AlloSeqTx

Brugsanvisning

IFU095
Versionsnummer: 6.0
Udgivelsesdato: Juli 2022

REF

ASTX17.1(24)-IVD

ASTX17.1(24)-B-IVD

ASTX17.1(96)-A-IVD

ASTX17.1(96)-B-IVD

ASTX9.1(96)-A-IVD

ASTX9.1(96)-B-IVD

IVD

CE 0197

CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street,
Fremantle, WA 6160,
Australien

CareDx AB,
Franzéngatan 5,
SE-112 51
Stokholm, Sverige

EC REP

Qarad BV,
Cipalstraat 3,
B-2440 Geel,
Belgien

CareDx Pty Ltd

© 2022 CareDx, Inc. Alle servicemærker eller varemærker tilhører eller licenseres af CareDx, Inc. eller tilknyttede selskaber. Alle rettigheder forbeholdes.

Indholdsfortegnelse

1. Oversigt ... 3
   1.1 Princip ... 3
   1.2 Tilsigtet anvendelse ... 4
   1.3 AlloSeq Tx, målrettet genindhold ... 4
   1.4 AlloSeq Tx-sættets indhold og opbevaringskrav ... 4
   1.5 Begrænsninger og kontraindikationer ... 5
   1.6 Prøvekrav ... 6
   1.7 Forstyrrende stoffer ... 6
   1.8 Ydeevnekarakteristika ... 7
   1.9 Nøjagtighed ... 7
   1.10 Specificitet ... 8
   1.11 Reproducerbarhed og repeterbarhed ... 9
   1.12 Detektionsbegrænsning ... 9
   1.13 Forudsætninger ... 9
   1.14 Sikkerhed ... 9
2. Biblioteksforberedelse (Early Pooling-arbejdsgang) ... 13
   2.0 Præsentation af protokollen ... 13
   2.1 Prøveklargøring ... 13
   2.2 Biblioteksklargøring ... 13
   2.3 Størrelsesvalg og rensning ... 16
   2.4 Qubit-kvantificering (valgfrit) ... 18
   2.5 TapeStation-visualisering (valgfrit) ... 19
3. Hybrid indfangning (Early Pooling-arbejdsgang) ... 20
   3.0 Præsentation af protokollen ... 20
   3.1 Hybridisering af prøverne ... 20
   3.2 Indfangning ... 21
   3.3 PCR efter berigelse ... 22
   3.4 Rensning af PCR efter berigelse ... 23
   3.5 Qubit-kvantificering ... 24
   3.6 TapeStation-visualisering (valgfrit) ... 25
4. Library Preparation (original arbejdsgang) ... 26
   4.0 Præsentation af protokollen ... 26
   4.1 Prøveklargøring ... 26
   4.2 Biblioteksklargøring ... 26
   4.3 Størrelsesvalg og rensning ... 29
   4.4 Qubit-kvantificering (valgfrit) ... 30
   4.5 TapeStation-visualisering (valgfrit) ... 31
5. Hybrid indfangning (original arbejdsgang) ... 32
   5.0 Præsentation af protokollen ... 32
   5.1 Pooling af prøver ... 32
   5.2 Koncentration af bibliotekspoolinger (valgfrit) ... 32
   5.3 Hybridisering af prøverne ... 33
   5.4 Indfangning ... 35
   5.5 PCR efter berigelse ... 36
   5.6 Rensning af PCR efter berigelse ... 37
   5.7 Qubit-kvantificering ... 38
   5.8 TapeStation-visualisering (valgfrit) ... 38
6. Sekventering ... 40
   6.0 Præsentation af protokollen ... 40

6.1 PhiX-klargøring 40
6.2 Fortynding og denaturering til MiSeq 41
6.3 Fortynding og denaturering til MiniSeq 42
6.4 Fortynding til iSeq 43
7. Sekvensanalyse 44
8. Fejlfindingsvejledning 44
9. Supplerende oplysninger 45
Licens 45
Påkrævede forbrugsmaterialer og påkrævet udstyr, som ikke medfølger 45
10. Kontaktoplysninger 47
11. Referencer 48

1. Oversigt

1.1 Princip

AlloSeq Tx er produktserienavnet på produkter til målrettet gensekventering, der er beregnede som et hjælpemiddel til bestemmelse af den genetiske kompatibilitet mellem transplantationspatienter og potentielle donorer. AlloSeq Tx anvender hybrid indfangningsteknologi til berigelse af interessegenerne fra klargøring af et helt genombibliotek. I modsætning til traditionelle PCR-teknikker til analyse af lange fragmenter giver brugen af hybrid indfangningsteknologi fordele med hensyn til arbejdsgangen og fleksibilitet med hensyn til variabelt gen-/sekvensindhold, uden at det kræver ændringer af arbejdsgangen.

AlloSeq Tx-kittene indeholder:

- Reagenser til klargøring af hele genombiblioteker,
- Biotinylerede prober, der er komplementære til indfangning af sekvensmål og
- Reagenser til berigelse af de indfangede mål med henblik på sekvensering.

Sekventeringen udføres på et Illumina-sekventeringsinstrument (MiSeq, MiniSeq eller iSeq), og de resulterende sekvensdata udlæses i FASTQ-filer, som importeres til AlloSeq Assign® softwaren med henblik på gentypebestemmelse.

I denne *brugsanvisning* beskrives proceduren for anvendelsen af AlloSeq Tx-produktserien fra CareDx. Det genindhold, som hvert AlloSeq Tx-produkt er målrettet mod, fremgår af tabellen *Målrettet genindhold* herunder.

For at lette prøvebehandlingen og dokumentationen på laboratoriet medfølger der Excel-projektmapper for hver proces. Projektmapperne hjælper med beregninger af reagensvolumen og oprettelse af prøveark til sekventering. De supplerende projektmapper er blandt andet:

IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD
IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD
IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD
IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD

To arbejdsgangmuligheder er beskrevne i dette dokument: Original arbejdsgang og Early Pooling-arbejdsgang. Early Pooling-arbejdsgangen samler prøver øjeblikkeligt efter indeksering til et enkelt rør for alle efterfølgende trin. Early Pooling-arbejdsgangen eliminerer pladebaseret størrelsesvalg og oprensning samt det valgfri konsentreringstrin ved behandling af >12 prøver/kørsel. Denne arbejdsgang tillader brugeren at tage prøver til sekventering i et enkelt arbejdsskift. Denne arbejdsgang passer godt til laboratorier, som ikke benytter automatisering, og som foretrækker en protokol med mindre håndteringstid, mindre forbrug af forbrugsmaterialer og 46 % færre pipetteringstrin sammenlignet med den oprindelige arbejdsgang. *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD* bør anvendes sammen med Early Pooling-arbejdsgangen.

