

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

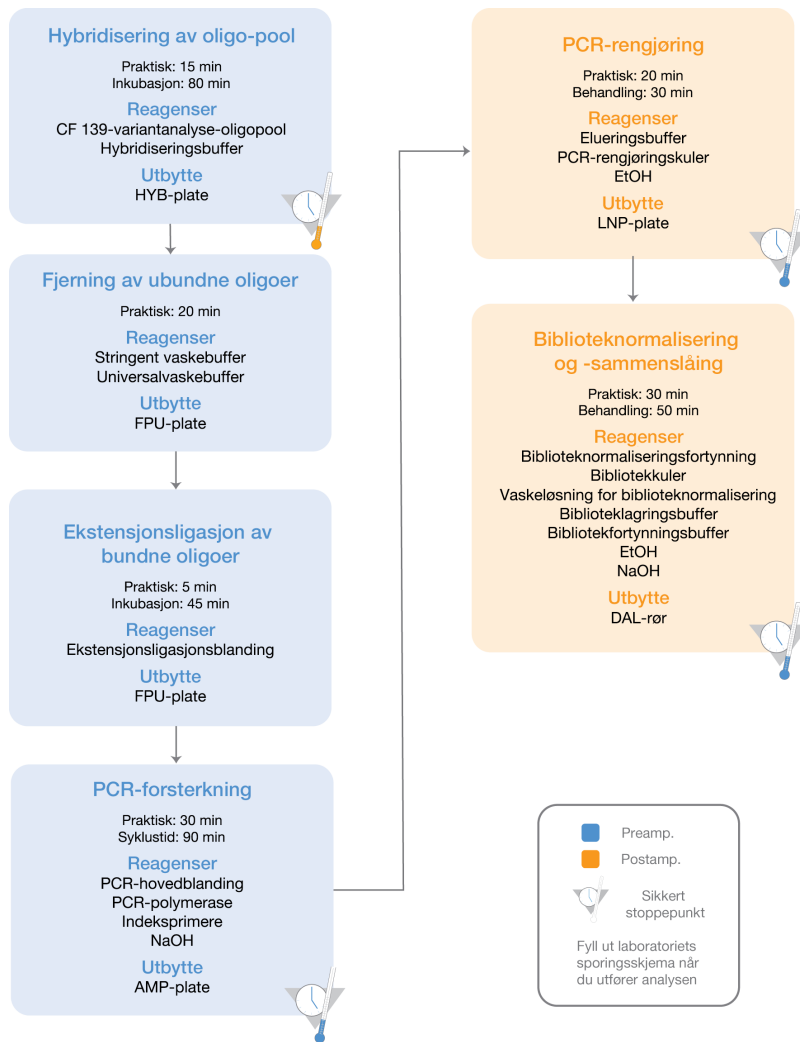
Springsskjema for laboratoriet

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

Dato: _____

Beskrivelse: _____

Partinr. for Illumina-sett: _____



MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

Forbruksmaterieill

Vare	Varenummer
CF 139-variantanalyse-oligopool	Partnr.: _____
Hybridiseringsbuffer	Partnr.: _____
Stringent vaskebuffer	Partnr.: _____
Universalvaskebuffer	Partnr.: _____
Filterplate	Partnr.: _____
Ekstensjonsligasjonsblanding	Partnr.: _____
PCR-hovedblanding	Partnr.: _____
PCR-polymerase	Partnr.: _____
0,05 N NaOH – dato klargjort: _____	10 N NaOH – partnr.: _____ Mal-fritt vann – partnr.: _____
Elueringsbuffer	Partnr.: _____
PCR-rengjøringskuler	Partnr.: _____
80 % etanol – dato klargjort: _____	100 % etanol – partnr.: _____ Mal-fritt vann – partnr.: _____
Biblioteknormaliseringsfortynning	Partnr.: _____
Bibliotekskuler	Partnr.: _____
Vaskeløsning for biblioteknormalisering	Partnr.: _____
Biblioteklagringsbuffer	Partnr.: _____
0,1 N NaOH – dato klargjort: _____	10 N NaOH – partnr.: _____ Mal-fritt vann – partnr.: _____
Bibliotekfortynningsbuffer	Partnr.: _____
10 nM PhiX-internkontroll	Partnr.: _____
TE-buffer	Partnr.: _____
MiSeqDx-reagenskasset – CF 139-variantanalyse	Partnr.: _____
MiSeqDx-strømningscelle – CF 139-variantanalyse	Partnr.: _____
MiSeqDx SBS-oppløsning (PR2) – CF 139-variantanalyse	Partnr.: _____

