να ανακτήσετε το δείγμα. Για ορισμένους τύπους σωληναρίων συσκευών παραγωγής υπερήχων, μπορεί να είναι απαραίτητη η φυγοκέντρωση για τη συνένωση του δείγματος στο σωληνάριο.
- 3 Για κάθε κατακερματισμένο δείγμα **gDNA**, χρησιμοποιήστε πιπέτα **p20** με λεπτά ρύγχη για να πραγματοποιήσετε **3** μεταφορές των **16,7 μl** σε κενό βοθρίο της πλάκας **LP MIDI**.
- 4 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα **MIDI LP**.

### ΑΣΦΑΛΕΣ ΣΗΜΕΙΟ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, εφαρμόστε αυτοκόλλητη στεγανοποίηση πλακών στην πλάκα **LP PCR** και φυγοκεντρήστε στα **280 x g** για **1** λεπτό. Αποθηκεύστε σε θερμοκρασία **-25 °C** έως **-15 °C** για έως και **7** ημέρες.

Ημερομηνία και ώρα διακοπής \_\_\_\_\_

## Προετοιμασία για τα βήματα του πρωτοκόλλου

- 1 Ετοιμάστε έναν κουβά πάγου.
- 2 Αφαιρέστε το σωληνάριο αντιδραστήριου από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακας 7 TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης (Κατάψυξη) (Κωδικός είδους 20031118)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
ERA1-A	-25 °C έως -15 °C	Διατηρήστε σε πάγο.	Εκτέλεση επιδιόρθωσης και <b>A-Tailing</b> των άκρων
ERA1-B	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Εκτέλεση επιδιόρθωσης και <b>A-Tailing</b> των άκρων
ALB1	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Λιγοποίηση προσαρμοστών
LIG3	-25 °C έως -15 °C	Διατηρήστε σε πάγο.	Λιγοποίηση προσαρμοστών
SUA1 (μπλε πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Λιγοποίηση προσαρμοστών

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
UMI (λευκό πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Λιγοποίηση προσαρμοστών
STL	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Λιγοποίηση προσαρμοστών
EPM	-25 °C έως -15 °C	Διατηρήστε σε πάγο.	Ευρετηριασμός PCR

Πίνακας 8 TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης (Ψύξη) (Κωδικός είδους 20031119)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
SPB (ετικέτα ανοιχτού πράσινου χρώματος)	2 °C έως 8 °C	Αφήστε για 30 λεπτά ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός λιγοποίησης
RSB	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός λιγοποίησης

Πίνακας 9 TruSight Oncology Comp Εκκινητές ευρετηρίου UP Box (Κωδικός είδους 20031120)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
UPxx	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε τα κατάλληλα σωληνάρια εκκινητών ευρετηρίου ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Ευρετηριασμός PCR

Πίνακας 10 TruSight Oncology Comp Εκκινητές ευρετηρίου CP Box (Κωδικός είδους 20031126)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
CPxx	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε τα κατάλληλα σωληνάρια εκκινητών ευρετηρίου ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Ευρετηριασμός PCR

## Εκτέλεση επιδιόρθωσης και A-Tailing των άκρων

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Προθερμάνετε 2 επωαστήρες μικροδειγμάτων με ένθετα θερμαντικών συσκευών MIDI ως εξής.
  - ▶ Προθερμάνετε έναν επωαστήρα μικροδειγμάτων στους 30 °C.
  - ▶ Προθερμάνετε έναν επωαστήρα μικροδειγμάτων στους 72 °C.
- 2 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
  - ▶ **ERA1-A** — Φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα και, στη συνέχεια, πιπετάρτε για ανάμειξη. Διατηρήστε σε πάγο.
  - ▶ **ERA1-B** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Επιθεωρήστε για ιζήματα. Εάν υπάρχουν, θερμάνετε το σωληνάριο στους 37 °C και, στη συνέχεια, πιπετάρτε για ανάμειξη έως ότου διαλυθούν τα ιζήματα.
- 3 Παρασκευάστε το βασικό μείγμα **ERA1** σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης.

Πίνακας 11 Βασικό μείγμα ERA1

Συστατικό βασικού μείγματος	3 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
ERA1-B	26 μl	69 μl	138 μl	207 μl	415 μl
ERA1-A	10 μl	27 μl	54 μl	81 μl	161 μl

Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Βλ. ενότητα Χειρισμός αντιδραστηρίων του Ένθετο συσκευασίας TruSight Oncology Comprehensive (EU) (αρ. εγγράφου 200007789) για τους υπολογισμούς.

- 4 Πιπετάρτε αργά 10 φορές για ανάμειξη, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα και κατόπιν τοποθετήστε το βασικό μείγμα **ERA1** σε πάγο.
- 5 Επiléξτε την κατάλληλη από τις δύο παρακάτω επιλογές για την προετοιμασία της πλάκας.
  - ▶ **Επιλογή 1:** Εάν τα δείγματα βρίσκονται σε πλάκα **MIDI**.

- a Επισημάνετε εκ νέου την πλάκα **LP2 MIDI** (Προετοιμασία βιβλιοθήκης 2).  
Εάν ορισμένα δείγματα βρίσκονται σε ξεχωριστές πλάκες **MIDI**, μετακινήστε όλα τα δείγματα σε ξεχωριστά βοθρία της ίδιας πλάκας **MIDI** σύμφωνα με τη διάταξη πλάκας.
  - ▶ **Επιλογή 2:** Εάν η πλάκα έχει καταψυχθεί.
- a Αποψύξτε την πλάκα **PCF PCR** ή την πλάκα **LP PCR** σε θερμοκρασία δωματίου.
- b Φυγοκεντρήστε την πλάκα στα **280 x g** για **1** λεπτό.
- c Πιπετάρετε **10** φορές για ανάμιξη.
- d Επισημάνετε μια νέα πλάκα **MIDI 96** βοθρίων **LP2** (Προετοιμασία βιβλιοθήκης 2).
- e Μεταφέρετε ολόκληρη την ποσότητα των **50 μl** κάθε δείγματος από την πλάκα **PCF PCR** ή την πλάκα **LP PCR** στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας **LP2 MIDI**.
- f Απορρίψτε την πλάκα **PCR PCF** ή την πλάκα **PCR LP**.

### Διαδικασία

- 1 Προσθέστε **10 μl** βασικού μείγματος **ERA1** σε κάθε βοθρίο δείγματος στην πλάκα **LP2 MIDI**.
- 2 Απορρίψτε το υπόλοιπο βασικό μείγμα **ERA1**.
- 3 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **LP2 MIDI**.  
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- 4 Ανακινήστε στις **1.800** σ.α.λ. για **2** λεπτά.
- 5 Επιάστε στον προθερμασμένο επωαστήρα μικροδειγμάτων στους **30 °C** για **30** λεπτά.
- 6 Μεταφέρετε αμέσως σε έναν δεύτερο προθερμασμένο επωαστήρα μικροδειγμάτων και επιάστε στους **72 °C** για **20** λεπτά.
- 7 Τοποθετήστε την πλάκα **LP2 MIDI** σε πάγο για **5** λεπτά.

### Λιγοποίηση προσαρμοστών

Αυτή η διαδικασία συνδέει προσαρμοστές στα άκρα των θραυσμάτων **cDNA** ή/και **gDNA**.

Ο προσδιορισμός **TSO Comprehensive** περιλαμβάνει προσαρμοστές **SUA1** και προσαρμοστές **UMI**.

- ▶ Χρησιμοποιήστε προσαρμοστές **SUA1** με δείγματα **RNA**.
- ▶ Χρησιμοποιήστε προσαρμοστές **UMI** με δείγματα **DNA**.

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
  - ▶ **ALB1** — Περιδινήστε για ανάμιξη επί **10** δευτερόλεπτα τουλάχιστον και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **LIG3** — Φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα και, στη συνέχεια, πιπετάρετε για ανάμιξη. Διατηρήστε σε πάγο.
  - ▶ **SUA1** — Περιδινήστε για ανάμιξη επί **10** δευτερόλεπτα τουλάχιστον και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **UMI** — Περιδινήστε για ανάμιξη επί **10** δευτερόλεπτα τουλάχιστον και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **STL** — Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.

### Διαδικασία

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα **LP2 MIDI** από τον πάγο.
- 2 Προσθέστε **60 μl ALB1** σε κάθε βοθρίο δείγματος της πλάκας **LP2 MIDI**, φροντίζοντας να πιπετάρετε αργά.



