

# TruSeq™ Custom Amplicon Kit Dx

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

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

## Tiltenkt bruk

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

## Prosedyreprinsipper

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

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

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

### Bibliotekklargjøring

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

## Prosedyremessige begrensninger

- 1 Til *in vitro*-diagnostisk bruk.
- 2 Indel-innhold (innsettinger, slettinger og kombinasjoner av disse) med større lengde enn 25 bp innrettes ikke av analyseprogrammet. Derfor kan indeler med en lengde på mer enn 25 bp ikke detekteres av analyseprogrammet.

- 3 Systemet er validert for deteksjon av enkle nukleotidvarianter (SNV) og opptil 25 bp slettinger og 24 bp innsetninger når det brukes med moduler for kimlinje og somatisk variant. For somatisk betegnelse ved en variantfrekvens på 0,05 ble 25 bp slettinger og 18 bp innsetninger testet.
- 4 PCR-produktavlesninger med ekstremt variantinnhold kan kanskje ikke innrettes av analyseprogrammet, noe som resulterer i at området blir rapportert som villtype. Slikt ekstremt innhold omfatter:
  - Avlesninger som inneholder mer enn tre indeler
  - Avlesninger med lengde på minst 30 bp med SNV-innhold på mer enn 4 % av den totale PCR-produktmålengden (unntatt probeområder)
  - Avlesninger med lengde på mindre enn 30 bp med SNV-innhold på mer enn 10 % av den totale PCR-produktlengden (inkludert probeområder)
- 5 Store varianter (deriblant multi-nukleotidvarianter, store innsetninger, slettinger eller kombinasjoner av disse) kan rapporteres som separate mindre varianter i utdata-VCF.
- 6 Slettingsvarianter kan filtreres eller utelates når de spenner over to sidestilte PCR-produkter, dersom slettelengden er større enn eller lik overlappingen mellom de sidestilte PCR-produktene.
- 7 Systemet kan ikke oppdage innsetninger og slettinger hvis de oppstår rett ved siden av en primer og det ikke er noe overlappende PCR-produkt. For regioner med overlappende PCR-produkter kan ikke analysen oppdage slettinger når overlappingsområdet er mindre enn størrelsen på slettingen som skal detekteres. Hvis for eksempel overlappingsområdet mellom to tilstøtende PCR-produkter er to (2) baser, kan analysen ikke oppdage noen slettinger som inkluderer begge disse basene. En enkelt basesletting på én av disse basene kan detekteres.
- 8 Som ved alle hybridiseringsbaserte arbeidsprosesser for bibliotekklargjøring kan underliggende polymorfismer eller mutasjoner, innsetninger eller slettinger i oligonukleotidbindende områder påvirke allelene som sonderes, og derfor også betegnelse som utføres. Eksempel:
  - En variant i fase med en variant i primerregionen kan ikke forsterkes, noe som resulterer i en falsk negativ.
  - Varianter i primerområdet kan forhindre forsterkningen av referanseallelen, noe som resulterer i feil homozygot variantbetegnelse.
  - Indelvarianter i primerregionen kan forårsake en falsk positiv betegnelse på slutten av avlesningen ved siden av primeren.
- 9 Indeler kan filtreres på grunn av strengeavvik hvis de forekommer nær enden av en avlesning og klipses under innretting.
- 10 Små MNV-er har ikke blitt validert.
- 11 Kopinummervarianter eller strukturvarianter, for eksempel fusjoner eller translokasjoner, er ikke validert.
- 12 Kimlinjespesifikke begrensninger:
  - Kimlinjevariantmodulen er utviklet for å levere kvalitative resultater for kimlinjevariantbetegnelser (f.eks. homozygot, heterozygot, villtype).
  - Ved bruk med Germline-variantmodulen er den minimale dekningen per PCR-produkt som er nødvendig for nøyaktig variantbetegnelse, 150x. Antallet prøver og det totale antallet baser som er målrettet, påvirker dekningen. GC-innhold og annet genomisk innhold kan påvirke dekning.
  - Variasjon i kopinummer kan påvirke om en variant identifiseres som homozygot eller heterozygot.
  - Varianter i en viss repetitiv kontekst filtreres ut i VCF-filene. RMxN-gjentakelsesfilteret brukes til å filtrere varianter dersom hele eller deler av variantsekvensen er til stede gjentatte ganger i referansegenomet ved siden av variantposisjonen. For kimlinjevariantbetegnelse er det nødvendig med minst ni repetisjoner i referansen for at en variant skal filtreres, og bare gjentakelser med lengde på opptil 5 bp vurderes (R5x9).
- 13 Somatisk spesifikke begrensninger
  - Somatisk variant-modul er designet for å levere kvalitative resultater for somatisk variantbetegnelse (f.eks. tilstedeværelse av en somatisk variant med en variantfrekvens som er større enn eller lik 0,026 med en deteksjonsgrense på 0,05).
  - Ved bruk med den somatiske variantmodulen er den minimale dekningen per PCR-produkt som er nødvendig for nøyaktig variantbetegnelse, 450x per oligonukleotidsammenslåing. Antallet prøver og det totale antallet baser som er målrettet, påvirker dekningen. GC-innhold og annet genomisk innhold kan påvirke dekning.

- Varianter i en viss repetitiv kontekst filtreres ut i VCF-filene. R<sub>M</sub>xN-gjentakelsesfilteret brukes til å filtrere varianter dersom hele eller deler av variantsekvensen er til stede gjentatte ganger i referansegnetomet ved siden av variantposisjonen. For somatisk variantbetegnelse er det nødvendig med minst seks repetisjoner i referansen for at varianten skal filtreres, og bare gjentakelser med lengde på opptil 3 bp vurderes (R<sub>3</sub>x6).
- Den somatiske variantmodulen kan ikke skille mellom kimlinjevarianter og somatiske varianter. Modulen er konstruert for å detektere varianter over en rekke variantfrekvenser, men variantfrekvens kan ikke brukes til å skille mellom somatiske varianter og kimlinjevarianter.
- Normalt vev i prøven påvirker deteksjonen av varianter. Den rapporterte deteksjonsgrensen er basert på en variantfrekvens relativ til det totale DNA-et som ekstraheres fra både tumor og normalt vev.