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

Indeksprimere	
Indeksprimer A (A501) Partnr.: _____	Indeksprimer 1 (A701) Partnr.: _____
Indeksprimer B (A502) Partnr.: _____	Indeksprimer 2 (A702) Partnr.: _____
Indeksprimer C (A503) Partnr.: _____	Indeksprimer 3 (A703) Partnr.: _____
Indeksprimer D (A504) Partnr.: _____	Indeksprimer 4 (A704) Partnr.: _____
Indeksprimer E (A505) Partnr.: _____	Indeksprimer 5 (A705) Partnr.: _____
Indeksprimer F (A506) Partnr.: _____	Indeksprimer 6 (A706) Partnr.: _____
Indeksprimer G (A507) Partnr.: _____	Indeksprimer 7 (A707) Partnr.: _____
Indeksprimer H (A508) Partnr.: _____	Indeksprimer 8 (A708) Partnr.: _____
	Indeksprimer 9 (A709) Partnr.: _____
	Indeksprimer 10 (A710) Partnr.: _____
	Indeksprimer 11 (A711) Partnr.: _____
	Indeksprimer 12 (A712) Partnr.: _____

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

Akronymer

Tabell 1 Akronymer for Illumina MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Akronym	Definisjon
AMP	AMplification Plate (Forsterkningsplate)
CLP	CLean-up Plate (Rengjøringsplate)
DAL	Diluted Amplicon Library (Fortynnet amplikonbibliotek)
FPU	Filter Plate Unit (Filterplateenhet)
HYB	HYBridization Plate (Hybridiseringsplate)
LNP	Library Normalization Plate (Biblioteknormaliseringsplate)
NTC	No Template Control (Ingen mal-kontroll)
PAL	Pooled Amplicon Library (Sammensatt amplikonbibliotek)
SGP	StoraGe Plate (Oppbevaringsplate)

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

Hybridisering av oligonukleotid-pool

I dette trinnet blir oligonukleotid-poolen for cystisk fibrose med oppstrøms og nedstrøms oligonukleotider som er spesifikke for cystisk fibrose transmembran konduktivitetsregulator-genet (CFTR) hybridisert til genomiske DNA-prøver.

Beregnet tid

- ▶ Total varighet: 1 time 35 minutter
- ▶ Aktivt: 15 minutter

Tilberedelse

- 1 La CF 139-variantanalyse-oligopool, hybridiseringsbuffer, genomiske DNA-prøver og positiv kontrollprøve nå romtemperatur.
- 2 Roter CF 139-variantanalyse-oligopool og hybridiseringsbuffer kraftig for å sikre at alt bunnfall er fullstendig oppløst, og deretter sentrifugeres rørene et øyeblikk for å samle væske.
- 3 Still inn en 96-brønners varmeblokk på 95 °C.
- 4 Forvarm en inkubator til 37 °C.
- 5 Sett opp prøveplaten i henhold til plategrafikkutskriften fra Illumina Worklist Manager eller Local Run Manager.
Prøvearknavn (IWM): _____ eller
Kjøringsnavn (Local Run Manager): _____

Prosedyre

- 1 Sett ut en ny 96-brønners PCR-plate (heretter kalt **HYB**-platen).
Plate-ID: _____
- 2 Tilsett 5 µl av prøven eller kontrollen til 50 ng/µl (250 ng totalt) i de aktuelle brønnene i **HYB**-platen. Følg det genererte plateoppsettet for riktig brønnvalg.
- 3 Tilsett 5 µl CF 139-variantanalyse-oligopool i alle prøvebrønner.
- 4 Tilsett 40 µl hybridiseringsbuffer i hver prøvebrønn i **HYB**-platen. Pipetter forsiktig opp og ned 3–5 ganger for å blande.
- 5 Forsegle **HYB**-platen, og sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 6 Legg **HYB**-platen på den forhåndsoppvarmede blokken ved 95 °C, og inkuber i 1 minutt.