- 3 Προσθέστε **5 µl** **LIG3** σε κάθε βοθρίο δείγματος.
- 4 Προσθέστε προσαρμοστές.  
**Μην** συνδυάζετε διαφορετικούς τύπους προσαρμοστών μεταξύ τους.
  - Βοθρία δειγμάτων **RNA** – **10 µl** **SUA1** (μπλε πώμα) σε κάθε δείγμα που προέρχεται από **RNA**.
  - Βοθρία δειγμάτων **DNA** – **10 µl** **UMI** (λευκό πώμα) σε κάθε δείγμα που προέρχεται από **DNA**.
- 5 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **LP2 MIDI**.  
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 6 Ανακινήστε στις **1.800** σ.α.λ. για **2** λεπτά.
- 7 Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για **30** λεπτά.
- 8 Περιδινήστε το **STL** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 9 Προσθέστε **5 µl** **STL** σε κάθε βοθρίο δείγματος της πλάκας **LP2 MIDI**.
- 10 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **LP2 MIDI**.  
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- 11 Ανακινήστε στις **1.800** σ.α.λ. για **2** λεπτά.

## Καθαρισμός λιγοποίησης

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
  - ▶ **SPB** – Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για **30** λεπτά.
  - ▶ **RSB** – Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
- 2 Παρασκευάστε φρέσκο **EtOH 80%** σε κωνικό σωληνάριο των **15 ml** ή **50 ml**.

Αντιδραστήριο	3 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
100% Ethanol alcohol, καθαρή	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Περιδινήστε φρέσκο **EtOH 80%** για ανάμειξη.
- 4 Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

### Διαδικασία

#### Δέσμευση

- 1 Περιδινήστε το **SPB** για **1** λεπτό για να επανεναιωρηθούν τα σφαιρίδια.
- 2 Προσθέστε αμέσως **112 µl** **SPB** σε κάθε βοθρίο δείγματος της πλάκας **LP2 MIDI**.  
Εάν χρησιμοποιείτε δοχείο για τη διανομή του **SPB**, συμπεριλάβετε συντελεστή πλεονάσματος **1,05** κατά τη κλασματοποίηση επαρκούς υλικού ανά δείγμα. Απορρίψτε τυχόν υπολειπόμενο υλικό μετά την προσθήκη του **SPB** σε κάθε βοθρίο δείγματος.
- 3 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **LP2 MIDI**.  
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 4 Ανακινήστε στις **1.800** σ.α.λ. για **2** λεπτά.
- 5 Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για **5** λεπτά.
- 6 Τοποθετήστε την πλάκα **LP2 MIDI** στη μαγνητική βάση για **10** λεπτά.
- 7 Χρησιμοποιήστε πιπέτα **P200** ρυθμισμένη στα **200 µl** για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο δείγματος χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.

## Πλύση

- 1 Πλύνετε τα σφαιρίδια ως εξής.
  - a Διατηρήστε στη μαγνητική βάση και προσθέστε **200 μl** φρέσκο **EtOH 80%** σε κάθε βοθρίο δείγματος.
  - b Περιμένετε **30** δευτερόλεπτα.
  - c Αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.
- 2 Πλύνετε τα σφαιρίδια για **δεύτερη** φορά.
- 3 Αφαιρέστε το υπολειπόμενο **EtOH** από κάθε βοθρίο.  
Χρησιμοποιήστε πιπέτα **P20** με λεπτά ρύγχη.
- 4 Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο **EtOH 80%**.

## Έκλουση

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα **LP2 MIDI** από τη μαγνητική βάση.
- 2 Αναστρέψτε ή περιδινήστε το **RSB** για ανάμειξη.
- 3 Προσθέστε **27,5 μl RSB** σε κάθε βοθρίο δείγματος.
- 4 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **LP2 MIDI**.  
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 5 Ανακινήστε στις **1.800 σ.α.λ.** για **2** λεπτά.
- 6 Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για **2** λεπτά.
- 7 Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για **2** λεπτά.
- 8 Επισημάνετε **μια** νέα πλάκα **PCR 96** βοθρίων **LS** (Δείγματα βιβλιοθήκης).
- 9 Μεταφέρετε **25 μl** από κάθε έκλουσμα από την πλάκα **LP2 MIDI** στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας **LS PCR**.
- 10 Απορρίψτε την άδεια πλάκα **LP2 MIDI**.
- 11 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **LS PCR**.

## Ευρετηριασμός PCR

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
  - ▶ **EPM** — Διατηρήστε το σε πάγο.
  - ▶ **UPxx** — Περιδινήστε για ανάμειξη και φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Το **UPxx** είναι ο εκκινητής ευρετηρίου που έχει επιλεγεί στην οθόνη **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης) στο λογισμικό **Local Run Manager** κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης.
  - ▶ **CPxx** — Περιδινήστε για ανάμειξη και φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Το **UPxx** είναι ο εκκινητής ευρετηρίου που στην οθόνη **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης) στο λογισμικό **Local Run Manager** κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης.
- 2 Βεβαιωθείτε ότι τα ευρετήρια για κάθε δείγμα αντιστοιχούν στην εκτέλεση που έχει προγραμματιστεί στο **Local Run Manager** κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης. Βεβαιωθείτε ότι ακολουθείτε τις οδηγίες σχετικά με την επιλογή ευρετηρίου στο Ένθετο συσκευασίας **TruSight Oncology Comprehensive (EU)** (αρ. εγγράφου **200007789**).



### ΠΡΟΣΟΧΗ

Τυχόν εσφαλμένες αντιστοιχίσεις μεταξύ των δειγμάτων και των εκκινητών ευρετηρίου έχουν ως αποτέλεσμα εσφαλμένη αναφορά αποτελεσμάτων λόγω απώλειας θετικής ταυτοποίησης δειγμάτων.

**Διαδικασία**

- 1 Προσθέστε **5 μl** του κατάλληλου εκκινητή ευρετηρίου (**UPxx** ή **CPxx**) στο αντίστοιχο βοθρίο δείγματος στην πλάκα **LS PCR** σύμφωνα με τα επιλεγμένα ευρετήρια που στην οθόνη **Create Run** (Δημιουργία εκτέλεσης) στο λογισμικό **Local Run Manager** κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Να χειρίζεστε και να ανοίγετε **μόνο ένα** σωληνάριο εκκινητή ευρετηρίου κάθε φορά. **Επαναπωματίστε** κάθε σωληνάριο ευρετηριασμού **αμέσως μετά** τη χρήση. Μην συνδυάζετε εκκινητές ευρετηρίου μεταξύ τους.

- 2 Περιδινήστε το **EPM** για ανάμειξη για **5 δευτερόλεπτα** και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 3 Προσθέστε **20 μl EPM** σε κάθε βοθρίο δείγματος.
- 4 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **PCR LS**. Σφραγίστε **πλήρως** τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- 5 Ανακινήστε στις **1.200 σ.α.λ.** για **1 λεπτό**.
- 6 Επιστρέψτε τα αντιδραστήρια προενίσχυσης στον χώρο αποθήκευσης.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Εκτελέστε όλα τα επόμενα βήματα σε περιοχή μετά την ενίσχυση για να αποτρέψετε τη μεταφορά προϊόντος ενίσχυσης.

- 7 Φυγοκεντρήστε την πλάκα **LS PCR** στα **280 x g** για **1 λεπτό**.
- 8 Τοποθετήστε την στον θερμικό κυκλοποιητή μετά την ενίσχυση και εκτελέστε το πρόγραμμα **I-PCR**. Βλ. *Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 4*.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ** Εάν συνεχίσετε με τη *Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού στη σελίδα 20*, ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης για τα αντιδραστήρια στην ενότητα Βήματα για την προετοιμασία του πρωτοκόλλου.

- 9 Αφού ολοκληρωθεί το πρόγραμμα **I-PCR**, φυγοκεντρήστε την πλάκα **LS PCR** στα **280 x g** για **1 λεπτό**.
- 10 Επισημάνετε εκ νέου την πλάκα **ALS** (Δείγματα ενισχυμένης βιβλιοθήκης).

**ΑΣΦΑΛΕΣ ΣΗΜΕΙΟ ΔΙΑΚΟΠΗΣ**

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, αποθηκεύστε την πλάκα **PCR ALS** σε θερμοκρασία **-25 °C** έως **-15 °C** για έως **30** ημέρες.