## Produktkomponenter

Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx består av:

- TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (katalognr. 20005718)

## Reagenser

Reagenser som følger med

Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx er konfigurert til å behandle 96 biblioteker (96 prøver for kimlinje-arbeidsprosess og 48 prøver for somatisk arbeidsprosess [to biblioteker kreves per prøve]) i enkeltbruk. Settet vil også støtte fire bibliotekklargjøringer med 24 biblioteker per bruk for kimlinje-arbeidsprosess og 20 biblioteker per bruk for somatisk arbeidsprosess.

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

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, boks 1

Tabell 1 Boks 1A Preforsterkningsreagenser

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

Tabell 2 Boks 1B Postforsterkningsreagenser

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

## TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, boks 2

Tabell 3 Preforsterkningsreagenser

Komponent	Kvantitet	Fyllingsvolum	Innhold	Oppbevaring
Filterplate	4 plater	N/A	Mikrotiterplate av polypropylen med en modifisert polyetersulfon-membran	15 °C til 30 °C

Tabell 4 Postforsterkningsreagenser

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



## MERK

Boks 2 inneholder reagenser til preforsterkning og postforsterkning i en enkelt boks.

## TruSeq Custom Amplicon Kit Dx, boks 3

Tabell 5 Boks 3A Preforsterkningsreagenser

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

Tabell 6 Boks 3B Postforsterkningsreagenser

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

## Reagenser som er påkrevd, men som ikke følger med

## Tilpasset oligonukleotidsammenslåing

Analyttspesifikke oligonukleotider skal utvikles av brukeren og er ikke inkludert i bibliotekklargjøringssettet. [Figur 1](#) illustrerer det egendefinerte oligo-designprinsippet. Oligo-designen bør tilfredsstillende følgende krav:

- Når det gjelder kimbanearbeidsprosessen bør et par egendefinerte oligonukleotider bli utformet for hvert PCR-produkt: én tilpasset probe 1 (oppstrøms lokusspesifikt oligonukleotid [ULSO]) og én tilpasset probe 2 (nedstrøms lokusspesifikt oligonukleotid [DLSO]).
- For somatisk arbeidsprosess bør to par tilpassede oligonukleotider utformes for hvert PCR-produkt. Hvert par består av én tilpasset probe 1 (oppstrøms lokusspesifikt oligonukleotid [ULSO]) og én tilpasset probe 2 (nedstrøms lokusspesifikt oligonukleotid [DLSO]). Det ene paret bør bruke plusstrengen som mål, det andre paret bør bruke minusstrengen som mål.
- Tilpassede oligonukleotider bør omslutte interesseområdet. Interesseområdet kan være mellom 150 og 250 bp for å gjøre det mulig med fullstendig sekvensering av fragmentet med en sekvenseringskjøring på 2 x 150-sykluser.
- Begge oligonukleotidene bør hybridiseres til den samme DNA-tråden.

- Tilpassede oligonukleotider bør inneholde Illumina-spesifikke adaptore for å gjøre det mulig å legge til indekser og sekvenseringsadaptore ved PCR.
  - Adapter 1 (5'-CAACGATCGTCGAAATTCGC-3') skal være plassert på 5'-enden av tilpasset probe 1 (ULSO).
  - Adapter 2 (5'-AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA-3') skal være plassert på 3'-enden av tilpasset probe 2 (DLSO).
- Tilpasset probe 2 (DLSO) er fosforylert ved 5'-enden for å støtte ligasjonstrinnet etter ekstensjon med tilpasset probe 1 (ULSO).

Figur 1 Oligo-design for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx



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

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

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

#### Preforsterkningsreagenser

- 10 N NaOH (tilbered fra tabletter eller bruk en standardoppløsning)
- TE-buffere
- RNase/DNase-fritt vann

#### Postforsterkningsreagenser

- 10 N NaOH (tilbered fra tabletter eller bruk en standardoppløsning)
- Etanol, 200 proof for molekylær biologi
- TE-buffere