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

- 7 Reduser varmeblokken til 40 °C, og fortsett å inkubere til varmeblokken når 40 °C (omtrent 80 minutter).

Gradvis avkjøling er avgjørende for riktig hybridisering. PCR-termosyklere med aktiv avkjøling (for eksempel Peltier, termoelektrisk avkjølt) anbefales derfor ikke for denne prosessen.

Starttid: _____

Stoptid: _____



SIKKERT STOPPEPUNKT

Når varmeblokken har nådd 40 °C, er **HYB**-platen stabil ved 40 °C i 2 timer.

Kommentarer

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

Fjerning av ubundne oligonukleotider

Denne prosessen fjerner ubundne oligonukleotider fra genomisk DNA med et filter som kan velge størrelse. To vasketrinn som bruker stringent vaskebuffer, sørger for komplett fjerning av ubundne oligonukleotider. Et tredje vasketrinn som bruker universalvaskebuffer, fjerner overflødig stringent vaskebuffer og klargjør prøver for ekstensjonsligasjonstrinnet.

Beregnet tid

- ▶ Total varighet: 20 minutter
- ▶ Aktivt: 20 minutter

Tilberedelse

- 1 La ekstensjonsligasjonsblanding, stringent vaskebuffer og universalvaskebuffer nå romtemperatur, og roter deretter kort.
- 2 Sett sammen filterplateenheten (heretter kalt **FPU**) i denne rekkefølgen fra topp til bunn: lokk, filterplate, adapterkrage og MIDI-plate.
Filterplate-ID: _____
- 3 Forvask filterplatemembranen slik:
 - a Tilsett 45 µl stringent vaskebuffer i hver brønn.
 - b Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.



MERK

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



FORSIKTIG

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

Prosedyre

- 1 Fjern **HYB**-platen fra varmeblokken og sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 2 Overfør hele volumet (omtrent 55 µl) for hver prøve til de tilsvarende brønnene på filterplaten.
- 3 Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.
- 4 Vask filterplaten slik:
 - a Tilsett 45 µl stringent vaskebuffer i hver prøvebrønn.
 - b Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.
- 5 Gjenta vaskingen som beskrevet i tidligere trinn.

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____



MERK

Hvis vaskebufferen ikke dreneres helt, sentrifuger på nytt ved $2400 \times g$ ved $20 \text{ }^\circ\text{C}$ til all væsken har gått gjennom (ytterligere 5–10 minutter).

- 6 Kasser alt som flyter gjennom (som inneholder formamid), og monter deretter **FPU** på nytt.
- 7 Tilsett $45 \mu\text{l}$ universalvaskebuffer i hver prøvebrønn.
- 8 Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved $2400 \times g$ ved $20 \text{ }^\circ\text{C}$ i 10 minutter.



MERK

Påse at all væske er drenert etter sentrifugering. Gjenta sentrifugeringen hvis dette er nødvendig.

Kommentarer

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

Ekstensjonsligasjon av bundne oligonukleotider

Denne prosessen forbinder de hybridiserte oppstrøms- og nedstrøms-oligonukleotidene. En DNA-polymerase strekker seg fra oppstrøms-oligonukleotiden gjennom målregionen, fulgt av ligering til 5'-enden på nedstrøms-oligonukleotiden med en DNA-ligase. Dette fører til dannelsen av produkter som inneholder de målrettede regionene av interesse, flankert av sekvensene som er påkrevd for forsterkning.

Beregnet tid

- ▶ Total varighet: 50 minutter
- ▶ Aktivt: 5 minutter

Prosedyre

- 1 Tilsett 45 µl ekstensjonsligasjonsblanding i hver prøvebrønn på filterplaten.
- 2 Forsegle filterplaten med klebende aluminiumsfolie og dekk deretter til med lokket.
- 3 Inkuber **FPU** i den forhåndsoppvarmede inkubatoren ved 37 °C i 45 minutter.
Starttid: _____ Stoptid: _____
- 4 Mens **FPU**-platen inkuberer, klargjøres AMP (forsterkningsplaten) som beskrevet i følgende avsnitt.

Kommentarer

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

PCR-forsterkning

I dette trinnet blir ekstensjonsligasjonsproduktene forsterket med primere som legger til indekssekvenser for prøvemultipleksing, i tillegg til vanlige adaptore som er påkrevd for klyngegenerering.