Ημερομηνία και ώρα διακοπής \_\_\_\_\_

**Προετοιμασία για τα βήματα του πρωτοκόλλου**

- 1 Μετά την ενίσχυση, βεβαιωθείτε ότι έχουν ρυθμιστεί τα προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή. Βλ. *Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 4*.
- 2 Αφαιρέστε το σωληνάριο αντιδραστηρίου από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακας 12 TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη) (Κωδικός είδους 20031123)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
TCB1	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού

Πίνακας 13 TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη) (Κωδικός είδους 20031121)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
TCA1	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού

Πίνακας 14 TruSight Oncology Comp Σετ περιεχομένου Box (Κωδικός είδους 20031122)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
OPR1 (κόκκινο πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού
OPD2 (λευκό πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού

## Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 01 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
  - ▶ **TCB1** — Θερμάνετε το σωληνάριο στους **37 °C** για **5 λεπτά**. Περιδινήστε για ανάμειξη επί **10 δευτερόλεπτα** και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **TCA1** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **OPR1** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **OPD2** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 02 Εάν η πλάκα **ALS PCR** αποθηκεύτηκε, αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήστε στα **280 x g** για **1 λεπτό**. Στη συνέχεια, πιπετάρτε για ανάμειξη.
- 03 Επισημάνετε μια νέα πλάκα **PCR 96** βοθρίων **HYB1** (Υβριδοποίηση 1).

### Διαδικασία

- 01 Μεταφέρετε **20 μl** από κάθε βιβλιοθήκη **cDNA** ή/και **gDNA** από την πλάκα **ALS PCR** στο αντίστοιχο βοθρίο στην πλάκα **HYB1 PCR**.
- 02 Εφαρμόστε το αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **PCR ALS** και αφήστε την στην άκρη. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 03 Επιθεωρήστε το **TCB1** για ιζήματα. Εάν υπάρχουν, θερμάνετε ξανά το σωληνάριο και περιδινήστε το σωληνάριο μέχρι να διαλυθούν οι κρύσταλλοι.
- 04 Προσθέστε **15 μl TCB1** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στην πλάκα **PCR HYB1**.
- 05 Προσθέστε **10 μl TCA1** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στην πλάκα **PCR HYB1**.
- 06 Προσθέστε ανιχνευτές.
 

**Μην** συνδυάζετε διαφορετικούς τύπους ανιχνευτών μεταξύ τους.

  - ▶ Βοθρία βιβλιοθήκης **RNA** — **5 μl OPR1** σε κάθε βιβλιοθήκη που προέρχεται από **RNA**.
  - ▶ Βοθρία βιβλιοθήκης **DNA** — **5 μl OPD2** σε κάθε βιβλιοθήκη που προέρχεται από **DNA**.
- 07 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **PCR HYB1**.



#### ΠΡΟΣΟΧΗ

Φροντίστε να σφραγίσετε πλήρως τις άκρες και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.

- 08 Ανακινήστε στις **1.200 σ.α.λ.** για **2 λεπτά**.
- 09 Τοποθετήστε στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα **HYB1**.  
Βλ. *Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 4*.
- 10 Υβριδοποιήστε στους **57 °C** για τουλάχιστον **8 ώρες** έως το πολύ **24 ώρες**.
- 11 Επιστρέψτε τα αντιδραστήρια υβριδισμού στον χώρο αποθήκευσης.
- 12 Φυλάσσετε την πλάκα **PCR ALS** σε θερμοκρασία **-25 °C** έως **-15 °C** για έως **30 ημέρες**.

## Προετοιμασία για τα βήματα του πρωτοκόλλου

- 01 Στην αρχή της ημέρας **2**, αφαιρέστε το σωληνάριο αντιδραστηρίου από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακας 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη) (Κωδικός είδους 20031123)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
SMB (ετικέτα σκούρου μπλε χρώματος)	2 °C έως 8 °C	Αφήστε για 30 λεπτά ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων ένα Σύλληψη στόχων δύο
ET2	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων ένα Σύλληψη στόχων δύο
HP3	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων ένα Σύλληψη στόχων δύο Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών
TCB1	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση δεύτερου υβριδισμού
RSB	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων δύο Καθαρισμός ενισχυμένης εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης

Πίνακας 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη) (Κωδικός είδους 20031121)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
EE2	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων ένα Σύλληψη στόχων δύο Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών
EEW	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων ένα
TCA1	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση δεύτερου υβριδισμού

Πίνακας 17 TruSight Oncology Comp Σετ περιεχομένου Box (Κωδικός είδους 20031122)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
OPR1 (κόκκινο πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση δεύτερου υβριδισμού
OPD2 (λευκό πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση δεύτερου υβριδισμού

## Σύλληψη στόχων ένα

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Προθερμάνετε έναν επωαστήρα μικροδειγμάτων με ένθετο θερμαντικής συσκευής MIDI στους 57 °C.
- 2 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
  - ▶ **EEW** — Περιδινήστε για ανάμειξη για 1 λεπτό.
  - ▶ **EE2** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **HP3** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **SMB** — Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
    - ▶ Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε το **SMB**, όχι το **SPB** για αυτήν τη διαδικασία.
  - ▶ **ET2** — Αφήστε στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
- 3 Παρασκευάστε φρέσκο μείγμα έκλουσης **EE2+HP3** σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης.

Πίνακας 18 Μείγμα έκλουσης EE2+HP3 για σύλληψη στόχων ένα

Συστατικό μείγματος έκλουσης	3 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
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

Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Βλ. ενότητα Χειρισμός αντιδραστηρίων του Ένθετο συσκευασίας TruSight Oncology Comprehensive (EU) (αρ. εγγράφου 200007789) για τους υπολογισμούς.

- 4 Περιδινήστε το μείγμα έκλυσης **EE2+HP3** και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Αφήστε στην άκρη για το βήμα *Έκλυση*.
- 5 Επιστημάνετε μια νέα πλάκα **MIDI 96** βοθρίων **CAP1** (Σύλληψη 1).
- 6 Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

## Διαδικασία

### Δέσμευση

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα **HYB1 PCR** από τον θερμικό κυκλοποιητή.
- 2 Φυγοκεντρήστε την πλάκα **HYB1 PCR** στα **280 x g** για **1** λεπτό.
- 3 Περιδινήστε το **SMB** για **1** λεπτό για να επανεναιωρηθούν τα σφαιρίδια.
- 4 Προσθέστε αμέσως **150 μl SMB** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας **CAP1 MIDI**.  
Εάν χρησιμοποιείτε δοχείο για τη διανομή του **SMB**, συμπεριλάβετε συντελεστή πλεονάσματος **1,15** κατά την κλασματοποίηση επαρκούς υλικού ανά δείγμα. Απορρίψτε τυχόν υπολειπόμενο υλικό μετά την προσθήκη **SMB** σε κάθε βοθρίο δείγματος.
- 5 Ρυθμίστε την πιπέτα στα **50 μl** και μεταφέρετε ολόκληρο τον όγκο κάθε βιβλιοθήκης από την πλάκα **HYB1 PCR** στο αντίστοιχο βοθρίο στην πλάκα **CAP1 MIDI**.
- 6 Απορρίψτε την άδεια πλάκα **HYB1 PCR**.
- 7 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **CAP1 MIDI**.  
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- 8 Ανακινήστε στις **1.800** σ.α.λ. για **2** λεπτά.
- 9 Επιάστε στον προθερμασμένο επωαστήρα μικροδειγμάτων στους **57 °C** για **25** λεπτά.
- 10 Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για **2** λεπτά.
- 11 Ενώ διατηρείτε την πλάκα **CAP1 MIDI** στη μαγνητική βάση, χρησιμοποιήστε πιπέτα **P200** ρυθμισμένη στα **200 μl** για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.



### ΠΡΟΣΟΧΗ

Μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα (*Πλύση*). Μην αφήνετε το ίζημα σφαιριδίων να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να υπάρχει υγρό.

### Πλύση

- 1 Πλύνετε τα σφαιρίδια ως εξής.
  - a Αφαιρέστε την πλάκα **CAP1 MIDI** από τη μαγνητική βάση.
  - b Προσθέστε **200 μl EEW** σε κάθε βοθρίο.
  - c Ρυθμίστε τον όγκο της πιπέτας στα **150 μl** και πιπετάρετε για ανάμειξη τουλάχιστον **10** φορές. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σφαιρίδια έχουν επανεναιωρηθεί.