- RNase/DNase-fritt vann

## Oppbevaring og håndtering

- 1 Romtemperatur defineres som 15 °C til 30 °C.
- 2 Følgende reagenser blir sendt i frossen tilstand og er stabile når de lagres ved -25 °C til -15 °C inntil den angitte utløpsdatoen.
  - Hybridiseringsbuffer
  - Ekstensjonsligasjonsblanding
  - Indeksprimere A (A501) – H (A508)
  - Indeksprimere 1 (A701) – 12 (A712)
  - PCR-polymerase
  - PCR-hovedblanding
  - Biblioteknormaliseringsfortynning
  - Bibliotekfortynningsbuffer
  - PhiX-internkontrollReagensene er stabile i maksimalt seks fryse/tine-sykluser som utføres før den angitte utløpsdatoen.
- 3 Følgende reagenser blir sendt nedkjølt og er stabile når de lagres ved 2 °C til 8 °C inntil den angitte utløpsdatoen.
  - Stringent vaskebuffer
  - Universalvaskebuffer
  - PCR-rengjøringskuler
  - Bibliotekkulur
  - Vaskeløsning for biblioteknormalisering
- 4 Følgende reagenser blir sendt i omgivelsestemperatur og er stabile når de lagres ved romtemperatur inntil den angitte utløpsdatoen:
  - Elueringsbuffer
  - Filterplate
  - Biblioteklagringsbuffer
- 5 Endringer i de leverte reagensenes fysiske utseende kan indikere nedbryting av materialene. Hvis det forekommer endringer i det fysiske utseendet (for eksempel åpenbare endringer i reagensfarge eller uklarhet sammen med mikrobiell kontaminasjon), skal ikke reagensene brukes.
- 6 Hybridiseringsbuffer-, stringent vaskebuffer- og biblioteknormaliseringsfortynningsreagenser kan danne synlig bunnfall eller krystaller. Før de brukes, skal de roteres kraftig og deretter kontrolleres visuelt for å påse at det ikke er bunnfall til stede.
- 7 Følg denne beste praksisen når du håndterer PCR-rengjøringskuler og bibliotekkulur:
  - Kulene skal aldri fryses.
  - La kulene få romtemperatur.
  - Umiddelbart før bruk skal kulene roteres til de er godt suspendert og fargen er homogen.
  - Bland prøven grundig etter at kulene er tilsatt ved å pipettere opp og ned ti ganger. En ryster kan brukes til grundig blanding av prøver.
  - Inkuber kule/prøve-blandingen i romtemperatur i hele den angitte tiden.
  - Følg instruksjonene når du bruker magnetstativet. Vent til oppløsningen er klar før du aspirerer. La platen ligge på magnetstativet mens supernatanten aspireres langsomt, og vær nøye med å ikke bevege de atskilte kulene.
- 8 PCR-forsterkningsplaten kan forbli på termosykleren over natten, eller den kan oppbevares ved angitte betingelser. Forsegl platen godt før oppbevaring.
  - 2 °C til 8 °C i opptil to dager
  - -25 °C til -15 °C i opptil én uke

- 9 Ikke frys bibliotekkulene, og ikke bland dem med biblioteknormaliseringsfortynningsreagenset hvis de ikke skal brukes umiddelbart.
- 10 Den ferdige biblioteknormaliseringsplaten (LNP) kan oppbevares ved 2 °C til 8 °C i opptil tre timer, eller ved -25 °C til -15 °C i opptil én uke.
- 11 Oppbevaringsplaten (SGP) kan oppbevares ved -25 °C til -15 °C i opptil 48 timer.
- 12 Det fortynnede PCR-produktbiblioteket (DAL) kan oppbevares ved -25 °C til -15 °C i opptil 84 dager.
- 13 Last fortynnet sammensatt PCR-produkt på reagenskassetten umiddelbart etter denaturering.

## Utstyr og materiell

### Utstyr og materialer som følger med, selges separat

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

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

#### Utstyr og materialer til preforsterkning

- 1 **Varmebløkk** – Én varmebløkk for 96-brønners plate er påkrevd. Varmebløkken skal oppfylle følgende spesifikasjoner.
  - Oppvarmet lokk
  - Temperaturområde: Omgivelse +5 °C til 99 °C
  - Temperaturregulering: ± 0,1 °C ved 37 °C, ± 0,4 °C ved 60 °C
- 2 **Prøveinkubator** – Én inkubator (hybridiseringsovn) er påkrevd. Inkubatoren skal oppfylle følgende spesifikasjoner.
  - Temperaturområde: 10 °C til 100 °C
  - Temperaturregulering: ± 0,2 °C
- 3 **Bordsentrifuge** – Én bordsentrifuge (en separat sentrifuge kreves i preforsterkningsområdet i laboratoriet). Sentrifugen skal oppfylle følgende spesifikasjoner.
  - Kan opprettholde 20 °C
  - Passer til en plate med 96 brønner og filterenhet
  - Godtar 5 ml rør
  - Oppnår hastigheter på 280 til 2400 x g
- 4 **Varmeforseglende enhet** – Anbefales til hybridiseringer over natten for å forhindre fordampning ved 40 °C inkubasjon.
- 5 **Presisjonsdråpetellere** – Ett sett med presisjonsdråpetellere er påkrevd. (Et separat sett er påkrevd i labområdet for postforsterkning.) Bruk av presisjonsdråpetellere sikrer nøyaktig reagens- og prøvetilførsel. Dråpetellere med enkel kanal eller flere kanaler kan brukes hvis de blir kalibrert regelmessig og er nøyaktige innen 5 % av oppgitt volum.
- 6 **Forbruksmateriell** – Følgende forbruksmateriell er påkrevd.
  - 96-brønners PCR-plater med kant, 0,2 ml, polypropylen eller tilsvarende
  - 96-brønners oppbevaringsplater, 0,8 ml (MIDI-plater)
  - Oppløsningsbeholder, PVC, DNase, RNase-fri (kar)
  - Klebende aluminiumsfolieforsegling (tåler et temperaturområde på inkl. 95 °C) eller tetninger som er compatible med en varmforselende enhet
  - Forsegling kompatibel med PCR-termosykler
  - Aerosolmotstandige dråpetellerspisser

## Utstyr og materialer til postforsterkning

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



### MERK

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

- 2–4 % TBE-agarosegel
- 100 bp DNA-molekylvektmarkør
- Fargestoff for DNA-lasting
- Kjegleformede rør, 15 ml
- Eppendorf-mikrosentrifugerør (skrukork anbefales)
- Åtterørs PCR-strimler
- Opp­løsningsbeholdere, PVC, DNase, RNase-frie (kar)
- Klebende aluminiumsfolieforseglinger
- Microseal® 'B' (Bio-Rad) eller tilsvarende
- Aerosol­motstandige dråpetellerspisser

## Prøvetaking, transport og oppbevaring

### Kimbanearbeidsprosess

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



**FORSIKTIG**

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

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

**MERK**

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

**DNA-ekstraksjon (kimbanearbeidsprosess)**

Hvilken som helst validert DNA-ekstraksjonsmetode kan brukes.