Beregnet tid

- ▶ Total varighet: ~90 minutter
- ▶ Aktivt: 30 minutter

Tilberedelse

- 1 Tilbered ny 0,05 N NaOH.
- 2 Bestem hvilke indeksprimere som skal brukes i henhold til plategrafikkutskriften fra Illumina Worklist Manager eller Local Run Manager.
- 3 La PCR-hovedblandingen og de aktuelle indeksprimene nå romtemperatur. Roter hvert tint rør for å blande og gjør deretter en rask sentrifugering av rørene.
- 4 Sett ut en ny 96-brønners PCR-plate (heretter kalt **AMP**-platen).
- 5 Tilsett indeksprimere i AMP-platen slik:
 - a Tilsett 4 µl av de valgte indeksprimene [A (A501) – H (A508)] til den aktuelle brønnen i en kolonne på **AMP**-platen.
 - b Kasser de opprinnelige hvite hettene og sett på nye hvite hetter.
 - c Tilsett 4 µl av de valgte indeksprimene [1 (A701) – 12 (A712)] til den aktuelle raden på **AMP**-platen. *Spissene skal byttes etter hver rad for å unngå indeks-krysskontaminasjon.*
 - d Kasser de opprinnelige oransje hettene, og sett på nye oransje hetter.
- 6 Klargjør PCR-hovedblandingen/PCR-polymerase PCR-arbeidsløsningen på følgende måte:
 - a Sentrifuger røret med PCR-polymerase kort før bruk for å fjerne luftbobler.
 - b For 96 prøver tilsettes 56 µl PCR-polymerase til 2,8 ml PCR-hovedblanding.
 - c Snu den tilberedte PCR-arbeidsopløsningen 20 ganger for å blande.
PCR-arbeidsopløsningen er stabil i romtemperatur i 10 minutter.

Prosedyre

- 1 Ta **FPU** ut av inkubatoren, og fjern deretter aluminiumsfolieforseglingen.
- 2 Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 2 minutter.
- 3 Tilsett 25 µl av 0,05 N NaOH i hver prøvebrønn på filterplaten. Pipetter NaOH opp og ned 5–6 ganger.
- 4 Dekk til og inkuber filterplaten ved romtemperatur i 5 minutter.
- 5 Mens filterplaten inkuberes, overføres 22 µl PCR-arbeidsopløsning i hver brønn på AMP-platen som inneholder indeksprimere.

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

- 6 Overfør prøver som er eluert fra filteret til AMP-platen slik:
 - a Pipetter prøvene i første kolonne på filterplaten opp og ned 5–6 ganger.
 - b Overfør 20 µl fra filterplaten til tilsvarende kolonne på **AMP**-platen.
 - c Pipetter forsiktig opp og ned 5–6 ganger for å grundig kombinere DNA med PCR-arbeidsoppløsningen.
 - d Overfør gjenværende kolonner fra filterplaten til AMP-platen på samme måte. *Spissene skal byttes etter hver kolonne for å unngå krysskontaminasjon av indeks og prøve.*
- 7 Forsegle **AMP**-platen, og fest den med en gummivalse.
- 8 Sentrifuger ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 9 Overfør **AMP**-platen til postforsterkningsområdet.
- 10 Utfør PCR med følgende program på en termosyklus:
 - 95 °C i 3 minutter
 - 25 sykluser på:
 - 95 °C i 30 sekunder
 - 62 °C i 30 sekunder
 - 72 °C i 60 sekunder
 - 72 °C i 5 minutter
 - Holdes på 10 °C

Starttid: _____

Stopptid: _____



SIKKERT STOPPEPUNKT

Hvis du ikke fortsetter umiddelbart til PCR-rengjøring, kan **AMP**-platen bli på termosyklere over natten eller oppbevares ved 2 °C til 8 °C i opptil 48 timer.

Kommentarer

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

PCR-rengjøring

Denne prosessen benytter PCR-rengjøringskuler for å rengjøre PCR-produktene fra andre reaksjonskomponenter.