Det pladebaserede format af den originale arbejdsgang passer godt til laboratorier, som vælger at automatisere denne procedure. *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD, IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD og IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD* bør anvendes sammen med den originale arbejdsgang.

Kittet er beregnet til at blive brugt af uddannet personale på godkendte laboratorier. Der skal udvises omhu og opmærksomhed under håndteringen af produkterne. Vi anbefaler, at alle brugere læser hele brugervejledningen, især afsnittet *Sikkerhed*, inden proceduren påbegyndes. Procedurerne for anvendelsen af AlloSeq Assign-softwaren kan findes i brugsanvisningen til AlloSeq Assign-softwaren.

1.2 Tilsigtet anvendelse

AlloSeq Tx er produktserienavnet på produkter til målrettet gensekventering, der er beregnet som et hjælpemiddel til bestemmelse af den genetiske kompatibilitet mellem transplantationspatienter og potentielle donorer, herunder prober til målrettet berigelse af op til 17 loci

AlloSeq Tx 17-typebebestemmelses kittene er kvalitative test til DNA-typebestemmelse af HLA-A, B, C, E, F, G, H, DRB1/3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, MICA og MICB, der er beregnede som et hjælpemiddel ved genetisk matchning i forbindelse med organ- eller stamcelletransplantation.

AlloSeq Tx 9-typebestemmelses kittene er kvalitative tests til DNA-typebestemmelse af HLA-A, B, C, DRB1/3/4/5, DQB1 og DPB1 for at hjælpe med genetisk matchning til organ- eller stamcelletransplantation.

Produktet er beregnet til at blive anvendt med Illumina MiSeq-, MiniSeq- og iSeq-sekventeringsinstrumenterne i kombination med AlloSeq Assign-fortolkningssoftwaren.

Udstyret er beregnet til at blive anvendt af uddannet personale med viden om frekvensen af HLA-typer i deres population på godkendte laboratorier, der udfører vævstypebestemmelse (HLA) med henblik på matchning af donorer og transplantationspatienter.

AlloSeq Tx-produkterne er udelukkende beregnet til professionel brug og må ikke anvendes som det eneste grundlag, når der skal træffes kliniske beslutninger. AlloSeq Tx-sættene anvendes ikke til diagnosticering af sygdomme.

1.3 AlloSeq Tx, målrettet genindhold

Produktnavn	Produktkode	Målgener	Kittets størrelse	Sekventeringskapacitet
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(24)-IVD	HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA and MICB	24 bibliotheksklargøringer 4 berigelser (6-24 prøver pr. berigelse)	≤24 prøver på MiSeq Micro Flowcell ≤6 prøver på MiSeq Nano Flowcell ≤24 prøver på iSeq ≤24 prøver på MiSeq MidOutput Flowcell
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(24)-B-IVD			
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(96)-A-IVD	HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA og MICB	96 bibliotheksklargøringer 8 berigelser (12-96 prøver pr. berigelse)	≤96 prøver på MiSeq v2 Standard Flowcell ≤24 prøver på MiSeq Micro Flowcell ≤6 prøver på MiSeq Nano Flowcell ≤48 prøver på iSeq ≤24 prøver på MiSeq MidOutput Flowcell
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(96)-B-IVD			
AlloSeq Tx 9	ASTX9.1(96)-A-IVD	HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 og -DPB1	96 bibliotheksklargøringer 8 berigelser (12-96 prøver pr. berigelse)	≤96 prøver på MiSeq Standard Flowcell ≤24 prøver på MiSeq Micro Flowcell ≤6 prøver på MiSeq Nano Flowcell ≤48 prøver på iSeq ≤24 prøver på MiSeq MidOutput Flowcell
AlloSeq Tx 9	ASTX9.1(96)-B-IVD			

1.4 AlloSeq Tx-sættets indhold og opbevaringskrav

Når de opbevares i henhold til nedenstående temperaturspecifikationer, kan kittets komponenter anvendes indtil den udløbsdato, der er anført på de udvendige kitbeholdere, og de kan klare op til 12 ganges frysning og optøning. Efter anvendelsen skal kittene/komponenterne omgående opbevares under de korrekte opbevaringsbetingelser igen.

Accelererede stabilitetsundersøgelser er stadigvæk igangværende med henblik på at øge denne tidsramme. Mens der udføres bekræftende test i realtid, anbefales det på det kraftigste, at disse kit IKKE anvendes efter deres udløbsdato.

Reagensboks 1 af 5, skal opbevares ved -15 til -25 °C

Reagens	Mængde (24 test)	Rørstørrelse/-type (24 test)	Mængde (96 test)	Rørstørrelse/-type (96 test)
Tagmentation Beads	1	0.5mL	1	1.5mL
Tagmentation Buffer	1	0.5mL	1	1.5mL
PCR Mix-1	I/A	I/A	1	5mL

Reagensboks 2 af 5, skal opbevares ved 15 til 30°C

Reagens	Mængde (24 test)	Rørstørrelse/-type (24 test)	Mængde (96 test)	Rørstørrelse/-type (96 test)
Stop Buffer	1	1.5mL	2	2mL
Tagmentation Wash Buffer	2	5mL	1	50mL

Reagensboks 3 af 5, skal opbevares ved -15 til -25 °C

Reagens	Mængde (24 test)	Rørstørrelse/-type (24 test)	Mængde (96 test)	Rørstørrelse/-type (96 test)
AlloSeq Tx Index Primers	1 sæt (10x)	FluidX-rør	1 plade	96 brøndplader

Reagensboks 4 af 5, skal opbevares ved -15 til -25 °C

Reagens	Mængde (24 test)	Rørstørrelse/-type (24 test)	Mængde (96 test)	Rørstørrelse/-type (96 test)
Produktspecifikke AlloSeq Tx-sonder	1	0.5mL	1	0.5mL
PCR Mix	1	1.5mL	I/A	I/A
PCR Mix-2	I/A	I/A	1	0.5mL
PCR Primers	1	0.5mL	1	0.5mL
Hybridisation Buffer 1	1	1,5 ml, konisk	1	1,5 ml Konisk
Capture Wash Buffer	4	1,5 ml, ravfarvet konisk	8	1,5 ml, ravfarvet konisk
Capture Elution Buffer 1	1	0.5mL	1	0.5mL
2N NaOH	1	0.5mL	2	0.5mL

Reagensboks 5 af 5, skal opbevares ved 2-8 °C

Reagens	Mængde (24 test)	Rørstørrelse/-type (24 test)	Mængde (96 test)	Rørstørrelse/-type (96 test)
Purification Beads	1	5mL	I/A	I/A
Purification Beads-1	I/A	I/A	3	5mL
Purification Beads-2	I/A	I/A	1	0.5mL
Resuspension Buffer	2	1.5mL	2	5mL
Capture Beads	1	1.5mL	1	5mL
Hybridisation Buffer 2	1	0.5mL	1	0.5mL
Capture Elution Buffer 2	1	0.5mL	1	0.5mL

1.5 Begrænsninger og kontraindikationer

- Det anbefales på det kraftigste, at brugeren forud for implementeringen på laboratoriet validerer disse kit ved brug af prøver, hvor gentypen er blevet bestemt ved brug af andre molekylærbaserede procedurer.
- Det anbefales på det kraftigste, at brugeren følger anvisningerne på produktmærkningen. Afvigelser fra den anførte procedure anbefales ikke, er muligvis ikke understøttet og kan medføre fejl i typebestemmelsen.