**Somatisk arbeidsprosess**

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

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

**MERK**

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

**DNA-ekstraksjon (somatisk arbeidsprosess)**

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

**Advarsler og forholdsregler****FORSIKTIG**

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

**ADVARSEL**

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

- 1 Alle blodprøver skal håndteres som om det finnes en smittefare med humant immunsviktvirus (HIV), humant hepatitt B-virus (HBV) og andre blodbårne patogener (universale forholdsregler).
- 2 Hvis du unnlater å følge prosedyrene som beskrevet, kan det resultere i feil resultater eller betydelig reduksjon i prøve kvaliteten.
- 3 Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i tilordnede arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakker når du håndterer prøver og settreagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og settreagensene.

- 4 Ikke bruk noen settkomponenter utover deres oppgitte utløpsdato på etiketten på settets eske. Ikke bytt om settkomponenter fra ulike settpartier. Vær oppmerksom på at settpartier er identifisert på etiketten på settets eske.
- 5 Oppbevar settkomponentene ved angitt temperatur i tilordnede preforsterknings- og postforsterkningsområder.
- 6 Unngå gjentatte fryse/tine-sykluser av reagensene. Se *Prosedyremessige merknader* for antall ganger settet kan brukes.
- 7 For å hindre nedbrytning av prøver eller reagens må det påses at all natriumhypoklorittdamp er fullstendig oppløst før protokollen startes.
- 8 God laboratoriepraksis og god laboratoriehygiene er påkrevd for å hindre at PCR-produkter kontaminerer reagenser, instrumentering og genomiske DNA-prøver. PCR-kontaminasjon kan medføre unøyaktige og upålitelige resultater.
- 9 For å hindre kontaminasjon må du påse at preforsterknings- og postforsterkningsområdene har sitt eget utstyr (som dråpetellere, dråpetellerspisser, roterer og sentrifuge).
- 10 Unngå krysskontaminasjon. Bruk nye dråpetellerspisser mellom prøvene og mellom dispensering av reagenser. Bland prøver med en dråpeteller og sentrifuger platen når dette angis. Ikke roter platene. Bruk av aerosolresistente spisser reduserer risikoen for amplikon-overføring og krysskontaminasjon fra prøve til prøve.
- 11 Indeks-prøvesammenkobling må være i nøyaktig samsvar med trykt plateoppsett. Local Run Manager fyller automatisk ut indeksprimerne som er tilknyttet prøvenavnene, når de er angitt i modulen. Brukeren anbefales å verifisere indeksprimerne som er assosiert med prøvene, før sekvenseringskjøringen startes. Misforhold mellom prøvearket og plateoppsettet resulterer i tap av positiv prøveidentifikasjon og uriktig resultatrapportering.
- 12 Tilbered alltid ny 80 % etanol for vasketrinnene. Etanol kan absorbere vann fra luften, noe som påvirker resultatene.
- 13 Sørg for at all etanol blir fjernet fra bunnen av brønnene under vasketrinnene. Rester av etanol kan påvirke resultatene.
- 14 Følg de angitte tørketidene etter magnetstativtrinnet for å sikre fullstendig fordampning. Rester av etanol kan påvirke ytelsen til påfølgende reaksjoner.
- 15 Ikke bland tilpasset oligonukleotidsammenslåing og hybridiseringsbuffer ved oppbevaring. Når de kombineres, blir tilpasset oligosammenslåing ustabil, selv ved oppbevaring i frosset tilstand.
- 16 Bruk av termosyklere med aktiv avkjøling (f.eks. Peltier, termoelektrisk avkjølt) anbefales ikke for hybridiseringstrinnet. Det passive nedkjølingstrinnet er kritisk for riktig hybridisering.
- 17 Tilsett alltid PCR-polymerase til PCR-hovedblandingen like før bruk. Kombinert arbeidsoppløsning skal aldri oppbevares.
- 18 Under biblioteknormaliseringstrinnet er det ekstremt avgjørende å resuspendere bibliotekkulen fullstendig. Dette er avgjørende for å oppnå konsekvent klyngetetthet på den sekvenserende strømningscellen.
- 19 Følg de oppgitte inkubasjonstidene i biblioteknormaliseringstrinnet. Feil inkubasjon kan påvirke bibliotekrepresentasjonen og klyngetettheten.
- 20 På grunn av antallet plateoverføringer og derved mulighet for kontaminasjon, bør du være ekstremt forsiktig for å sikre at brønninnholdet forblir fullt ut i brønnen. Innholdet skal ikke sprute.

## Akronymer

Tabell 7 Akronymer for Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx

Akronym	Definisjon
AMP	AMplification Plate (Forsterkningsplate) (bibliotek)
CLP	CLean-up Plate (Rengjøringsplate)

Akronym	Definisjon
COP	Custom Oligonucleotide Pool (Tilpasset oligonukleotidsammenslåing)
DAL	Diluted Amplicon Library (Fortynnet ampliconbibliotek)
FPU	Filter Plate Unit (Filterplateenhet)
HYB	HYBridization Plate (Hybridiseringsplate)
LNP	Library Normalization Plate (Biblioteknormaliseringsplate)
NTC	Negative Template Control (Negativ malkontroll)
PAL	Pooled Amplicon Library (Sammensatt ampliconbibliotek)
POS	POSitive Control (Positiv kontroll)
SGP	StoraGe Plate (Oppbevaringsplate)

## Prosedyremessige merknader

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

## Prøvegjennomløp

For Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx kan bibliotekets gjennomløp for en sekvenseringskjøring være fra 1 til 96 biblioteker på MiSeqDx og 8 til 96 biblioteker på NextSeq 550Dx. Den somatiske arbeidsprosessen krever minst to biblioteker for en prøve.