Beregnet tid

- ▶ Total varighet: 50 minutter
- ▶ Aktivt: 20 minutter

Tilberedelse

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

Prosedyre

- 1 Sentrifuger AMP-platen ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 2 Sett ut en ny MIDI-plate (heretter kalt **CLP**-platen).
Plate-ID: _____
- 3 Snu PCR-rengjøringskulene 10 ganger. Roter kraftig og snu deretter ytterligere 10 ganger. Kontroller visuelt oppløsningen for å sikre at kulene er resuspendert.
- 4 Tilsett 45 µl PCR-rengjøringskuler i hver brønn i **CLP**-platen.
- 5 Overfør hele PCR-produktet fra AMP-platen til **CLP**-platen.
- 6 Forsegle **CLP**-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 7 Inkuberes i romtemperatur uten resting i 10 minutter.
- 8 Sett platen på et magnetstativ i minst 2 minutter eller til supernatanten er klar.
- 9 Mens **CLP**-platen står på magnetstativet, fjernes supernatanten forsiktig og kastes.
- 10 Mens **CLP**-platen står på magnetstativet, vaskes kulene slik:
 - a Tilsett 200 µl nytilberedt 80 % etanol i hver prøvebrønn.
 - b Inkuber platen på et magnetstativ i minst 30 sekunder eller til supernatanten er klar.
 - c Fjern supernatanten forsiktig, og kasser den.
- 11 Gjenta vaskingen som beskrevet i tidligere trinn.
- 12 Bruk en P20 flerkanalsdråpeteller satt på 20 µl til å fjerne overflødig etanol.
- 13 Ta **CLP**-platen ut av magnetstativet, og lufttørk kulene i 10 minutter.
Starttid: _____ Stoptid: _____
- 14 Tilsett 30 µl elueringsbuffer i hver prøve.
- 15 Forsegle **CLP**-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 2 minutter. Etter restingen må du kontrollere at prøvene ble resuspendert. Hvis ikke skal dette trinnet gjentas.
- 16 Inkuberes i romtemperatur i 2 minutter.

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

- 17 Sett **CLP**-platen på et magnetstativ i minst 2 minutter eller til supernatanten er klar.
- 18 Sett ut en ny MIDI-plate (heretter kalt **LNP**-platen).
Plate-ID: _____
- 19 Overfør 20 µl av supernatanten fra **CLP**-platen til **LNP**-platen.
- 20 [Valgfritt] Overfør gjenværende 10 µl av supernatanten fra **CLP**-platen til en ny plate, og merk platen med et kjøringsnavn og dato. Oppbevar denne platen ved $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ til sekvenseringskjøringen og dataanalysen er ferdig. De rengjorte PCR-produktene kan brukes til feilsøking hvis det oppstår prøvefeil.



SIKKERT STOPPEPUNKT

Hvis den stopper på dette punktet, forsegles **LNP**-platen og sentrifugeres ved $1000 \times g$ ved $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 1 minutt. Platen er stabil i opp til 3 timer ved $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kommentarer

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

Biblioteknormalisering og sammenslåing

Denne prosessen normaliserer mengden i hvert bibliotek for å sikre lik bibliotekrepresentasjon i den sammenslåtte prøven. Like volumer med normaliserte biblioteker kombineres og fortynnes deretter som klargjøring for sekvensering.



Beregnet tid

- ▶ Total varighet: 1 time 20 minutter
- ▶ Aktivt: 30 minutter

Tilberedelse

- 1 Tilbered ny 0,1 N NaOH ved å tilsette 30 µl av 10 N NaOH til 2970 µl RNase/DNase-fritt vann.
- 2 La biblioteknormaliseringsfortynning, bibliotekkuler, vaskeløsning for biblioteknormalisering og bibliotekfortynningsbuffer oppnå romtemperatur.
- 3 Roter biblioteknormaliseringsfortynning kraftig, og kontroller at alt bunnfall er oppløst.
- 4 Roter bibliotekkuler kraftig i 1 minutt med vekselvis vending til kulene er resuspendert og ingen pellet finnes på bunnen av røret når røret er vendt opp ned.