### ΠΡΟΣΟΧΗ

Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν ιζήματα σφαιριδίων αναρροφώντας προσεκτικά όλο το διάλυμα σφαιριδίων από το βοθρίο μέσα στο ρύγχος. Στη συνέχεια, κοιτάξτε τον πυθμένα κάθε βοθρίου για ίζημα. Γείρετε το ρύγχος της πιπέτας προς το ίζημα σφαιριδίων κατά τη διάρκεια των βημάτων πλύσης για να αποκολλήσετε το ίζημα. Βεβαιωθείτε ότι το ίζημα σφαιριδίων είναι πλήρως μέσα στο διάλυμα. Το διάλυμα θα πρέπει να έχει σκούρο καφέ χρώμα και ομογενοποιημένη σύσταση.

- d Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **CAP1 MIDI**.
- e Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- f Ανακινήστε στις **1.800** σ.α.λ. για **4** λεπτά.
- g Επιάστε σε επωαστήρα μικροδειγμάτων στους **57 °C** για **5** λεπτά.

- h Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
  - i Διατηρήστε στη μαγνητική βάση και αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.
- 2 Πλύνετε τα σφαιρίδια για **δεύτερη** φορά.
  - 3 Πλύνετε τα σφαιρίδια για **τρίτη** φορά.
  - 4 Αφαιρέστε το υπολειπόμενο υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο. Χρησιμοποιήστε πιπέτα **P20** με λεπτά ρύγχη.

### Έκλουση

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα **CAP1 MIDI** από τη μαγνητική βάση.
- 2 Περιδινήστε το φρέσκο μείγμα έκλουσης **EE2+HP3** και κατόπιν φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 3 Προσθέστε προσεκτικά **17 μl** μείγματος έκλουσης **EE2+HP3** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στην πλάκα **CAP1 MIDI**.
- 4 Απορρίψτε το υπόλοιπο μείγμα έκλουσης **EE2+HP3**.
- 5 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **CAP1 MIDI**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 6 Ανακινήστε στις **1.800** σ.α.λ. για 2 λεπτά.
- 7 Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
- 8 Επισημάνετε μια νέα πλάκα **PCR 96** βοθρίων **ELU1** (Ε κλουση 1).
- 9 Περιδινήστε το **ET2** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 10 Προσθέστε **5 μl** **ET2** σε κάθε αντίστοιχο βοθρίο βιβλιοθήκης στη νέα πλάκα **PCR ELU1**.
- 11 Μεταφέρετε προσεκτικά **15 μl** εκλούσματος από κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας **CAP1 MIDI** στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας **ELU1 PCR**.
- 12 Απορρίψτε την άδεια πλάκα **CAP1 MIDI**.
- 13 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **PCR ELU1**.
- 14 Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- 15 Ανακινήστε στις **1.200** σ.α.λ. για 2 λεπτά.
- 16 Επιστρέψτε το **EEW** στον χώρο αποθήκευσης.

## Ρύθμιση δεύτερου υβριδισμού

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
  - ▶ **TCB1** — Θερμάνετε το σωληνάριο στους **37 °C** για **5** λεπτά. Περιδινήστε για ανάμειξη επί **10** δευτερόλεπτα και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **TCA1** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **OPR1** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **OPD2** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

### Διαδικασία

- 1 Επιθεωρήστε το **TCB1** για ιζήματα. Εάν υπάρχουν, θερμάνετε ξανά το σωληνάριο και περιδινήστε έως ότου διαλυθούν οι κρύσταλλοι.
- 2 Προσθέστε **15 μl** **TCB1** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στην πλάκα **PCR ELU1**.
- 3 Προσθέστε **10 μl** **TCA1** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης.
- 4 Προσθέστε ανιχνευτές.
 

**Μην** συνδυάζετε διαφορετικούς τύπους ανιχνευτών μεταξύ τους.

  - ▶ Βοθρία βιβλιοθήκης **RNA** — **5 μl** **OPR1** σε κάθε βιβλιοθήκη που προέρχεται από **RNA**.
  - ▶ Βοθρία βιβλιοθήκης **DNA** — **5 μl** **OPD2** σε κάθε βιβλιοθήκη που προέρχεται από **DNA**.

- 5 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **PCR ELU1**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- 6 Ανακινήστε στις **1.200** σ.α.λ. για **2** λεπτά.
- 7 Τοποθετήστε σε θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα **HYB2**.  
Βλ. *Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 4*.
- 8 Υβριδοποιήστε στους **57 °C** για χρονικό διάστημα από τουλάχιστον **1,5** ώρα έως και **4** ώρες το μέγιστο.
- 9 Επιστρέψτε τα **TCA1, TCB1, OPR1** και **OPD2** στον χώρο αποθήκευσης.

## Σύλληψη στόχων δύο

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Προθερμάνετε έναν επωαστήρα μικροδειγμάτων με ένθετο θερμαντικής συσκευής **MIDI** στους **57 °C**.
- 2 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
  - ▶ **EE2** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **HP3** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **SMB** — Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για **30** λεπτά.
    - ▶ Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε το **SMB**, όχι το **SPB** για αυτήν τη διαδικασία.
  - ▶ **RSB** — Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
  - ▶ **ET2** — Αφήστε στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
- 3 Παρασκευάστε φρέσκο μείγμα έκλουσης **EE2+HP3** σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης.

Πίνακας 19 Μείγμα έκλουσης EE2+HP3 για σύλληψη στόχων δύο

Συστατικό μείγματος έκλουσης	3 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
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

Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Βλ. ενότητα Χειρισμός αντιδραστηρίων του Ένθετο συσκευασίας *TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου 200007789) για τους υπολογισμούς.

- 4 Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Αφήστε στην άκρη για το βήμα *Έκλουση*.
- 5 Επιστημάνετε μια νέα πλάκα **MIDI 96** βοθρίων **CAP2** (σύλληψη 2).
- 6 Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

### Διαδικασία

#### Δέσμευση

- 1 Αφαφέστε την πλάκα **PCR ELU1** από τον θερμικό κυκλοποιητή.
- 2 Φυγοκεντρήστε την πλάκα **PCR ELU1** στα **280 x g** για **1** λεπτό.
- 3 Περιδινήστε το **SMB** για **1** λεπτό για να επανεναιωρηθούν τα σφαιρίδια.
- 4 Προσθέστε αμέσως **150 μl SMB** σε κάθε βοθρίο της βιβλιοθήκης της πλάκας **CAP2 MIDI**.  
Εάν χρησιμοποιείτε δοχείο για τη διανομή του **SMB**, συμπεριλάβετε συντελεστή πλεονάσματος **1,15** κατά την κλασματοποίηση επαρκούς υλικού ανά δείγμα. Απορρίψτε τυχόν υπολειπόμενο υλικό μετά την προσθήκη **SMB** σε κάθε βοθρίο δείγματος.
- 5 Ρυθμίστε την πιπέτα στα **50 μl** και μεταφέρετε ολόκληρο τον όγκο κάθε βιβλιοθήκης από την πλάκα **ELU1 PCR** στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας **CAP2 MIDI**.
- 6 Απορρίψτε την άδεια πλάκα **PCR ELU1**.
- 7 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **CAP2 MIDI**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- 8 Ανακινήστε στις **1.800** σ.α.λ. για **2** λεπτά.



- 9 Επιάστε σε επωαστήρα μικροδειγμάτων στους 57 °C για 25 λεπτά.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ** Εάν συνεχίσετε με την *Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης στη σελίδα 26*, ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης για τα αντιδραστήρια στην ενότητα Προετοιμασία για τα βήματα του πρωτοκόλλου.

- 10 Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
- 11 Διατηρήστε την πλάκα **CAP2 MIDI** στη μαγνητική βάση και χρησιμοποιήστε μια πιπέτα **P200** ρυθμισμένη στα **200 μl** για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.



#### ΠΡΟΣΟΧΗ

Μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα (*Πλύση*). Μην αφήνετε το ίζημα σφαιριδίων να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να υπάρχει υγρό.

#### Πλύση

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα **CAP2 MIDI** από τη μαγνητική βάση.
- 2 Αναστρέψτε ή περιδινήστε το **RSB** για ανάμειξη.
- 3 Προσθέστε **200 μl RSB** σε κάθε βοθρίο.
- 4 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα **CAP2 MIDI**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 5 Ανακινήστε στις **1.800 σ.α.λ.** για 4 λεπτά.
- 6 Τοποθετήστε στη μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
- 7 Διατηρήστε την πλάκα **CAP2 MIDI** στη μαγνητική βάση και αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό χωρίς να διαταράξετε τα ίζημα σφαιριδίων.
- 8 Αφαιρέστε το υπολειπόμενο υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο. Χρησιμοποιήστε πιπέτα **P20** με λεπτά ρύγχη.