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

## Indeksprimersekvenser

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

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



### MERK

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

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

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

## Bruksanvisning

### Prøveoppsett

Før bibliotekklargjøring blir utført, blir en sekvenseringskjøring opprettet med Local Run Manager, programvaren på sekvenseringsinstrumentet. Kjøringen fylles med prøver, og manifestfilen blir valgt. Det resulterende prøveoppsettet blir

skrevet ut eller eksportert til en fil som skal brukes som referanse når bibliotekene blir klargjort fra prøvene. Du finner detaljerte instruksjoner i den modulspeifikke referanseveiledningen som følger med det aktuelle arbeidsprosess- og sekvenseringsinstrumentet. Prøver kan legges inn manuelt eller importeres i henhold til instruksjonene i referanseveiledningen.

## Instruksjoner om kimbanearbeidsprosess versus somatisk arbeidsprosess

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

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



### MERK

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

**Tabell 10** Forskjeller mellom arbeidsprosessene for å analysere kimbanevarianter versus somatiske varianter

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

## Hybridisering av oligonukleotidsammenslåing (preforsterkning)

### Tilberedelse

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

- Opprett prøveplaten i henhold til det trykte plateoppsettet fra Local Run Manager.

### Prosedyre

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

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



#### FORSIKTIG

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

- Legg **HYB**-platen på den forhåndsoppvarmede blokken med 96 brønner ved 95 °C, lukk lokket og inkuber i ett minutt.
- Reduser varmeblokkinnstillingen til 40 °C, og fortsett å inkubere til varmeblokken når 40 °C (omtrent 80 minutter).

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



#### SIKKERT STOPPEPUNKT

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

## Fjerning av ubundne oligonukleotider

### Klargjøring

- 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.
- 3 Forvask filterplatemembranen slik:
  - a Tilsett 50 µl stringent vaskebuffer i hver prøve- og NTC-brønn.
  - b Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.



#### MERK

Kontroller at alle brønner i filterplaten dreneres helt. Hvis vaskebufferen ikke dreneres helt, 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 50 µl stringent vaskebuffer i hver prøve- og NTC-brønn.
  - b Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved 2400 × g ved 20 °C i 5 minutter.



#### MERK

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

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



#### MERK

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

## Ekstensjonsligasjon av bundne oligonukleotider

### Prosedyre

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

## PCR-forsterkning

### Klargjøring

- 1 Tilbered ny 0,05 N NaOH.
- 2 Bestem hvilke indeksprimere som skal brukes i henhold til det trykte plateoppsettet fra Local Run Manager.

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

## Prosedyre

- 1 Fjern **FPU** fra inkubatoren.
- 2 Fjern aluminiumsfolieforseglingen. Dekk til filterplaten med lokket, og sentrifuger ved  $2400 \times g$  ved  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i to minutter.
- 3 Tilsett 25 µl av 0,05 N NaOH til hver prøve og NTC-brønn på filterplaten. Pipetter NaOH opp og ned 5–6 ganger.
- 4 Dekk til og inkuber filterplaten ved romtemperatur i fem minutter for å eluere bibliotekene.
- 5 Mens filterplaten inkuberes, overføres 22 µl PCR-arbeidsoppløsning i hver brønn på **AMP**-platen som inneholder indeksprimere.
- 6 Overfør prøver som er eluert fra filteret til **AMP**-platen slik:
  - a Pass på at du ikke perforerer filtermembranen. Pipetter prøvene forsiktig opp og ned 5–6 ganger ved hjelp av en P20-dråpeteller satt til 20 µl.
  - b Overfør 20 µl fra filterplaten til tilsvarende brønner 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 overføring for å unngå krysskontaminasjon av indeks og prøve.*
- 7 Forsegl **AMP**-platen, og fest den med en valse eller kile.
- 8 Sentrifuger ved  $1000 \times g$  ved  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 1 minutt.
- 9 Overfør **AMP**-platen til postforsterkningsområdet.
- 10 Utfør PCR basert på arbeidsprosessen ved hjelp av følgende termosyklusprogram med det oppvarmede lokket på:
  - **Kimbanearbeidsprosess:**
    - $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 3 minutter
  - Deretter 28 sykluser:
    - $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 30 sekunder
    - $66\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 30 sekunder



- 72 °C i 60 sekunder
- 72°C i 5 minutter
- Holdes på 10 °C
- **Somatisk arbeidsprosess:**
  - 95 °C i 3 minutter
- Deretter 32 sykluser:
  - 95 °C i 30 sekunder
  - 66 °C i 30 sekunder
  - 72 °C i 60 sekunder
- 72 °C i 5 minutter
- Holdes på 10 °C



#### SIKKERT STOPPEPUNKT

Hvis du ikke fortsetter umiddelbart til PCR-rengjøring, kan AMP-platen bli på termosykleren over natten, oppbevares ved 2 °C til 8 °C i opptil 48 timer, eller oppbevares ved –25 °C til –15°C i opptil 1 uke.

## Verifisere bibliotekklargjøring

### Prosedyre

Bekreft bibliotekklargjøringen ved å utføre følgende trinn.

#### **Kimbanearbeidsprosess:**

Det er ingen verifisering av bibliotekklargjøring i kimbanearbeidsprosessen.

#### **Somatisk arbeidsprosess:**

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

## PCR-rengjøring

### 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).
- 3 Snu PCR-rengjøringskulene ti ganger. Roter kraftig og snu deretter ytterligere 10 ganger. Kontroller visuelt oppløsningen for å sikre at kulene er resuspendert.