Prosedyre

- 1 Bland biblioteknormaliseringsfortynning og bibliotekkuler i et nytt 15 ml kjegleformet rør på følgende måte:
 -  **MERK**
Ved behandling av < 24 prøver bruker du et nytt 1,5 ml rør.
 - a For 96 prøver tilsettes 4,4 ml biblioteknormaliseringsfortynning.
 - b Pipetter bibliotekkuler opp og ned 10 ganger for å resuspendere.
 -  **MERK**
Det er ekstremt kritisk at bibliotekkullepelleter på bunnen av røret blir fullstendig resuspendert. Bruk av en P1000 sikrer at kulene er homogent resuspendert og at det ikke finnes kulemasse på bunnen av røret. Dette er avgjørende for å oppnå konsekvent klyngetetthet på strømningscellen.
 - c For 96 prøver pipetteres 800 µl bibliotekkuler i røret som inneholder biblioteknormaliseringsfortynning.
 - d Bland ved å snu røret 15–20 ganger.
- 2 Tilsett 45 µl av den kombinerte arbeidsoppløsningen av biblioteknormaliseringsfortynning/bibliotekkuler i hver brønn i LNP-platen som inneholder biblioteker.
- 3 Forsegle LNP-platen, og rist den på en mikroplaterystyr ved 1800 o/min i 30 minutter.

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____



MERK

Hvis sekvensering skal utføres samme dag, er det lurt å begynne å tine reagenskassetten nå. Følg instruksjonene for tining av MiSeqDx-reagenskassetten i avsnittet *Klargjøre reagenskassetten* på side 17.

Starttid: _____

Stopptid: _____

- 4 Sett platen på et magnetstativ i minst 2 minutter eller til supernatanten er klar.
- 5 Mens LNP-platen står på magnetstativet, fjernes supernatanten forsiktig og kastes.
- 6 Fjern LNP-platen fra magnetstativet, og vask kulene med vaskeløsning for biblioteknormalisering på følgende måte:
 - a Tilsett 45 µl vaskeløsning for biblioteknormalisering i hver prøvebrønn.
 - b Forsegle LNP-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 5 minutter.
 - c Sett platen på magnetstativet i minst 2 minutter eller til supernatanten er klar.
 - d Fjern supernatanten forsiktig, og kasser den.
- 7 Gjenta prosedyren for vaskeløsning for biblioteknormalisering som beskrevet i tidligere trinn.
- 8 Bruk en P20 flerkanalsdråpetellers satt til 20 µl til å fjerne overflødig vaskeløsning for biblioteknormalisering.
- 9 Fjern LNP-platen fra magnetstativet, og tilsett 30 µl 0,1 N NaOH i hver brønn.
- 10 Forsegle LNP-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 5 minutter.
- 11 I løpet av elueringen på 5 minutter settes en ny 96-brønners PCR-plate ut (heretter kalt SGP-platen).
Plate-ID: _____
- 12 Tilsett 30 µl biblioteklagringsbuffer i hver brønn som skal brukes i SGP-platen.
- 13 Etter elueringen på 5 minutter, påse at alle prøvene på LNP-platen er fullstendig resuspendert. Hvis prøvene ikke er fullstendig resuspendert, pipetteres disse prøvene forsiktig opp og ned, eller bank platen forsiktig mot benken for å resuspendere kulene og rist deretter i ytterligere 5 minutter.
- 14 Sett LNP-platen på magnetstativet i minst 2 minutter.
- 15 Overfør supernatanten fra LNP-platen til SGP-platen. Pipetter forsiktig opp og ned 5 ganger for å blande.
- 16 Forsegle SGP-platen, og sentrifuger deretter ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 17 Roter bibliotekfortynningsbufferen, og kontroller at alt bunnfall er fullstendig oppløst.
- 18 Sentrifuger et øyeblikk for å samle innhold.
- 19 Sett ut et nytt Eppendorf-rør (heretter kalt PAL-røret [Pooled Amplicon Library (Sammensatt ampliconbibliotek)]).
- 20 Bestem hvilke prøver som skal grupperes for sekvensering. Maksimum 48 prøver kan grupperes for sekvensering.
- 21 Overfør 5 µl av hvert bibliotek som skal sekvenseres fra SGP-platen, kolonne etter kolonne, til en strimmel med åtte PCR-rør.
- 22 Kombiner og overfør innholdet i strimmelen med åtte PCR-rør til PAL-røret. Bland PAL-røret grundig.