- Det anbefales, at medtage en positiv kontrol (human DNA) og en negativ kontrol/no template kontrol uden skabelon (ved brug af sterilt vand i stedet for DNA) ved hver kørsel af et klargjort bibliotek. Den positive kontrol skal frembringe et kvantificerbart bibliotek (målt ved Qubit eller dækningssekventeringsmetrikker), og den resulterende sekvens skal være i overensstemmelse med prøvens forventede genotype. Der må ikke være noget kvantificerbart bibliotek (målt af Qubit eller rapporteret som lav dækning i Assign) i den negative template kontrol for hvert eksperiment. Hvis der frembringes et kvantificerbart bibliotek for no template kontrollen, skal kørslen gentages.
- AlloSeq Tx-analysen sekventerer DNA-fragmenter med en gennemsnitlig insertstørrelse på 500 bp. Det vil sige, at polymorfier, med en afstand på mere end 500 bp ikke kan fases, hvilket kan resultere i heterozygote tvetydigheder.

1.6 Prøvekrav

Human genomisk DNA med høj molekylvægt (opslæmmet i Tris/EDTA-buffer og OD260/280> 1,8), som er ekstraheret fra fuldblodsprøver, der behandlet med antikoagulanserne ACD eller EDTA. Der må IKKE anvendes blodprøver, som indeholder heparin. Denne metode kan også anvendes med DNA fra bukkal-vatpind.

Vigtigt: Alle referencer til DNA fra bukkal-vatpind i dette dokument er kun beregnet til undersøgelsesformål. **DNA fra bukkal-vatpind er valideret med denne metode til diagnostisk anvendelse.**

1.7 Forstyrrende stoffer

CareDx Pty Ltd har identificeret alle kendte potentielt forstyrrende stoffer, som kan påvirke testen. Se nedenstående tabel.

Inhibitor	Potentiel kilde	Risiko	Kommentarer
EDTA	TE-buffer, blodprøverør	Meget lav	Opslæm DNA'en i Tris-HCl pH8 eller TE med <1 mM EDTA. Brug kommercielt tilgængelige kit til klargøring af DNA fra blod og/eller undgå EDTA-blodprøverør
Alkoholer	Ætanol, isopropanol, isoamylalkohol	Lav	Sørg for, at DNA-perlerne eller-kuglerne er lufttørrede, og kontrollér den visuelt for ætanoldråber (1 % ætanol = 1,25 ul 80 % ætanol i en PCR-reaktion på 100 ul). Der er flere skylletrin med 80 % ætanol i AlloSeq Tx-protokollen, hvilket gør inhibering på grund af ætanoloverførsel til en lav men lidt højere risiko end de andre faktorer.
Overskydende salte	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Meget lav	Sørg for grundig skylning af DNA-perlerne eller -kuglerne med 80 % ætanol. Sørg for, at OD 260/230 for startgenomets DNA er ~2
Kaotropiske salte	Guanidin Cl; MgCL2; urea	Meget lav	Sørg for grundig skylning af DNA-perlerne eller -kuglerne med 80 % ætanol. Sørg for, at OD 260/230 for startgenomets DNA er ~2
Fenol:kloroform	Organisk overførsel	Meget lav	En komponent af den meget anvendte kommercielle Trizol DNA-ekstraheringsprocedure. Sørg for grundig skylning af DNA-perlerne eller -kuglerne med 80 % ætanol. Sørg for, at OD 260/230 for startgenomets DNA er ~2
Proteiner	BSA, PEG, blodalbumin	Meget lav	Anvend kommercielt tilgængelige kit til klargøring af DNA fra blod. Sørg for, at OD 260/280 for startgenomets DNA er >1,8
Hæm, hæmoglobin, immunglobuliner	Blod	Meget lav	Undgå at bruge blodprøver, der udviser kraftig hæmolyse. Anvend kommercielt tilgængelige kit til klargøring af DNA fra blod. Sørg for, at OD 260/280 for startgenomets DNA er >1,8

Inhibitor	Potentiel kilde	Risiko	Kommentarer
Rengøringsmidler/ DDT	Natriumdeoxycholat, sarkosyl, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, N-octylglucosid	Meget lav	Sørg for grundig skylning af DNA-perlerne eller -kuglerne med 80 % ætanol. Sørg for, at OD 260/230 for startgenomets DNA er ~2
Proteaser	Proteinase K, prøvehåndtering	Meget lav	Anvend kommercielt tilgængelige kit til klargøring af DNA fra blod eller spyt. Bær hele tiden handsker.
Nukleaser	Prøvehåndtering, restriktionsenzymer, mikrokoknuklease	Meget lav	Anvend kommercielt tilgængelige kit til klargøring af DNA fra blod. Bær hele tiden handsker.
Eksogen DNA/RNA	Overførsel, kontaminering	Meget lav	Klargør den genomiske DNA i et dertil beregnet præ-PCR-område
Bærestoffer	RNA, heparin, glykogen	Meget lav	Brug kommercielt tilgængelige kit til klargøring af DNA fra blod og/eller undgå heparinblodprøverør
Overskydende metalioner	Mg2+ fra PCR-buffer, Fe-ioner	Meget lav	Sørg for grundig skylning af DNA-perlerne eller -kuglerne med 80 % ætanol. Sørg for, at OD 260/230 for startgenomets DNA er ~2
Antivirale lægemidler (f.eks. acyclovir)	Blod	Meget lav	Anvend kommercielt tilgængelige kit til klargøring af DNA fra blod. Sørg for, at OD 260/280 for startgenomets DNA er >1,8
Pulver fra handsker	Handsker med pulver	Meget lav	Brug handsker uden pulver.
UV-bestrålede PCR-rør	UV-behandling af PCR-rør	Meget lav	Undgå UV-behandling af plastudstyr.
Biotin	Fra lægemidler, der interagerer med streptavidin	Meget lav	Der er en række skylletrin til rensning mellem prøveudtagningstrinnet og det hybride indfangningstrin i protokollen, som muliggør fjernelse af biotinmolekyler. Ved brug af en analyse med hybrid indfangning medfører forekomsten af biotin (hvilket som beskrevet ovenfor er usandsynligt) ikke til et forkert resultat. Det kan medføre en nedsat effektivitet af berigelsen, hvilket vil blive registreret som et lavt berigelsesresultat eller ikke noget resultat.