**MERK**

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

- 4 Tilsett PCR-rengjøringskuler til **CLP**-platen i følgende trinn, avhengig av arbeidsprosessen:
  - **Kimbanearbeidsprosess:**
    - Tilsett 45 µl PCR-rengjøringskuler i hver brønn i **CLP**-platen.
    - Overfør hele PCR-produktet fra **AMP**-platen til **CLP**-platen (cirka 50 µl).
  - **Somatisk arbeidsprosess:**
    - Tilsett 55 µl PCR-rengjøringskuler i hver brønn i **CLP**-platen.
    - Overfør hele PCR-produktet fra **AMP**-platen til **CLP**-platen (cirka 60 µl).
- 5 Forsegle **CLP**-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i 2 minutter.
- 6 Inkuberes i romtemperatur uten risting i 10 minutter.
- 7 Sett platen på et magnetstativ i minst to minutter eller til supernatanten er klar.
- 8 Mens **CLP**-platen står på magnetstativet, fjernes supernatanten forsiktig og kastes.
- 9 Mens **CLP**-platen står på magnetstativet, vaskes kulene slik:
  - a Tilsett 200 µl nyttilberedt 80 % etanol i hver prøvebrønn.
  - b Inkuber platen på et magnetstativ i minst 30 sekunder eller til supernatanten er klar.
  - c Fjern supernatanten forsiktig, og kasser den.
- 10 Gjenta vaskingen som beskrevet i tidligere trinn.
- 11 Bruk en P20 flerkansalsdråpeteller satt på 20 µl til å fjerne overflødig etanol.
- 12 Ta **CLP**-platen ut av magnetstativet, og lufttørk kulene i fem minutter.
- 13 Tilsett 30 µl elueringsbuffer forsiktig til kulene, og gjør en kort rotering.

**MERK**

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

- 14 Forsegl **CLP**-platen med Microseal 'B' og en valse eller kile, og rist den deretter på en mikroplateryster ved 1800 o/min i fem minutter. Etter ristingen må du kontrollere at prøvene ble resuspendert. Hvis en kulepellet fortsatt er synlig i enkelte brønner, må du bruke en P200-dråpeteller innstilt på 30 µl for å resuspendere hver enkelt kulepellet. Kontroller spissene visuelt for å sjekke at kulene blir dispensert tilbake i brønnene før spissene utløses. Forsegl **CLP**-platen, og rist den på en mikroplateryster ved 1800 o/min i ytterligere fem minutter.
- 15 Inkuberes i romtemperatur i 2 minutter.
- 16 Sett **CLP**-platen på et magnetstativ i minst 2 minutter eller til supernatanten er klar.
- 17 Sett ut en ny MIDI-plate (heretter kalt **LNP**-platen).
- 18 Overfør 20 µl av supernatanten fra **CLP**-platen til **LNP**-platen.
- 19 Overfør 20 µl av supernatanten forsiktig fra **CLP**-platen til **LNP**-platen.
- 20 Forsegl **LNP**-platen med en klebende plateforsegling, og sentrifuger den deretter med 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt for å påse at all supernatant befinner seg på bunnen i brønnen.
- 21 [Valgfritt] Overfør gjenværende 10 µl av supernatanten fra **CLP**-platen til en ny plate, og merk platen med et kjøringsnavn og dato. Oppbevar denne platen ved –25 °C til –15 °C til sekvenseringskjøringen og dataanalysen er ferdig.

De rengjorte PCR-produktene kan brukes til feilsøking hvis det oppstår prøvefeil.

**SIKKERT STOPPEPUNKT**

Hvis den stopper på dette punktet, forsegles **LNP**-platen og sentrifugeres ved 1000 × g ved 20 °C i 1 minutt. Platen er stabil i opptil tre timer ved 2 °C til 8 °C eller –25 °C til –15 °C i opptil en uke.

## Biblioteknormalisering

### Tilberedelse

- 1 Tilbered ny 0,1 N NaOH.
- 2 La biblioteknormaliseringsfortynning, bibliotekkulur og vaskeløsning for biblioteknormalisering oppnå romtemperatur.
- 3 Fjern biblioteklagringsbuffer fra romtemperaturlagring, og sett den til side.
- 4 Roter biblioteknormaliseringsfortynning kraftig, og kontroller at alt bunnfall er oppløst.
- 5 Roter bibliotekkulur 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 bibliotekkulur i et nytt 15 ml kjegleformet rør (bruk et nytt 1,5 ml rør ved behandling av <24 prøver) slik:
  - a For 96 prøver tilsettes 4,4 ml biblioteknormaliseringsfortynning.
  - b Resuspend bibliotekkulur: Roter bibliotekkulur kraftig i ett minutt med vekselvis vending. Bruk et P1000-sett til 1000 µl for å resuspendere bibliotekkulur helt ved å sakte pipettere opp og ned minst 10 ganger til det ikke er noe pellet igjen når røret snus.



#### FORSIKTIG

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



#### FORSIKTIG

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

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



#### MERK

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

- 4 Sett platen på et magnetstativ i minst to minutter eller til supernatanten er klar.
- 5 Mens LNP-platen står på magnetstativet, skal forseglingen fjernes. Fjern deretter supernatanten forsiktig og kast den.
- 6 Fjern LNP-platen fra magnetstativet, og vask kulene med vaskeløsning for biblioteknormalisering på følgende måte:
  - a Tilsett 45 µl vaskeløsning for biblioteknormalisering til kulene i LNP-platen.
  - b Forsegl LNP-platen med Microseal 'B' og en valse eller kile, og rist den deretter på en mikroplateryster ved 1800 o/min i fem minutter.
  - c Sett LNP-platen på et magnetstativ i minst to minutter eller til supernatanten er klar.
  - d Fjern og kast all supernatant.
- 7 Gjenta prosedyren for vaskeløsning for biblioteknormalisering som beskrevet i tidligere trinn.
- 8 Forsegle LNP-platen med en klebende plateforsegling.
- 9 Sentrifuger LNP-platen ved 1000 × g ved 20 °C i 30 sekunder for å samle opp overflødig vaskebuffer.
- 10 Sett LNP-platen på magnetstativet i to minutter.