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____

- 23 Sett ut 2–3 nye Eppendorf-rør (heretter kalt **DAL**-røret [Diluted Amplicon Library (Fortynnet amplikonbibliotek)]).
- 24 Tilsett 585 µl bibliotekfortynningsbuffer i **DAL**-rørene.
- 25 Overfør 9 µl **PAL** til hvert **DAL**-rør som inneholder bibliotekfortynningsbuffer. Pipetter opp og ned 3–5 ganger for å skylle spissen og for å sikre at overføringen er fullstendig.



SIKKERT STOPPUNKT

Hvis sekvensering på MiSeqDx ikke skal utføres umiddelbart, kan **DAL**-rørene oppbevares ved –25 °C til –15 °C i opptil 14 dager.

Kommentarer

Biblioteksekvensering

Som klargjøring for klyngegenerering og sekvensering, blir det fortynnede biblioteket varmedenaturert før sekvensering på MiSeqDx. PhiX brukes som intern kontroll for sekvensering.

Strømningscellen vaskes, tørkes og lastes inn i MiSeqDx, prøvene lastes inn i reagenskassetten, reagenskassetten lastes inn i MiSeqDx, og sekvenskjøringen startes. MiSeqDx utfører klyngegenerering, sekvensering ved syntese og dataanalyse.

Beregnet tid

- ▶ Total varighet: ~28 timer
- ▶ Aktivt: ~15 minutter



Klargjøre for biblioteksekvensering

- 1 Still inn en varmeblokk som rommer 1,5 ml sentrifugerør, på 96 °C.
- 2 Tilbered et isbad i en isbøtte. Avkjøl bibliotekfortynningsbufferen i isvannet.
- 3 Begynn å tine MiSeqDx-reagenskassetten.




Klargjøre reagenskassetten

- 1 Tin MiSeqDx-reagenskassetten – CF139-variantanalyse i et vannbad som inneholder tilstrekkelig vann av laboratorie kvalitet til å senke bunnen av reagenskassetten til vannlinjen angitt på reagenskassetten. Ikke la vannet komme høyere enn maksimum vannlinje.
- 2 La reagenskassetten tine i vannbadet med romtemperatur i omtrent 1 time eller til den er opptint.
- 3 Ta kassetten opp av vannbadet, og bank den forsiktig på benken for å fjerne vann fra bunndelen av kassetten. Tørk av bunndelen av kassetten. Påse at det ikke har kommet vann på den øvre delen av reagenskassetten.

Kontrollere reagenskassetten

- 1 Snu reagenskassetten ti ganger for å blande de tinte reagensene, og se til at alle posisjonene er tint.
 **MERK**
Det er avgjørende at reagensene i kassetten er grundig tint og blandet, for å sikre tilfredsstillende sekvensering.
- 2 Kontroller reagensene i posisjon 1, 2 og 4 for å påse at de er fullt blandet og fri for bunnfall.
- 3 Bank kassetten forsiktig mot benken for å redusere luftbobler i reagensene.
 **MERK**
MiSeqDx-sugerørene går til bunnen på hvert reservoar for å aspirere reagensene, så det er viktig at reservoarene er fri for luftbobler.
- 4 Sett reagenskassetten på is, eller sett den til side ved 2 °C til 8 °C (opp til 6 timer) til det er klart til å sette opp kjøringen. For å få de beste resultatene fortsetter du direkte til innlasting av prøven og oppsetting av kjøringen.