#### Έκλουση

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα **CAP2 MIDI** από τη μαγνητική βάση.
- 2 Περιδινήστε το φρέσκο μείγμα έκλουσης **EE2+HP3** και κατόπιν φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 3 Προσθέστε **22 μl** μείγματος έκλουσης **EE2 + HP3** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στην πλάκα **CAP2 MIDI**.
- 4 Απορρίψτε το υπόλοιπο μείγμα έκλουσης **EE2+HP3**.
- 5 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα **CAP2 MIDI**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 6 Ανακινήστε στις **1.800 σ.α.λ.** για 2 λεπτά.
- 7 Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
- 8 Επιστημάνετε μια νέα πλάκα **PCR 96** βοθρίων **ELU2** (Ε κλουση 2).
- 9 Περιδινήστε το **ET2** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 10 Προσθέστε **5 μl ET2** σε κάθε αντίστοιχο βοθρίο της βιβλιοθήκης στη νέα πλάκα **ELU2 PCR**.
- 11 Μεταφέρετε προσεκτικά **20 μl** εκλούσματος από κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας **CAP2 MIDI** στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας **ELU2 PCR2**.
- 12 Απορρίψτε την άδεια πλάκα **CAP2 MIDI**.
- 13 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα **ELU2 PCR**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- 14 Ανακινήστε στις **1.200 σ.α.λ.** για 2 λεπτά.
- 15 Επιστρέψτε τα **SMB, EE2, HP3** και **ET2** στον χώρο αποθήκευσης.

### ΑΣΦΑΛΕΣ ΣΗΜΕΙΟ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, φυγοκεντρήστε την πλάκα **ELU2 PCR** στα **280 x g** για **1 λεπτό** και φυλάξτε την σε θερμοκρασία **-25 °C** έως **-15 °C** για έως και **7 ημέρες**. Επιστρέψτε το **RSB** στον χώρο αποθήκευσης.

Ημερομηνία και ώρα διακοπής \_\_\_\_\_

## Προετοιμασία για τα βήματα του πρωτοκόλλου

- 1 Ετοιμάστε έναν κουβά πάγου.
- 2 Αφαιρέστε το σωληνάριο αντιδραστηρίου από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακας 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη) (Κωδικός είδους 20031121)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
PPC3	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης
EPM	-25 °C έως -15 °C	Διατηρήστε σε πάγο.	Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης

Πίνακας 21 TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη) (Κωδικός είδους 20031123)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
SPB (ετικέτα ανοιχτού πράσινου χρώματος)	2 °C έως 8 °C	Αφήστε για 30 λεπτά ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός εμπλουτισμένης ενισχυμένης βιβλιοθήκης
RSB	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός εμπλουτισμένης ενισχυμένης βιβλιοθήκης Προετοιμασία για αλληλούχηση

## Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Εάν η πλάκα **ELU2** αποθηκεύτηκε, αποψύξτε την σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν φυγοκεντρήστε στα **280 x g** για **1 λεπτό**.

### Διαδικασία

- 1 Περιδινήστε το **PPC3** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 2 Προσθέστε **5 μl PPC3** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας **ELU2 PCR**.
- 3 Περιδινήστε το **EPM** για ανάμειξη επί **5 δευτερόλεπτα** και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 4 Προσθέστε **20 μl EPM** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης.
- 5 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα **ELU2 PCR**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- 6 Ανακινήστε στις **1.200 σ.α.λ.** για **2 λεπτά**.
- 7 Τοποθετήστε στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα **EL-PCR**.  
Βλ. *Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών* στη σελίδα **4**.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ** Εάν συνεχίσετε με την *Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών* στη σελίδα **28**, ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης στην ενότητα Προετοιμασία για τα βήματα του πρωτοκόλλου.

- 8 Επιστρέψτε το **PPC3** και το **EPM** στον χώρο αποθήκευσης.

## Καθαρισμός ενισχυμένης εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης

## Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
- ▶ **SPB** — Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για **30** λεπτά.
    - ▶ Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε **SPB**, όχι **SMB** για αυτήν τη διαδικασία.
  - ▶ **RSB** — Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
- 2 Παρασκευάστε φρέσκια αιθανόλη **80%** σε κωνικό σωληνάριο των **15 ml** ή των **50 ml**.

Αντιδραστήριο	3 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
100% Ethanol alcohol, καθαρή	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 μl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Περιδινήστε φρέσκο **EtOH 80%** για ανάμειξη.
- 4 Επιστημάνετε νέα πλάκα **MIDI 96** βοθρίων **BIND2** (δέσμευση καθαρισμού).
- 5 Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

## Διαδικασία

## Δέσμευση

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα **ELU2 PCR** από τον θερμικό κυκλοποιητή.
- 2 Φυγοκεντρήστε την πλάκα **ELU2 PCR** στα **280 x g** για **1** λεπτό.
- 3 Περιδινήστε το **SPB** επί **1** λεπτό για να επαναναωρηθούν τα σφαιρίδια.
- 4 Προσθέστε αμέσως **110 μl SPB** σε κάθε βοθρίο της βιβλιοθήκης της πλάκας **BIND2 MIDI**.
- 5 Μεταφέρετε **50 μl** κάθε βιβλιοθήκης από την πλάκα **ELU2 PCR** στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας **BIND2 MIDI**.
- 6 Απορρίψτε την άδεια πλάκα **ELU2 PCR**.
- 7 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **BIND2 MIDI**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 8 Ανακινήστε στις **1.800 σ.α.λ.** για **2** λεπτά.
- 9 Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για **5** λεπτά.
- 10 Τοποθετήστε την πλάκα στη μαγνητική βάση για **5** λεπτά.
- 11 Χρησιμοποιήστε πιπέτα **P200** ρυθμισμένη στα **200 μl** για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε **όλο** το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.

## Πλύση

- 1 Πλύνετε τα σφαιρίδια ως εξής.
- a Διατηρήστε σε μαγνητική βάση και προσθέστε **200 μl** φρέσκο **EtOH 80%** σε κάθε βοθρίο.
  - b Περιμένετε **30** δευτερόλεπτα.
  - c Αφαιρέστε και απορρίψτε **όλο** το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο δείγματος χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.
- 2 Πλύνετε τα σφαιρίδια για **δεύτερη** φορά.
- 3 Αφαιρέστε το υπολειπόμενο **EtOH** από κάθε βοθρίο. Χρησιμοποιήστε πιπέτα **P20** με λεπτά ρύγχη.
- 4 Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο **EtOH 80%**.

### Έκλουση

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα **BIND2 MIDI** από τη μαγνητική βάση.
- 2 Αναστρέψτε ή περιδινήστε για να αναμιχθεί το **RSB**.
- 3 Προσθέστε **32 μl RSB** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης.
- 4 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **BIND2 MIDI**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 5 Ανακινήστε στις **1.800 σ.α.λ.** για **2 λεπτά**.
- 6 Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για **2 λεπτά**.
- 7 Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για **2 λεπτά**.
- 8 Επιστημάνετε **μια νέα πλάκα PCR 96** βοθρίων **PL** (Κεκαθαρμένες βιβλιοθήκες).
- 9 Μεταφέρετε **30 μl** από κάθε έκλουσμα από την πλάκα **BIND2 MIDI** στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας **PL PCR**.
- 10 Απορρίψτε την άδεια πλάκα **BIND2 MIDI**.
- 11 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα **PL PCR**.
- 12 Επιστρέψτε το **SPB** στον χώρο αποθήκευσης.

### ΑΣΦΑΛΕΣ ΣΗΜΕΙΟ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, φυγοκεντρήστε την πλάκα **PL PCR** στα **280 x g** για **1 λεπτό** και φυλάξτε την σε θερμοκρασία **-25 °C** έως **-15 °C** για έως και **30 ημέρες**. Επιστρέψτε το **RSB** στον χώρο αποθήκευσης.