- 11 Bruk en P20 flerkanalstråpeteller satt til 20 µl til å forsiktig fjerne overflødig vaskeløsning for biblioteknormalisering. Ikke forstyrr kulene.
- 12 Fjern LNP-platen fra magnetstativet, og tilsett 30 µl 0,1 N NaOH i hver brønn.
- 13 Forsegl LNP-platen med Microseal 'B' og en valse eller kile, og rist den deretter på en mikroplateryster ved 1800 o/min i fem minutter.
- 14 I løpet av elueringen på 5 minutter settes en ny 96-brønners PCR-plate ut (heretter kalt SGP-platen).
- 15 Tilsett 30 µl biblioteklagringsbuffer til hver brønn som skal brukes i SGP-platen.
- 16 Etter elueringen på fem minutter må det påses at alle kulene på LNP-platen er resuspendert. Hvis kulene ikke er fullstendig resuspendert, skal disse brønnene pipetteres forsiktig opp og ned. Bank eventuelt platen forsiktig mot benken for å resuspendere kulene, og rist deretter i ytterligere fem minutter.
- 17 Sett LNP-platen på magnetstativet i minst to minutter.
- 18 Overfør supernatanten (ca. 30 µl) sakte fra LNP-platen til SGP-platen. Pipetter forsiktig opp og ned fem ganger for å blande. Bruk nye spisser for hver overføring.
- 19 Forsegle SGP-platen, og sentrifuger deretter ved 1000 × g ved 20 °C i ett minutt. Fortsett umiddelbart med *biblioteksammenslåing*. Kast LNP-platen.

## Klargjøre for biblioteksekvensering

### Tilberedelse

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

### Denaturere og fortynne PhiX-internkontroll

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

- 1 Tilbered 0,1 N NaOH.
- 2 Snu røret flere ganger for å blande.



#### FORSIKTIG

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



#### TIPS

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:
  - 2 µl av 10 nM PhiX-internkontrollbibliotek
  - 8 µl av 1X TE-buffer
- 4 Kombiner følgende volumer for å få et PhiX-internkontrollbibliotek på 1 nM:
  - 10 µl av 2 nM PhiX-internkontrollbibliotek
  - 10 µl av 0,1 N NaOH
- 5 Roter et øyeblikk slik at PhiX-internkontrollbiblioteksløsningen på 1 nM blandes.
- 6 Sentrifuger 1 nM PhiX-internkontrollbiblioteksløsningen for å samle innholdet.
- 7 Inkuber i fem minutter ved romtemperatur for å denaturere PhiX-internkontrollbiblioteksløsningen til enkle DNA-strenger.
- 8 Tilsett 980 µl forhåndskjølt bibliotekfortynningsbuffer til røret som inneholder denaturert PhiX-internkontrollbibliotek. Den endelige konsentrasjonen er 20 pM denaturert PhiX-internkontrollbibliotek.

**TIPS**

Det denaturerte PhiX-internkontrollbiblioteket på 20 pM kan oppbevares i opptil tre uker ved  $-25^{\circ}\text{C}$  til  $-15^{\circ}\text{C}$  som alikvoter for engangsbruk.

**Biblioteksammenslåing**

- 1 Roter bibliotekfortynningsbufferen, og kontroller at alt bunnsfall er fullstendig oppløst.
- 2 Sentrifuger et øyeblikk for å samle innhold.
- 3 Sett ut et nytt rør med skrukork (heretter kalt **PAL**-rør [Pooled Amplicon Library] (Sammensatt PCR-produktbibliotek)).
- 4 Bestem hvilke prøver som skal grupperes for sekvensering. Maksimum 96 biblioteker kan grupperes for sekvensering.
- 5 Fjern forseglingen fra **SGP**-platen. Overfør 10  $\mu\text{l}$  av hvert bibliotek som skal sekvenseres fra **SGP**-platen til en PCR 8-rørstrimmel, bytt spisser hver gang.
- 6 Forsegl **SGP**-platen med en klebende plateforsegling, og lagre ved  $-25^{\circ}\text{C}$  til  $-15^{\circ}\text{C}$  i opptil 48 timer.

**TIPS**

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

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

**TIPS**

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

**SIKKERT STOPPEPUNKT**

Hvis sekvensering ikke skal utføres umiddelbart, kan **DAL**-rørene oppbevares ved  $-25^{\circ}\text{C}$  til  $-15^{\circ}\text{C}$  i opptil 84 dager.

**Klargjøre for sekvensering ved hjelp av MiSeqDx**

- 1 Fortsett med ett **DAL**-rør for sekvensering.
- 2 Hvis **DAL**-røret ble lagret frosset, må det tine helt.
- 3 Bland **DAL**-røret ved å rotere røret med maksimal hastighet.
- 4 Sentrifuger **DAL**-røret en kort stund.
- 5 Inkuber **DAL**-røret på en varmeblokk ved  $96^{\circ}\text{C}$  i 2 minutter.
- 6 Etter inkubasjonen inverteres **DAL**-røret 1–2 ganger for blanding før det settes umiddelbart i isvann.
- 7 La **DAL**-røret stå i isvann i 5 minutter.

**FORSIKTIG**

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

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

**Klargjør for sekvensering ved hjelp av NextSeq 550Dx**

- 1 Fortsett med ett **DAL**-rør for sekvensering.
- 2 Sett ut et nytt rør med skrukork (heretter kalt **FDT**-rør [Final Dilution Tube] (Endelig fortynningsrør)).
- 3 Hvis **DAL**-røret ble lagret frosset, må det tine helt.
- 4 Bland **DAL**-røret ved å rotere røret med maksimal hastighet.