1.8 Ydeevnekarakteristika

Analysens ydeevne blev vurderet ved brug af et panel af DNA-prøver med kendte gentyper, herunder også interne CareDx-kontrolprøver, IHW (International Histocompatibility Workshops) HLA-referencestandarder og prøver fra International HLA DNA Exchange, University of California, Los Angeles (UCLA). Resultaterne af bibliotheksklargøringen, berigelsen og sekventeringen blev evalueret ud fra definerede godkendelseskriterier.

1.9 Nøjagtighed

AlloSeq Tx-produktet sammen med AlloSeq Assign-softwaren er designet til overensstemmelse med ASHI-standarden (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics); samt EFI-standarden (European Federation of Immunogenetics) for HLA-typebestemmelse.

I verifikations- og valideringsundersøgelserne blev AlloSeq Tx-produktet og AlloSeq Assign anvendt til vurdering af overensstemmelsen af gentypebestemmelsen med prøver, der var blevet typebestemt ved brug af en anden metode. De interne kontrolprøver blev typebestemt ved brug af sekvensbaseret typebestemmelse (SBT). Prøver fra internationalt anerkendte IHW- og UCLA-databaser blev anvendt i forbindelse med verifikationsundersøgelserne, og blev typebestemt ved brug af forskellige metoder, herunder SBT, SSP og SSO. Der er tale om karakteriserede DNA-prøver, som repræsenterer de hyppigst forekommende HLA-alleler og udvalgte sjældne alleler.

Oversigt over resultatet af verifikations- og valideringsundersøgelserne:

MÅL	PANEL	PANELSTØRRELSE (n)	RESULTAT
Overensstemmende gentypebestemmelse	Internt	190	100 %
Overensstemmende gentypebestemmelse	UCLA	24	98,12 %
Overensstemmende gentypebestemmelse	IHW	48	98,06 %
Overensstemmende gentypebestemmelse	Betatestssteder	124	99,54 %
Samlet/overordnet overensstemmelse			**99,49%**

I forbindelse med alle observerede uoverensstemmelser i verifikations-/valideringsundersøgelserne menes det, at uoverensstemmelsen skyldes begrænsninger med hensyn til den forrige typebestemmelsesmetode eller -teknologi.

1.10 Specificitet

I forbindelse med AlloSeq Tx-analyserne angiver specificiteten andelen af sekvenslæsninger (DNA-fragmenter, som analysen har indfanget), der kan kortlægges til andre loci end den pågældende målloci. Alle analyser til HLA-typebestemmelser, der anvender en eller anden form for hybridisering mellem genomiske DNA-reagenser og oligonukleotidsekvensreagenser, vil have en vis "mangel" på specificitet, uafhængigt af om der er tale om PCR-analyser eller analyser med hybrid indfangning. Dette skyldes, at mange gener i det menneskelig genom er en del af multigenfamilier. Og det samme gælder for HLA-gener. HLA-A, -B og -C er en del af genfamilien HLA klasse 1. Ud over de velkendte gener findes der dog også HLA-pseudogener og genfragmenter samt mulige ubeskrevne funktionelle gener, som sandsynligvis vil blive indfanget af de iboende specificitetsegenskaber ved analyser med hybrid indfangning. Det samlede antal af disse gener er ukendt, men det varierer for genomer fra forskellige personer.

For AlloSeq Tx indfanges specificiteten af "læsninger uden for området". Målet med AlloSeq Tx-analysen er at opnå en specificitet, hvormed:

1. Non-specifikke læsninger IKKE resulterer i mållæsninger i et antal, der er for lille til at kunne foretage en nøjagtig gentypebestemmelse.

2. Non-specifikke læsninger IKKE bidrager til konsensussekvensen for mål-loci.

3. En høj specificitet kompromitterer sensitiviteten, og nogle regioner i nogle alleler indfanges ikke.

AlloSeq Assign kan identificere non-specifikke læsninger/læsninger uden for området og vise dem i henhold til det samlede antal læsninger, der blev indfanget. Disse data bruges til kvalitetskontrol af analysens ydeevne. En for høj eller for lav specificitet kan være tegn på forkerte hybridiseringstemperaturer eller -tider eller problemer med reagens- og probekvaliteten.

Verifikationsdata har vist, at en specificitet helt ned til 12 % ikke har nogen indflydelse på analysen, og specificitetsværdierne ligger normalt mellem 64 og 92 %. Fuldstændig specificitet er usandsynligt og ville være tegn på mulige problemer med kvaliteten. Probedesignet gør sandsynligheden for at overse alleler lille, men forholdet mellem

sensitiviteten og specificiteten vil sandsynligvis være som beskrevet. Det vil sige, at en reduceret specificitet vil sikre fuldstændig sensitivitet, og alle alleler, herunder nye alleler, vil blive sekventeret.

1.11 Reproducerbarhed og repeterbarhed

Det er påvist, at AlloSeq Tx-produktet i kombination med AlloSeq Assign-softwaren, leverer ækvivalente resultater på tværs af batches i en verifikationsundersøgelse parti for parti, og på tværs af laboratorier, brugere og instrumenter, hvilket blev påvist ved verifikation og validering på fire eksterne centre. Det er verificeret, at AlloSeq Tx-produktet leverer tilsvarende resultater for den samme prøve ved gentagne kørsler.

1.12 Detektionsbegrænsning

Den anbefalede mængde af human genomisk DNA med høj molekylvægt er 100-1000 ng. Ved intern testning er det påvist, at prøver med DNA-input helt ned til 50 ng også kan bruges. Der blev også opnået korrekt gentypebestemmelse med DNA af dårlig kvalitet eller opdelt DNA.

1.13 Forudsætninger

- Instrumenterne skal kalibreres og vedligeholdelse korrekt efter behov i henhold til en vedligeholdelsesplan.
- Operative standardprocedurer skal være fastlagt og kontrolleres.
- Kittet skal anvendes af uddannet og autoriseret laboratoriepersonale.
- Reagenserne skal bruges inden den anførte udløbsdato.
- Reagenser fra forskellige kitbatches må IKKE bruges sammen. Det kan påvirke kittets ydeevne.
- Der må kun anvendes reagenser, der i dette dokument er anført som påkrævede men ikke indeholdt.
- Der skal udvises omhu for at undgå krydskontaminering af DNA-prøver eller forvekslinger af prøver.
- Der skal udvises omhu for at undgå spild i alle faser.
- Projektmappen, som leveres af producenten, skal bruges sideløbende med dette dokument.