Ημερομηνία και ώρα διακοπής \_\_\_\_\_

## Προετοιμασία για τα βήματα του πρωτοκόλλου

- 1 Αφαιρέστε το σωληνάριο αντιδραστηρίου από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακας 22 TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη) (Κωδικός είδους 20031121)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
LNA1	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών
EE2	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών

Πίνακας 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη) (Κωδικός είδους 20031123)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
LNB1	2 °C έως 8 °C	Αφήστε για <b>30 λεπτά</b> ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών
HP3	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών Προετοιμασία για αλληλούχιση
LNW1	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών
LNS1	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών

- 2 Εάν συνεχίζετε την ίδια ημέρα με την επιλογή **Προετοιμασία για αλληλούχιση στη σελίδα 31**, ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης στην ενότητα Προετοιμασία για τα βήματα του πρωτοκόλλου.

## Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών

### Προετοιμασία

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
- ▶ **LNB1** — Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
  - ▶ **LNA1** — Περιδινήστε για ανάμειξη.
  - ▶ **EE2** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **HP3** — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
  - ▶ **LNW1** — Περιδινήστε για ανάμειξη. Αφήστε στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
  - ▶ **LNS1** — Περιδινήστε για ανάμειξη. Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
- 2 Περιδινήστε το **LNB1** για 1 λεπτό για να επανεναιωρηθούν τα σφαιρίδια. Αναστρέψτε το σωληνάριο **LNB1** για να βεβαιωθείτε ότι όλα τα σφαιρίδια έχουν επανεναιωρηθεί.
- 3 Χρησιμοποιώντας **P1000** ρυθμισμένη στα 800 μl, πιπετάρετε το **LNB1** πάνω-κάτω 10 φορές για να διασφαλίσετε την επαναώρηση.
- 4 Προετοιμάστε αμέσως φρέσκο βασικό μείγμα **LNA1+LNB1** σε κωνικό σωληνάριο.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Επανεναυρώστε πλήρως το ίζημα σφαιριδίων **LNB1** στον πυθμένα του σωληναρίου για να αποτρέψετε την ανομοιόμορφη πυκνότητα των συστάδων.

Πίνακας 24 Βασικό μείγμα LNA1+LNB1

Συστατικό βασικού μείγματος	3 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
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

Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Βλ. ενότητα Χειρισμός αντιδραστηρίων του Ένθετο συσκευασίας *TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου 200007789) για τους υπολογισμούς.

- 5 Περιδινήστε το βασικό μείγμα **LNA1 + LNB1**. Αφήστε στην άκρη για το βήμα **Δέσμευση**.
- 6 Παρασκευάστε φρέσκο μείγμα έκλουσης **EE2+HP3** σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης.

Πίνακας 25 Μείγμα έκλουσης EE2+HP3 για κανονικοποίηση βιβλιοθηκών

Συστατικό μείγματος έκλουσης	3 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
EE2	114 μl	304 μl	608 μl	912 μl	1.824 μl
HP3	6 μl	16 μl	32 μl	48 μl	96 μl

Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Βλ. ενότητα Χειρισμός αντιδραστηρίων του Ένθετο συσκευασίας *TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου 200007789) για τους υπολογισμούς.

- 7 Περιδινήστε φρέσκο μείγμα έκλουσης και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Αφήστε στην άκρη για το βήμα **Έκλουση**.
- 8 Εάν η πλάκα **PL PCR** αποθηκεύτηκε, αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό και, στη συνέχεια, πιπετάρετε για ανάμειξη.
- 9 Επισημάνετε μια νέα πλάκα **MIDI 96** βοθρίων **BBN** (Κανονικοποίηση βάσει σφαιριδίων).
- 10 Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

**Διαδικασία****Δέσμευση**

- 1 Περιδινήστε το βασικό μείγμα **LNA1 + LNB1**.
- 2 Προσθέστε αμέσως 45 μl βασικού μείγματος **LNA1 + LNB1** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας **BBN MIDI**.
- 3 Απορρίψτε το υπόλοιπο βασικό μείγμα **LNA1+LNB1**.
- 4 Προσθέστε 20 μl κάθε βιβλιοθήκης από την πλάκα **PL PCR** στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας **BBN MIDI**.
- 5 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **BBN MIDI**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.

- 6 Ανακινήστε στις **1.800** σ.α.λ. για **30** λεπτά.
- 7 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **PCR PL** και επιστρέψτε την στον χώρο αποθήκευσης.
- 8 Τοποθετήστε την πλάκα σε μαγνητική βάση για **2** λεπτά.
- 9 Διατηρήστε την σε μαγνητική βάση και χρησιμοποιήστε πιπέτα **P200** για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.

### Πλύση

- 1 Πλύνετε τα σφαιρίδια ως εξής.
  - a Αφαιρέστε την πλάκα **BBN MIDI** από τη μαγνητική βάση.
  - b Προσθέστε **45 μl LNW1** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης.
  - c Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **BBN MIDI**.
  - d Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
  - e Ανακινήστε στις **1.800** σ.α.λ. για **5** λεπτά.
  - f Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για **2** λεπτά.
  - g Αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.
- 2 Πλύνετε τα σφαιρίδια για **δεύτερη** φορά.
- 3 Αφαιρέστε το υπολειπόμενο υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο. Χρησιμοποιήστε πιπέτα **P20** με λεπτά ρύγχη.

### Έκλουση

- 1 Αφαιρέστε την πλάκα **BBN MIDI** από τη μαγνητική βάση.
- 2 Περιδινήστε το φρέσκο μείγμα έκλουσης **EE2+HP3** και κατόπιν φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 3 Προσθέστε **32 μl** διαλύματος **EE2 + HP3** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας **BBN MIDI**.
- 4 Απορρίψτε το υπόλοιπο μείγμα έκλουσης.
- 5 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **BBN MIDI**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 6 Ανακινήστε στις **1.800** σ.α.λ. για **2** λεπτά.
- 7 Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για **2** λεπτά.
- 8 Επιστημάνετε μια νέα πλάκα **PCR 96** βοθρίων **NL** (Κανονικοποιημένες βιβλιοθήκες).
- 9 Μεταφέρετε προσεκτικά **30 μl** εκλούσματος από κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας **BBN MIDI** στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας **NL PCR**.



### ΠΡΟΣΟΧΉ

Εάν αναρροφηθούν σφαιρίδια στα ρύγχη των πιπετών, επαναδιανείμετε τα σφαιρίδια στην πλάκα στη μαγνητική βάση και περιμένετε μέχρι να γίνει διαυγές το υγρό (~2 λεπτά) πριν μεταβείτε στο επόμενο βήμα της διαδικασίας.

- 10 Απορρίψτε την άδεια πλάκα **BBN MIDI**.
- 11 Περιδινήστε το **LNS1** για ανάμειξη.
- 12 Προσθέστε **30 μl LNS1** σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στη νέα πλάκα **PCR NL**.
- 13 Πιπετάρετε για ανάμειξη **5** φορές.
- 14 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα **PCR NL**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
- 15 Επιστρέψτε το **LNB1, LNA1, EE2, LNW1** και **LNS1** στον χώρο αποθήκευσης.

**ΑΣΦΑΛΕΣ ΣΗΜΕΙΟ ΔΙΑΚΟΠΗΣ**

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, φυγοκεντρήστε την πλάκα **PCR NL** στα **280 x g** για **1 λεπτό** και φυλάξτε την σε θερμοκρασία **-25 °C** έως **-15 °C** για έως και **30 ημέρες**.

Ημερομηνία και ώρα διακοπής \_\_\_\_\_

**Προετοιμασία για τα βήματα του πρωτοκόλλου**

Ξεκινήστε την προετοιμασία των αναλωσίμων αλληλούχισης από το κιτ αντιδραστηρίων **NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων)** (Κωδικός είδους **20028871**) τουλάχιστον **μία ώρα** πριν από τη χρήση.