- 5 Sentrifuger **DAL**-røret en kort stund.
- 6 Overfør en aliquot fra **DAL** til **FDT**. **DAL**-volumet som trengs for å oppnå riktig klyngetetthet, er avhengig av oligosammenslåingen som brukes, og varierer vanligvis i området 130–160 µl.
- 7 Klargjør **FDT** med et totalt volum på 1300 µl med bibliotekfortynningsbuffer.
- 8 Bland **FDT**-røret ved å rotere røret med maksimal hastighet.
- 9 Sentrifuger **FDT**-røret en kort stund.
- 10 Inkuber **FDT**-røret på en varmeblokk ved 96 °C i 2 minutter.
- 11 Etter inkubasjonen inverteres **FDT**-røret 1–2 ganger for blanding før det settes umiddelbart i isvann.
- 12 La **FDT**-røret stå i isvann i 5 minutter.

**FORSIKTIG**

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

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

## Kvalitetskontrollprosedyrer

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

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

## Ytelseskarakteristikk

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

Somatiske studier brukte TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

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

### Definisjoner av beregninger for ytelseskarakteristikk

- 1 Positivt prosentsamsvar (PPA) beregnes som andelen av loki klassifisert som varianter ved hjelp av en referansemetode som er korrekt rapportert av analysen.
  - $(\text{antall variantloki korrekt rapportert av analysen}) / (\text{totalt antall variantloki})$   
Variantloki rapportert av analysen som samsvarer med referansemetoden, er sant positive (TP). Variantloki rapportert som referansebetegnelser eller som forskjellige variantbetegnelser av analysen, er falskt negative (FN).
- 2 Negativt prosentsamsvar (NPA) beregnes som andelen av loki klassifisert som villtype ved hjelp av en referansemetode som er korrekt rapportert av analysen.
  - $(\text{Antall villtypeloki korrekt rapportert av analysen}) / (\text{totalt antall villtypeloki})$   
Villtypeloki rapportert av analysen som samsvarer med referansemetoden, er sant negative (TN). Villtypeloki rapportert som varianter av analysen er falskt positive (FP).

- 3 Samlet prosentamsvar (OPA) beregnes som andelen loki som er korrekt rapportert av analysen i forhold til en referansem metode.
  - $((\text{antall variantloki korrekt rapportert av analysen}) + (\text{villtypeloki korrekt rapportert av analysen})) / ((\text{totalt antall variantloki}) + (\text{totalt antall villtypeloki}))$
- 4 Beregningene av PPA, NPA og OPA inkluderer ikke noen betegnelser (variant- eller referanseloki som ikke oppfyller ett eller flere kvalitetsfiltre). To studier inneholder spesifikt ikke noen betegnelser i målinger av «% korrekte betegnelser», og denne inkluderingen av ingen betegnelser er angitt for de aktuelle tabellene.
- 5 Betegnelsesfrekvens er beregnet som det totale antallet lokipasserende filtre som deles på totalt antall posisjoner som er sekvensert eller rapporterbare. Denne målingen vurderer ikke samsvaret av betegnelser med referansem etoden.

### Carryover av prøver

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

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

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

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

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

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

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

### Ytelseskarakteristikker for kimbane

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

## DNA-ekstraksjon

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

**Tabell 11** Nøyaktighet, betegnelsesfrekvens og prøvens første gjennomgangshastighet med ekstraksjonsmetode

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

<sup>1</sup>Nøyaktighet – prosentamsvaret med en referansetestmetode (toveis sekvensering med Sanger) beregnet for de baseposisjonene som mottar en basebetegnelse.

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

## DNA-innmating

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

Hver prøve ble testet i duplikat på 5 DNA-innmatingsnivåer fra 250 ng til 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng og 12 ng). For å bestemme nøyaktighet ble prøvegenotyper sammenlignet med Platinum Genomes-versjon 2016-01. Resultatene ble bestemt for hvert innmatingsnivå. PPA for hver varianttype (slettinger, innsetninger og SNV-er) er angitt i [Tabell 1](#); NPA er angitt i [Tabell 13](#). Alle innmatingsnivåer hadde lignende nøyaktighet. Anbefalt DNA-innmating er 50 ng med 25 ng og 100 ng som en nedre og øvre grense for å møte nøyaktighetskravet.



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

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

Tabell 13 NPA for hver DNA-innmating

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

## Forstyrrende stoffer

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

Tabell 14 Betegnelsesfrekvens for hvert teststoff

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

## Karakteristika for somatisk ytelse

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

### DNA-innmating

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

Tabell 15 Nøyaktighet og ingen betegnelser av  $\Delta Cq$ -gruppen

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

### Ekstraksjon

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

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

### Forstyrrende stoffer

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

### Eksogene stoffer

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

**Tabell 16** Stoffer testet

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

<sup>1-3</sup>Tre kommersielt tilgjengelige kolonnebaserte DNA-isolasjonssett.

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

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

### Endogene stoffer (hemoglobin)

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

Alle 15 prøver viste samsvar for alle mutante (10/10) og ikke-mutante posisjoner (830/830) med ubehandlet kontrolltilstand. Konsentrasjonen av testet hemoglobin påvirker ikke ytelsen til TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

### Endogene stoffer (nekrotisk)

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

## Patenter og varemerker

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

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

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

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

© 2019 Illumina, Inc. Med enerett.

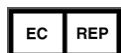
Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. Ytterligere informasjon om varemerker finner du på [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

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

## Kontaktinformasjon



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



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



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

## Produktmerking

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