1.14 Sikkerhed

Følg generel praksis for laboratoriesikkerhed og forebyggelse af kontaminering af rene rum, når denne procedure udføres. Takket være risikostyringsprocesserne hos CareDx Pty Ltd er alle risici reduceret til et acceptabelt niveau. Brugsanvisningen skal følges, herunder også de medfølgende projektmapper, for at forebygge farlige situationer. Dette kit indeholder farlige materialer. Se sikkerhedsdatabladene, og træf alle nødvendige forholdsregler i forbindelse med håndtering og bortskaffelse.

KITTETS KOMPONENTER	SYMBOL/PIKTOGRAMMER	SIKKERHEDSADVARSEL
TAGMENTATION BUFFER Indeholder N,N-dimethylformamid		**Signalord:** Fare **Faresætninger:** H319 – Forårsager alvorlig øjenirritation H332 – Farlig ved indånding H350 – Kan fremkalde kræft H360 – Kan skade forplantningsevnen eller det ufødte barn **Forsigtighedssætninger – EU (§28, 1272/2008)** P201 – Indhent særlige anvisninger før brug P202 – Anvend ikke produktet, før alle advarsler er læst og forstået P261 – Indånd ikke pulver/røg/gas/tåge/damp/spray P270 – Der må ikke spises, drikkes eller ryges under brugen af dette produkt P280 – Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse

KITTETS KOMPONENTER	SYMBOL/PIKTOGRAMMER	SIKKERHEDSADVARSEL
		P264 – Vask ansigtet, hænderne og blottet hud grundigt efter brug P272 – Tilsmudset arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen P308 + P313 – VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp P304 + P340 – VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og vedkommende hviler i en stilling, som letter vejrtrækningen P313 – Søg lægehjælp P305 + P351 + P338 – VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning P337 + P313 – Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp P405 – Opbevares under lås P501 – Indhold/beholder bortskaffes på et godkendt affaldsbortskaffelsesanlæg
PCR MIX Indeholder tetramethylammoniumklorid		**Signalord** Fare **Faresætninger** H302 – Farlig ved indtagelse H371 – Kan forårsage organskader H412 – Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger **Forsigtighedssætninger – EU (§28, 1272/2008)** P260 – Indånd ikke pulver/røg/gas/tåge/damp/spray P270 – Der må ikke spises, drikkes eller ryges under brugen af dette produkt P280 – Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse P264 – Vask ansigtet, hænderne og blottet hud grundigt efter brug P272 – Tilsmudset arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen P273 – Undgå udledning til miljøet P308 + P313 – VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp P301 + P312 – I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: I tilfælde af ubehag ring til en GIFTINFORMATION eller en læge P330 – Skyl munden P405 – Opbevares under lås P501 – Indhold/beholder bortskaffes på et godkendt affaldsbortskaffelsesanlæg
2N NaOH Indeholder natriumhydroxid		**Signalord** Fare **Faresætninger** H314 – Forårsager svære ætsninger af huden og øjenskader H318 – Forårsager alvorlig øjenskade **Forsigtighedssætninger – EU (§28, 1272/2008)** P260 – Indånd ikke pulver/røg/gas/tåge/damp/spray P264 – Vask ansigtet, hænderne og blottet hud grundigt efter brug P280 – Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse P301 + P330 + P331 – I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Skyl munden. Fremkald IKKE opkastning P303 + P361 + P353 – VED KONTAKT MED HUDEN (eller håret): Tilsmudset tøj tages straks af. Skyl/brus huden ved vand P363 – Tilsmudset tøj skal vaskes, før det kan anvendes igen P310 – Ring omgående til en GIFTINFORMATION eller en læge P304 + P340 – VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og vedkommende hviler i en stilling, som letter vejrtrækningen

KITTETS KOMPONENTER	SYMBOL/PIKTOGRAMMER	SIKKERHEDSADVARSEL
		P305 + P351 + P338 – VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning P405 – Opbevares under lås P501 – Indholdet/beholdere bortskaffes i overensstemmelse med de gældende lokale, regionale, nationale og internationale bestemmelser
CAPTURE BEADS Indeholder formamid		**Signalord** Fare **Faresætninger** H351 – Mistænkt for at fremkalde kræft H360 – Kan skade forplantningsevnen eller det ufødte barn H373 – Kan forårsage organskader ved længerevarende eller gentagen eksponering **Forsigtighedssætninger – EU (§28, 1272/2008)** P201 – Indhent særlige anvisninger før brug P202 – Anvend ikke produktet, før alle advarsler er læst og forstået P260 – Indånd ikke pulver/røg/gas/tåge/damp/spray P270 – Der må ikke spises, drikkes eller ryges under brugen af dette produkt P280 – Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse P264 – Vask ansigtet, hænderne og blottet hud grundigt efter brug P272 – Tilsmudset arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen P308 + P313 – VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp P405 – Opbevares under lås P501 – Indhold/beholder bortskaffes på et godkendt affaldsbortskaffelsesanlæg
HYBRIDISATION BUFFER 1 Indeholder formamid		**Signalord** Fare **Faresætninger** H351 – Mistænkt for at fremkalde kræft H360 – Kan skade forplantningsevnen eller det ufødte barn **Forsigtighedssætninger – EU (§28, 1272/2008)** P201 – Indhent særlige anvisninger før brug P202 – Anvend ikke produktet, før alle advarsler er læst og forstået P261 – Indånd ikke pulver/røg/gas/tåge/damp/spray P270 – Der må ikke spises, drikkes eller ryges under brugen af dette produkt P280 – Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse P264 – Vask ansigtet, hænderne og blottet hud grundigt efter brug P272 – Tilsmudset arbejdstøj bør ikke fjernes fra arbejdspladsen P308 + P313 – VED eksponering eller mistanke om eksponering: Søg lægehjælp P405 – Opbevares under lås P501 – Indhold/beholder bortskaffes på et godkendt affaldsbortskaffelsesanlæg
STOP BUFFER Indeholder natriumdodecylsulfat		**Signalord** Advarsel **Faresætninger** H319 – Forårsager alvorlig øjenirritation **Forsigtighessætninger – EU (§28, 1272/2008)** P264 – Vask ansigtet, hænderne og blottet hud grundigt efter brug

KITTETS KOMPONENTER	SYMBOL/PIKTOGRAMMER	SIKKERHEDSADVARSEL
		P280 – Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse P305 + P351 + P338 – VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning. P337 + P313 – Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp

BEMÆRK: BEMÆRK: Komponenten "Purification Beads" indeholder natriumazid (<0,1 %), hvilket ikke anses for at være en farlig koncentration i henhold til EU 1272/2008 (CLP/GHS), EU-direktiverne 1999/45/EF og 67/548/EØF eller US-OSHA (HCS 29 CFR 1910.1200) og FN's GHS-mærkning.