- 1 Αφαιρέστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης βιβλιοθήκης (**HT1**) από τον χώρο αποθήκευσης στους **-25 °C** έως **-15 °C**, αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν τοποθετήστε το σε πάγο.
- 2 Ακολουθήστε τις οδηγίες προετοιμασίας στον *Οδηγό αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου **100000009513**) για άλλα αναλώσιμα στο κιτ.
  - ▶ **NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 κύκλων)**
  - ▶ **NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 κύκλων)**
  - ▶ **NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 κύκλων)**
- 3 Αφαιρέστε το σωληνάριο αντιδραστηρίου από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακας 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη) (Κωδικός είδους 20031121)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
PhiX Internal Control (PhiX)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Διατηρήστε σε πάγο.	Προετοιμασία για αλληλούχιση

Πίνακας 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη) (Κωδικός είδους 20031123)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
HP3	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Προετοιμασία για αλληλούχιση
RSB (ροζ ετικέτα)	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Προετοιμασία για αλληλούχιση

**Προετοιμασία για αλληλούχιση****Προετοιμασία**

Ημερομηνία και ώρα έναρξης \_\_\_\_\_

- 1 Διαβάστε τις οδηγίες για τον αριθμό βιβλιοθηκών και επιλέξτε ευρετήρια στο Ένθετο συσκευασίας **TruSight Oncology Comprehensive (EU)** (αρ. εγγράφου **200007789**).
- 2 Επιστημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης **dHP3** (αραιωμένο **HP3**).
- 3 Επιστημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης **dPhiX** (αραιωμένο **PhiX**).
- 4 Προθερμάνετε θερμαντική συσκευή στους **96 °C** για σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης.
- 5 Ετοιμάστε έναν κουβά πάγου.

**Αραίωση και μετουσίωση μάρτυρα PhiX**

- 1 Περιδινήστε το **HP3** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 2 Συνδυάστε τους παρακάτω όγκους στο σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης **dHP3**.
  - ▶ **10 μl HP3**
  - ▶ **190 μl** νερού χωρίς **RNase/DNase**
- 3 Περιδινήστε το **dHP3** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 4 Αναστρέψτε ή περιδινήστε το **RSB** για ανάμειξη.
- 5 Περιδινήστε τον μάρτυρα **PhiX** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

- 6 Συνδυάστε τους παρακάτω όγκους στο σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης **dPhiX**.
  - ▶ 8 μl **RSB**
  - ▶ 2 μl μάρτυρα **PhiX**
- 7 Προσθέστε 10 μl **dHP3** στο σωληνάριο **dPhiX**.
- 8 Απορρίψτε το σωληνάριο **dHP3**.
- 9 Περιδινήστε το **dPhiX** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 10 Επώαστε το **dPhiX** σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά για μετουσίωση.
- 11 Περιδινήστε το **HT1** για ανάμειξη.
- 12 Προσθέστε αμέσως 980 μl προψυγμένο **HT1** στο **dPhiX**.
- 13 Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 14 Τοποθετήστε το **dPhiX** σε πάγο μέχρι να χρησιμοποιηθεί στην προετοιμασία για τη δεύτερη αραίωση. Η τελική συγκέντρωση είναι 20 pM **dPhiX**.
- 15 Επιστρέψτε τα **PhiX**, **HP3** και **RSB** στον αποθηκευτικό χώρο.

### Ομαδοποίηση και αποδιάταξη βιβλιοθηκών

- 1 Εάν η πλάκα **PCR NL** αποθηκεύτηκε, αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε στα 280 x g για 1 λεπτό.
- 2 Χρησιμοποιώντας πιπέτα πολλαπλών καναλιών ρυθμισμένη στα 30 μl, αναμείξτε ήπια με πιπέτα τις βιβλιοθήκες στην πλάκα **PCR NL** 5 φορές. Χρησιμοποιήστε καινούργια ρύγχη για κάθε βιβλιοθήκη.



#### ΠΡΟΣΟΧΗ

Φροντίστε να αναμειγνύετε καλά τις βιβλιοθήκες για βέλτιστη απόδοση.

- 3 Επιλέξτε μία από τις παρακάτω επιλογές για να ομαδοποιήσετε, να αποδιατάξετε και να αραιώσετε τις βιβλιοθήκες.
  - ▶ **Επιλογή 1:** Αλληλούχηση βιβλιοθηκών που προέρχονται από δείγματα **RNA** και δείγματα **DNA** ταυτόχρονα. Βλ. *Επιλογή 1: Βιβλιοθήκες DNA και RNA μαζί στη σελίδα 32.*
  - ▶ **Επιλογή 2:** Αλληλούχηση βιβλιοθηκών που προέρχονται μόνο από δείγματα **DNA**. Βλ. *Επιλογή 2: Βιβλιοθήκες DNA μόνο στη σελίδα 33.*
  - ▶ **Επιλογή 3:** Αλληλούχηση βιβλιοθηκών που προέρχονται μόνο από δείγματα **RNA**. Βλ. *Επιλογή 3: Βιβλιοθήκες RNA μόνο στη σελίδα 34.*

### Επιλογή 1: Βιβλιοθήκες DNA και RNA μαζί

- 1 Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης με **PRL** (Ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες **RNA**).
- 2 Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης **PDL** με (Ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες **DNA**).
- 3 Μεταφέρετε 10 μl κάθε κανονικοποιημένης βιβλιοθήκης **RNA (cDNA)** από την πλάκα **NL** στο σωληνάριο **PRL**. Μην ομαδοποιείτε δύο βιβλιοθήκες με τον ίδιο εκκινητή ευρετηρίου.
- 4 Μεταφέρετε 10 μl κάθε κανονικοποιημένης βιβλιοθήκης **DNA** από την πλάκα **NL** στο σωληνάριο **PDL**. Μην ομαδοποιείτε δύο βιβλιοθήκες με τον ίδιο εκκινητή ευρετηρίου.
- 5 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα **PCR NL**. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία.
- 6 Περιδινήστε κάθε σωληνάριο **PRL** και **PDL** για ανάμειξη.
- 7 Φυγοκεντρήστε για λίγο τα σωληνάρια **PRL** και **PDL**.
- 8 Επώαστε τα σωληνάρια **PRL** και **PDL** σε θερμοκρασία συσκευής στους 96 °C για 2 λεπτά.
- 9 Τοποθετήστε το **PRL** και το **PDL** σε πάγο για 5 λεπτά.
- 10 Περιδινήστε τα σωληνάρια **PRL** και **PDL** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 11 Επιστρέψτε τα σωληνάρια **PRL** και **PDL** σε πάγο.

### Προετοιμασία πρώτης αραίωσης

- 1 Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης 1,7 ml **DIL1** (Αραίωση 1).



- 2 Μεταφέρετε 20 µl PDL στο κενό σωληνάριο DIL1.
- 3 Προσθέστε 5 µl PRL στο DIL1.
- 4 Απορρίψτε τα σωληνάκια PDL και PRL.
- 5 Προσθέστε 475 µl προψυγμένο HT1 στο σωληνάριο DIL1 (αραίωση 1:20).
- 6 Περιδινήστε το σωληνάριο DIL1 για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

#### Παρασκευή δεύτερης αραίωσης

- 1 Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης 2,0 mL DIL2 (Αραίωση 2).
- 2 Μεταφέρετε 40 µl DIL1 στο κενό σωληνάριο DIL2.
- 3 Απορρίψτε το σωληνάριο DIL1.
- 4 Προσθέστε 1.660 µl προψυγμένο HT1 στο σωληνάριο DIL2 (αραίωση 1:850).
- 5 Περιδινήστε το παρασκευασμένο 20 pM dPhiX για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 6 Προσθέστε 2,5 µl παρασκευασμένου 20 pM dPhiX στο σωληνάριο DIL2.
- 7 Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 8 Φορτώστε 1.300 µl DIL2 στην αποψυγμένη φύσιγγα NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 κύκλων)  
Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx (αρ. εγγράφου 100000009513).
- 9 Απορρίψτε το σωληνάριο DIL2.
- 10 Φυγοκεντρήστε την πλάκα NL PCR στα 280 x g για 1 λεπτό και φυλάξτε την σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 30 ημέρες.
- 11 Μεταβείτε στην αλληλούχιση.  
Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx (αρ. εγγράφου 100000009513).

#### Επιλογή 2: Βιβλιοθήκες DNA μόνο

- 1 Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης PDL με (Ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες DNA).
- 2 Μεταφέρετε 10 µl κάθε κανονικοποιημένης βιβλιοθήκης DNA από την πλάκα NL στο σωληνάριο PDL. Μην ομαδοποιείτε δύο βιβλιοθήκες με τον ίδιο εκκινητή ευρετηρίου.
- 3 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCR NL. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία.
- 4 Περιδινήστε το σωληνάριο PDL για ανάμειξη.
- 5 Φυγοκεντρήστε για λίγο το σωληνάριο PDL.
- 6 Επώαστε το σωληνάριο PDL σε θερμαντική συσκευή στους 96 °C για 2 λεπτά.
- 7 Τοποθετήστε το PDL σε πάγο για 5 λεπτά.
- 8 Περιδινήστε το σωληνάριο PDL για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 9 Επιστρέψτε το σωληνάριο PDL σε πάγο.