Denaturere og fortynne PhiX-internkontroll

- 1 Klargjør 0,1 N NaOH ved å kombinere følgende volumer i et kjegleformet rør:
 - DNase/RNase-fritt vann (2475 µl)
 - Stamløsning 10 N NaOH (25 µl)
- 2 Snu røret flere ganger for å blande.
 -  **FORSIKTIG**
Det er avgjørende å bruke nyfortynnet NaOH slik at prøver blir fullstendig denaturert for klyngegenerering på MiSeqDx.
 -  **MERK**
Hvis PhiX klargjøres samme dag som biblioteknormalisering, kan samme stamløsning av 0,1 N NaOH brukes.
- 3 Kombiner følgende volumer for å fortynne PhiX-internkontrollbibliotek til 2 nM:
 - 10 nM PhiX-internkontrollbibliotek (2 µl)
 - 1X TE-buffer (8 µl)
- 4 Kombiner følgende volumer for å få et PhiX-internkontrollbibliotek på 1 nM:
 - 2 nM PhiX-internkontrollbibliotek (10 µl)
 - 0,1 N NaOH (10 µl)
- 5 Roter et øyeblikk slik at PhiX-internkontrollbiblioteksløsningen på 1 nM blandes.
- 6 Sentrifuger PhiX-internkontrollen på 1 nM ved 280 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 7 Inkuber i 5 minutter ved romtemperatur for å denaturere PhiX-internkontrollbiblioteksløsningen til enkle strenger.
- 8 Kombiner følgende volumer i et nytt mikrosentrifugerør for å få et PhiX-internkontrollbibliotek på 20 pM:
 - Denaturert PhiX-internkontrollbibliotek (2 µl)
 - Forhåndskjølt bibliotekfortynningsbuffer (98 µl)
 -  **MERK**
Det denaturerte PhiX-internkontrollbiblioteket på 20 pM kan oppbevares i opptil 3 uker ved -25 °C til -15 °C som alikvoter for engangsbruk.

Klargjøre prøver for sekvensering

- 1 Fortsett med ett **DAL**-rør til sekvensering.
- 2 Hvis **DAL**-røret ble lagret i frosset tilstand, skal det tines helt og blandes ved å pipettere innholdet opp og ned.
- 3 Tilsett 6 µl av 20 pM PhiX-internkontroll i **DAL**-røret.
- 4 Pipetter opp og ned 3–5 ganger for å skylle spissen og sikre at overføringen er fullstendig.
- 5 Bland **DAL**-røret ved å rotere røret ved topphastighet.
- 6 Sentrifuger **DAL**-røret ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt.
- 7 Inkuber **DAL**-røret på en varmeblokk ved 96 °C i 2 minutter.
- 8 Etter inkubasjonen inverteres **DAL**-røret 1–2 ganger for blanding før det settes umiddelbart i isvann.
- 9 La **DAL**-røret stå i isvann i 5 minutter.



MERK

Utfør varmedenatureringstrinnet umiddelbart før innlasting av DAL-røret i MiSeqDx-reagenskassetten for å sikre effektiv malinnsetting på MiSeqDx-strømningscellen.

Laste prøver for sekvensering

Du finner detaljer om trinnene som er beskrevet her, i *Referanseveiledning for MiSeqDx-instrumentet* (dokumentnr. 15038353).

- 1 Bruk en separat, ren og tom 1 ml dråpetellerspiss til å gjennomhulle folieforseglingen over reservoaret på MiSeqDx-reagenskassetten – CF 139-variantanalyse merket **Load Samples** (Last inn prøver).
- 2 Pipetter 600 µl av DAL-prøvebibliotekene til beholderen merket **Load Samples** (Last inn prøver). Vær forsiktig slik at du unngår å berøre folieforseglingen mens prøven dispenseres. Sjekk for luftbobler i reservoaret etter at prøven er lastet inn. Hvis luftbobler er tilstede, banker du kassetten forsiktig mot benken for å frigjøre boblene.
- 3 Logg deg på MiSeq Operating Software (MOS).
MiSeqDx-serienummer: _____
Dato for siste forebyggende vedlikehold: _____
- 4 Velg **Sequence** (Sekvens).
Flere kjøringsoppsett-skjermbilder åpnes.
- 5 Rengjør strømningscellen.
- 6 Last inn strømningscellen.
- 7 Tøm avfallsflasken, og sett inn MiSeqDx SBS-oppløsning (PR2) – CF 139-variantanalyseflasken.
- 8 Last inn reagenskassetten.
- 9 Bekreft kjøringsinnstillingene og resultatene fra før kjøring-kontrollen.
- 10 Start kjøringen.
Kjørings-ID: _____
- 11 Utfør en etter kjøring-vask.

Kommentarer

MiSeqDx cystisk fibrose 139-variantanalyse

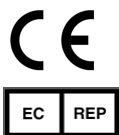
Springsskjema for laboratoriet

Dato/klokkeslett: _____

Operatør: _____



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California, 92122 USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (utenfor Nord-
Amerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Cambridge Limited
Chesterford Research Park,
Little Chesterford
Saffron Walden, CB10 1XL
STORBRITANNIA



Australsk sponsor:
Illumina Australia
1 International Court
Scoresby, Victoria, 3179
Australia