Nærmere oplysninger om alle farlige materialer i AlloSeq Tx-sættet kan findes i sikkerhedsdatabladet TEC478_AlloSeq Tx på adressen http://www.caredx.com.

2. Biblioteksforberedelse (Early Pooling-arbejdsgang)

2.0 Præsentation af protokollen

- Følg nedenstående AlloSeq Tx-protokollen i den viste rækkefølge ved brug af de anførte parametre.
- Inden du går i gang, skal du kontrollere kittets indhold og forsikre dig om, at du har de påkrævede forbrugsmaterialer og det påkrævede udstyr.
- For at lette anvendelsen er protokoltrinnene til bibliotheksklargøring også beskrevet i *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. Henvisninger til projektmappen i kapitel 2 vedrører denne projektmappe.

2.1 Prøveklargøring

1. Indtast et eksperiment-id, beskrivelse, operatør og datoen i projektmappen.
2. Vælg det AlloSeq-probesæt, der skal bruges til forsøget, fra rullemenuen i projektmappen.
3. Vælg den type sekventeringsinstrument, der skal bruges, fra rullemenuen i projektmappen. Så snart typen af sekventeringsinstrument er valgt, vises instruktionerne for sekventeringsinstrumentet i projektmappen.
4. Indtast id'et på de prøver, der skal testes, i den gule sektion af pladelayoutet i projektmappen i henhold til den ønskede konfiguration.

BEMÆRK: Du kan kun indtaste alfanumeriske tegn. Duplikerede prøve-id'er markeres med rød for at bede brugeren om at rette. Det er påkrævet af sekventeringsinstrumentets software kun at have unikke prøve-id'er på en kørsel. Undlad at indtaste oplysninger for brønde, som ikke skal indeholde nogen prøve.

5. Vælg det ønskede indeksindstilling i den orange rullemenu under Pladelayout.
6. Hvis påkrævet, og ved at bruge rørindeksformatet, kan i7-indeksrækkefølgen modificeres, vælg det alternative i7-indeks, som skal anvendes, blandt mulighederne i rullemenuen, for den påkrævede kolonne. Hvis duplikerede i7-indekser vælges, markeres cellerne med rød for at bede brugeren om at rette.
7. Hvis påkrævet, og ved at bruge rørindeksformatet, kan i5-indeksrækkefølgen modificeres, vælg det alternative i5-indeks, som skal anvendes, blandt mulighederne i rullemenuen, for den påkrævede række. Hvis duplikerede i5-indekser vælges, markeres cellerne med rød for at bede brugeren om at rette.
8. Så snart alle ovenstående handlinger er gennemført, skal du klikke på fanen 1.2 SampleSheet og gennemlæse. Rød tekst anvendes til at markere, hvor oplysninger stadig er påkrævede. Hvis ingen rød tekst viser sig, kan fanen SampleSheet gemmes som en CSV (komma-afgrænset) (*.csv). Gem filen som 'SampleSheet.csv'. At gemme i csv-format gemmer kun den aktive fane. Åbn den gemte SampleSheet.csv-fil i excel og slet enhver tom række i [Data]-tabellen, altså enhver række fra 22 til 117, som ikke indeholder prøveoplysninger. Så snart dette er gjort, gem filen. Så er prøvearket klar til at blive importeret til sekventering på et Illumina-sekventeringsinstrument.

2.2 Bibliotheksklargøring

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. prøve (µl)	Påkrævet klargøring
Tagmentation Buffer	-15 °C til -25 °C BOKS 1	10	Skal bringes op på stuetemperatur.
Sterilt vand	15°C til 30°C Leveres af brugeren	30	Ingen klargøring påkrævet.

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. prøve (µl)	Påkrævet klargøring
Tagmentation Beads	-15 °C til -25 °C BOKS 1	10	**Skal bringes op på stuetemperatur, mindst 30 minutter.**
Stop Buffer	15°C til 30°C BOKS 2	10	Ingen klargøring påkrævet.
Tagmentation Wash Buffer	15°C til 30°C BOKS 2	300	Ingen klargøring påkrævet.
PCR Mix (eller PCR Mix-1 til 96 kit)	-15 °C til -25 °C BOX 4 (eller Box 1 til PCR Mix-1)	20	Skal tøs op og opbevares på is. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**
Indekser: **ASTX17.1(24)-IVD:** H503, H505, H506, H517, H705, H706, H707, H710, H711, H714 **ASTX17.1(24)-B-IVD:** H502, H507, H508, H521, H701, H702, H703, H704, H712, H715 **ASTX17.1(96)-A-IVD/ASTX9.1(96)-A-IVD:** H503, H505, H506, H517, H502, H507, H508, H521, H705, H706, H707, H710, H711, H714, H701, H702, H703, H704, H712, H715 **ASTX17.1(96)-B-IVD/ASTX9.1(96)-B-IVD:** H510, H511, H513, H522, H515, H516, H518, H520, H716, H718, H719, H720, H721, H722, H723, H724, H726, H727, H728, H729	-15 °C til -25 °C BOKS 3	10 i alt	Skal tøs op og opbevares på is.

2. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
3. Stil den påkrævede plade med 96 brønde og semiskørt, Microseal B og mikrocentrifugeringsrørene på 1,5 ml klar.

BEMÆRK: Der er ikke noget sikkert stoppunkt før PCR-indekseringen. Processen tager cirka **1:50** timer (inklusive 50 minutters PCR-termocyklus).

4. For hver DNA-prøve skal 10 µl af prøven på 10-100 ng/µl alikvoteres i den passende brønd på en PCR-plade i henhold til pladelayoutet i arbejdsarket 1.0 Sample_Prep.
5. Klargør 40 µl Tagmentation Master Mix pr. prøve ved brug af 10 µl Tagmentation Buffer, 20 µl sterilt vand og 10 µl Tagmentation Beads.
6. Bland ovenstående master mix i en vortexmixer og derefter i en rotator.
7. 40 µl af Tagmentation Master Mix pipetteres i hver brønd, der indeholder en DNA-prøve.
8. Forsegl pladen med Microseal B-film.
9. Pladen skal centrifugeres ved 100 x g i 10 sekunder for at indsamle alle reagenser i bunden af brønden.
10. Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 1 minut.
11. Foretag en visuel kontrol af pladen:
    a) Hvis perlerne ikke er fordelt jævnt i brønden, gentages rysteproceduren i henhold til trin 10.
    b) Hvis materialet ikke er i bunden af brønden, eller hvis der er stænk af materialet på Microseal B-filmen, skal den anbringes i rotatoren, og rysteproceduren fra trin 10 skal gentages.