#### Προετοιμασία πρώτης αραίωσης

- 1 Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης 1,7 ml DIL1 (Αραίωση 1).
- 2 Μεταφέρετε 10 µl PDL στο κενό σωληνάριο DIL1.
- 3 Απορρίψτε το σωληνάριο PDL.
- 4 Προσθέστε 190 µl προψυγμένο HT1 στο σωληνάριο DIL1 (αραίωση 1:20).
- 5 Περιδινήστε το DIL1 για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

#### Παρασκευή δεύτερης αραίωσης

- 1 Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης 2,0 mL DIL2 (Αραίωση 2).
- 2 Μεταφέρετε 40 µl DIL1 στο κενό σωληνάριο DIL2.
- 3 Απορρίψτε το σωληνάριο DIL1.

- 4 Προσθέστε **1.660 µl** προψυγμένο **HT1** στο σωληνάριο **DIL2** (αραίωση **1:850**).
- 5 Περιδινήστε το παρασκευασμένο **20 pM dPhiX** και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 6 Προσθέστε **2,5 µl** παρασκευασμένου **20 pM dPhiX** στο σωληνάριο **DIL2**.
- 7 Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 8 Φορτώστε **1.300 µl DIL2** στην αποψυγμένη φύσιγγα αντιδραστηρίων **NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 κύκλων)**.  
Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx (αρ. εγγράφου 100000009513)*.
- 9 Απορρίψτε το σωληνάριο **DIL2**.
- 10 Φυγοκεντρήστε την πλάκα **NL PCR** στα **280 x g** για **1 λεπτό** και κατόπιν φυλάξτε την σε θερμοκρασία **-25 °C** έως **-15 °C** για έως **30** ημέρες.
- 11 Μεταβείτε στην αλληλούχιση.  
Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx (αρ. εγγράφου 100000009513)*.

### Επιλογή 3: Βιβλιοθήκες RNA μόνο

- 1 Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης με **PRL** (Ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες **RNA**).
- 2 Μεταφέρετε **10 µl** κάθε κανονικοποιημένης βιβλιοθήκης **RNA (cDNA)** από την πλάκα **NL** στο σωληνάριο **PRL**.  
Μην ομαδοποιείτε δύο βιβλιοθήκες με τον ίδιο εκκινητή ευρετηρίου.
- 3 Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα **PCR NL**.  
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία.
- 4 Περιδινήστε το σωληνάριο **PRL** για ανάμειξη.
- 5 Φυγοκεντρήστε για λίγο το σωληνάριο **PRL**.
- 6 Επιάστε το σωληνάριο **PRL** σε θερμαντική συσκευή στους **96 °C** για **2 λεπτά**.
- 7 Τοποθετήστε το **PRL** σε πάγο για **5 λεπτά**.
- 8 Περιδινήστε το σωληνάριο **PRL** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 9 Επιστρέψτε το σωληνάριο **PRL** σε πάγο.

### Προετοιμασία πρώτης αραίωσης

- 1 Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης **1,7 ml DIL1** (Αραίωση **1**).
- 2 Μεταφέρετε **10 µl PRL** στο κενό σωληνάριο **DIL1**.
- 3 Απορρίψτε το σωληνάριο **PRL**.
- 4 Προσθέστε **190 µl** προψυγμένο **HT1** στο σωληνάριο **DIL1** (αραίωση **1:20**).
- 5 Περιδινήστε το **DIL1** για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

### Παρασκευή δεύτερης αραίωσης

- 1 Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης **2,0 mL DIL2** (Αραίωση **2**).
- 2 Μεταφέρετε **40 µl DIL1** στο κενό σωληνάριο **DIL2**.
- 3 Απορρίψτε το σωληνάριο **DIL1**.
- 4 Προσθέστε **1.646 µl** προψυγμένο **HT1** στο σωληνάριο **DIL2** (αραίωση **1:843**).
- 5 Περιδινήστε το παρασκευασμένο **20 pM dPhiX** και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 6 Προσθέστε **16,7 µl** παρασκευασμένου **20 pM dPhiX** στο σωληνάριο **DIL2**.
- 7 Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- 8 Φορτώστε **1.300 µl DIL2** στην αποψυγμένη φύσιγγα αντιδραστηρίων **NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 κύκλων)**.  
Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx (αρ. εγγράφου 100000009513)*.
- 9 Απορρίψτε το σωληνάριο **DIL2**.
- 10 Φυγοκεντρήστε την πλάκα **NL PCR** στα **280 x g** για **1 λεπτό** και φυλάξτε την σε θερμοκρασία **-25 °C** έως **-15 °C** για έως **30** ημέρες.

- 11 Μεταβείτε στην αλληλούχηση.  
Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx (αρ. εγγράφου 100000009513)*.

## Διπλώματα ευρεσιτεχνίας και εμπορικά σήματα

Το παρόν έγγραφο και τα περιεχόμενά του αποτελούν ιδιοκτησία της **Illumina, Inc.** και των συνδεδεμένων εταιρειών της («**Illumina**») και προορίζονται αποκλειστικά για τη συμβατική χρήση του πελάτη της σε συνδυασμό με τη χρήση του(-ων) προϊόντος(-ων) που περιγράφονται στο παρόν έγγραφο και για κανέναν άλλον σκοπό. Απαγορεύεται η χρήση ή η διανομή του παρόντος εγγράφου και των περιεχομένων του για οποιονδήποτε άλλον σκοπό ή/και άλλη κοινοποίηση, αποκάλυψη ή αναπαραγωγή τους με οποιονδήποτε τρόπο χωρίς την πρότερη έγγραφη συναίνεση της **Illumina**. Η **Illumina** δεν μεταβιβάζει διά του παρόντος εγγράφου καμία άδεια δυνάμει διπλώματος ευρεσιτεχνίας, εμπορικού σήματος, πνευματικού δικαιώματος ή δικαιωμάτων κοινού δικαίου της.

Οι οδηγίες στο παρόν έγγραφο πρέπει να τηρούνται αυστηρά και με ακρίβεια από ειδικευμένο και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό, προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθή και ασφαλής χρήση του(-ων) προϊόντος(-ων) που περιγράφονται στο παρόν. Όλα τα περιεχόμενα του παρόντος εγγράφου πρέπει να αναγνωσθούν και να γίνουν πλήρως κατανοητά πριν από τη χρήση του(-ων) εν λόγω προϊόντος(-ων).

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΜΗ ΠΛΗΡΟΥΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΡΗΣΗΣ ΜΕ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΟΔΗΓΙΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ, ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΡΟΚΛΗΘΕΙ ΖΗΜΙΑ ΣΤΟ(-Α) ΠΡΟΪΟΝ(-ΤΑ), ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΧΡΗΣΤΩΝ Ή ΑΛΛΩΝ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗ ΥΛΙΚΗ ΖΗΜΙΑ, ΚΑΙ ΘΑ ΚΑΤΑΣΤΕΙ ΑΚΥΡΗ Η ΕΓΓΥΗΣΗ ΠΟΥ ΙΣΧΥΕΙ ΓΙΑ ΤΟ(-Α) ΠΡΟΪΟΝ(-ΤΑ).

Η **ILLUMINA** ΔΕΝ ΑΝΑΛΑΜΒΑΝΕΙ ΚΑΜΙΑ ΕΥΘΥΝΗ ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΕΕΙ ΑΠΟ ΕΣΦΑΛΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ(-ΩΝ) ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ(-ΩΝ) ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ [ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ(-ΟΥΣ) Ή ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ].

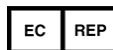
© 2022 **Illumina, Inc.** Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Όλα τα σήματα κατατεθέν είναι ιδιοκτησία της **Illumina, Inc.** ή των αντίστοιχων κατόχων τους. Για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τα σήματα κατατεθέντα, επισκεφτείτε την ηλ. διεύθυνση [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Στοιχεία επικοινωνίας



**Illumina**  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 Η.Π.Α.  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (εκτός Βορείου Αμερικής)  
[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)  
[www.illumina.com](http://www.illumina.com)



**Illumina Netherlands B.V.**  
Steenoven 19  
5626 DK Eindhoven  
Κάτω Χώρες

## Επίσημανση προϊόντος

Για μια πλήρη αναφορά στα σύμβολα που μπορεί να εμφανίζονται στη συσκευασία και την επίσημανση του προϊόντος, ανατρέξτε στο υπόμνημα συμβόλων για το κιτ σας στη διεύθυνση [support.illumina.com](http://support.illumina.com).