12. Anbring pladen i en thermocycler, og kør Tagmentation-programmet med låget opvarmet til 105 °C og en reaktionsvolumen på 50 µl:

Temperatur	Tid
55 °C	5 minutter
10°C	2 minutter

13. Når programmet er afsluttet, skal pladen omgående tages ud af thermocycleren og stå ved stuetemperatur i 2 minutter.
14. Fjern Microseal B-filmen.
15. Tilsæt 10 µl Stop Buffer til hver reaktionsbrønd.
16. Forsegl pladen igen med ny Microseal B-film.
17. Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 1 minut.
18. Inkubér pladen i 5 minutter mere ved stuetemperatur.
19. Under inkubationen tages PCR Mix og indekser ud af fryseren, så de kan tø op, hvorefter de anbringes på is/i et koldt stativ.
20. Foretag en visuel kontrol af pladen. Hvis materialet ikke er i bunden af brønden, eller hvis der er stænk af materialet på Microseal B-filmen, anbringes pladen i rotatoren.
21. Skyl tre gange med Tagmentation Wash Buffer, som beskrevet nedenfor:
    a) Fjern Microseal B-filmen, og anbring pladen i Magnetic Stand-96 i 30 sekunder, så perlerne samles i brøndene langs magneten.
    b) Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i brøndene langs magneten.
    c) Tilsæt langsom 100 µl Tagmentation Wash Buffer til hver brønd.
    d) Forsegl pladen igen med ny Microseal B-film. Sørg for, at filmen er fastgjort korrekt.
    e) Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 2 minutter ved stuetemperatur.
    f) **FORSIGTIG:** Hvis der er stænk af prøverne på forseglingen, skal de centrifugeres ved 100 x g i 10 sekunder, inden forseglingen fjernes.
    g) Gentag trin a) til f) to gange mere, så der udføres 3 skylninger i alt.

BEMÆRK: Klargør PCR-masterblandingen som beskrevet nedenfor, inden supernatanten fra tredje skylning bortskaffes.

22. Klargør 40 µl PCR-masterblanding ved brug af 20 µl sterilt vand og 20 µl PCR Mix. (eller PCR Mix-1 hvis der bruges 96 testkit).

BEMÆRK: PCR Mix anvendes til efterfølgende trin i protokollen. Du må ikke bortskaffe dette hætteglas.

23. Fjern Microseal B-filmen, og anbring pladen i Magnetic Stand-96 i 30 sekunder, så perlerne samles i brøndene langs magneten.
24. Brug en pipette, der er indstillet til 100 µl, til at aspirere og bortskaffe supernatanten fra den endelige Tagmentation-skylning.
25. Fjern pladen fra magnetstativet.
26. Tilsæt 40 µl af PCR-masterblandingen til hver brønd.
27. Forsegl pladen med Microseal B-film.
28. Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 2 minutter ved stuetemperatur.
29. Pladen skal centrifugeres ved 100 x g i 10 sekunder for at sikre, at alle perler er opslæmmet i PCR-masterblandingen.

Til indeksrør (T),

30. (T) Kør indeksrørene i en vortexmixer og en rotator for at sikre, at hele volumenet er i bunden af røret.
31. (T) Fjern Microseal B-filmen fra prøvepladen.
32. (T) Tilsæt 5 µl i7-indeks til hver brønd i henhold til pladelayoutet på arbejdsarket 1.0 Sample_Prep.
33. (T) Tilsæt 5 µl i5-indeks til hver brønd i henhold til pladelayoutet på arbejdsarket 1.0 Sample_Prep.

Fortsæt til trin 34.

Til indeksplade (P),

30. (P) Bland med pladerysteren for at blande indekspladen ved 1800 o/min. i 1 minut.
31. (P) Indekspladen skal centrifugeres ved 100 x g i 10 sekunder for at sikre at hele volumenet er i bunden af brønden.
32. (P) Fjern Microseal B-filmen fra prøvepladen.
33. (P) **Bekræft den korrekte orientering af pladen og det korrekte indekssæt. Skræl ikke folieforseglingen af.** Gennembor indekspladens folieforsegling med en spids. Med en ny spids overføres 10 µl af de kombinerede indekser fra indekspladen til hver prøvebrønd i henhold til pladelayoutet på 1.0 Sample_Prep-arket.
Fortsæt til trin 34.

34. Forsegl med ny Microseal B-film.
35. Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 1 minut ved stuetemperatur.
36. Pladen skal centrifugeres ved 100 x g i 10 sekunder for at indsamle alle reagenser i bunden af brønden. Foretag en visuel kontrol for at sikre, at perlerne stadigvæk er jævnt fordelt i opløsningen. Hvis perlerne ikke er fordelt jævnt, gentages rysteproceduren i henhold til trin 35.
37. Anbring pladen i en thermocycler, og kør Indexing PCR-programmet med låget opvarmet til 105 °C og en reaktionsvolumen på 50 µl:

Nr.	Trin	Temperatur	Tid	Antal cyklusser
1	Udfyldning	72°C	3 minutter	1
2	Indledende denaturering	98°C	3 minutter	1
3	Denaturering	98°C	20 sekunder	9
4	Hybridisering	60°C	30 sekunder	
5	Ekstension	72°C	3 minutter	
6	Endelig ekstension	72°C	3 minutter	1
7	Endelig holdetid	10°C	Holdetid	1

BEMÆRK: Sikkert stoppunkt. Bibliotekerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 uge.

BEMÆRK: Hvis der fortsættes med størrelsesvalg og rensning med det samme skal de sikres, at de anvendte Purification Beads bringes op på stuetemperatur før brug.

2.3 Størrelsesvalg og rensning

1. For optimalt volumen- og størrelsesvalg varieres prøven, perlen og ovenstående volumen afhængigt af kørselsstørrelses. Tabellen nedenfor beskriver volumenerne, som er testede for det angivne prøvesortiment per kørsel.

Reagensvolumen til beregninger	6 - 24 Prøver/samling	25 - 48 Prøver/samling	49 - 96 Prøver/samling
Antal prøver, der skal samles (maks.-angivet for intervaller)	24	48	96
Biblioteksvolumen, der skal samles per prøve (µl)	10	5	2.5
Volumen af fortyndede perler, der skal samles per prøve (µl)	50	25	12.5
Overførselsvolumen af supernatant per prøve (µl)	55	27.5	13.75
Volumen af fine perler per prøve, trin 8 (µl)	4.4	2.2	1.1

2. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. prøve (µl)	Påkrævet klargøring
Purification Beads (Purification Beads – 1 til 96 testkit)	2 °C til 8 °C BOKS 5	24.7	Skal bringes op på stuetemperatur, mindst 30 minutter. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**
Sterilt vand	15°C til 30°C Leveres af brugeren	Varieret	Ingen klargøring påkrævet.
100 % ætanol	15°C til 30°C Leveres af brugeren	1920	Klargør 80 % ætanol, som beskrevet nedenfor.
Resuspension Buffer	2°C til 8°C BOKS 5	Varieret	Skal bringes op på stuetemperatur. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**

3. Klargør fortyndede Purification Beads med Purification Beads og sterilt vand med volumener beregnet af *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD***.** Sørg for, at Purification Beads vortexblandet grundigt før brug.
4. Klargør 2400 µl frisk 80 % ætanol pr. prøve, som er tilstrækkeligt til 2 skylninger, ved brug af 1920 µl 100 % ætanol og 480 µl sterilt vand.

BEMÆRK: Antallet af samlinger per eksperiment er forudindstillet til 1 i den gule celle i trin 3 i projektmappen. Dette kan overskrives manuelt, hvis påkrævet. Modificering af denne celle opdaterer antallet af samlinger for efterfølgende trin af denne protokol/projektmappe. Hvis mere end 1 samling skal udføres på dette eksperiment med det samme antal prøver per samling, bør volumenen af Purification Beads tilsvarende øges (dvs. fordoblet ved to samlinger), og instruktionerne nedenfor bør udføres i fuld udstrækning for hver samling.

Hvis flere samlinger med forskellige antal prøver er påkrævet, bør denne fane i projektmappen duplikeres og cellerne med gul opdateres for at stemme overens med antallet af prøver, så volumenerne af påkrævet/overført reagens tilpasses korrekt. For at duplikere fanen skal du højreklikke på enhver fane og vælge 'Flyt eller kopiér', vælge '3.0 SS_Purification' fra listen, krydse feltet 'Opret kopi' af og klikke på 'OK'.

5. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
6. Saml 1,5 ml-rør (**valgfrit:** 2 ml-rør kan anvendes, hvis foretrukket, med øget volumen af ætanolskyllemiddel fra 1200 µl til 1500 µl i trin 20a nedenfor).

BEMÆRK: Processen tager cirka **1** time.

7. Alikvoter et passende volumen (se beregningstabellen ovenfor eller projektmappen) af fortyndede Purification Beads i 1,5 ml-røret.
8. Bland tagmentation beads og supernatanten fra indekserings-PCR med pipette, **eller** ryst indekserings-PCR-pladen i 1 minut ved 1800 o/min., og tilsæt derefter et passende volumen af hver prøve (se beregningstabellen ovenfor eller projektmappen) til røret, der indeholder fortyndede Purification Beads.
9. Vortexbland hvert rør ved høj fart i 10 sekunder, indtil prøven fremstår homogen ved synsinspektion.
10. Inkuber ved stuetemperatur i 5 minutter. Under denne inkubation binder de største fragmenter sig til perlerne.
11. Kør røret hurtigt i en rotator.
12. Anbring røret på magneten i 2,5 minut, så perlerne samles langs magneten. Hvis supernatanten forbliver uklar, lad den forblive på magneten, indtil den er klar.
13. **Overfør** et passende volumen (se beregningstabellen ovenfor eller projektmappe) af supernatanten til et nyt rør.
14. Tilfør et passende volumen (se beregningstabellen ovenfor eller projektmappen) af Purification Beads til røret, der indeholder supernatanten.

15. Kør hvert rør i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder.
16. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter. Under denne inkubation binder fragmenterne med målstørrelsen sig til perlerne.
17. Kør røret hurtigt i en rotator.
18. Anbring røret på magneten i 2,5 minut, så perlerne samles langs magneten. Hvis supernatanten forbliver uklar, lad den forblive på magneten, indtil den er klar.
19. Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
20. Hold røret på magneten, og skyl to gange med 80 % ætanol:
    a) Tilsæt 1200 µl 80 % ætanol til hvert rør.
    b) Inkubér ved stuetemperatur i 30 sekunder.
    c) Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe al supernatanten.
    d) Gentag trin a) til c), så der udføres 2 skylninger i alt.
21. Fjern al den resterende supernatant med en P20-pipette.
22. Lufttør røret i 5 minutter ved stuetemperatur, så eventuelle ætanolrester fordamper.
23. Tag røret af magneten, og tilsæt 37 µl Resuspension Buffer til hvert rør for at eluere målfragmenterne.
24. Kør hvert rør i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder.
25. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
26. Kør røret hurtigt i en rotator.
27. Anbring røret på magneten i 30 sekunder, så perlerne samles i røret langs magneten.
28. **Overfør** 35 µl ovenstående væske til et nyt rør på 1,5 ml med henblik på opbevaring. Denne samling kan fortsætte til hybridisering.

BEMÆRK: Sikkert stoppunkt. Bibliotekerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 måned.

2.4 Qubit-kvantificering (valgfrit)

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
Qubit BR-buffer	-25°C til 30°C Leveres af brugeren	199	Ingen klargøring påkrævet.
Qubit BR-farvestof	-25 °C til 30 °C Leveres af brugeren	1	Ingen klargøring påkrævet.
BR-standard nr. 1	2°C til 8°C Leveres af brugeren	10	Skal bringes op på stuetemperatur.
BR-standard nr. 2	2°C til 8°C Leveres af brugeren	10	Skal bringes op på stuetemperatur.

2. Stil de påkrævede Qubit-rør og rør på 1,5 ml eller 5 ml til klargøring af arbejdsopløsningen klar, afhængigt af den påkrævede volumen.
3. Klargør to prøverør til standarderne og ét til hver pool. prøve
4. Klargør 200 µl Qubit-arbejdsopløsning ved brug af 199 µl Qubit-buffer og 1 µl Qubit-farvestof for hver prøve/standard, der skal kvantificeres.
5. Kør arbejdsopløsningen i en vortexmixer i 2-3 sekunder og derefter i en rotator.
6. **190 µl** af arbejdsopløsningen alikveres i hvert af standardrørene.
7. **198 µl** af arbejdsopløsningen alikveres i hvert af poolrørene. prøve
8. **10 µl** af standardopløsningen alikveres i hvert af de pågældende standardrør.
9. **2 µl** af hver pool alikveres i det pågældende rør.
10. Alle rør køres i en vortexmixer i 2-3 sekunder og derefter i en rotator.

11. Inkubér rørene i 2 minutter ved stuetemperatur.
12. Indsæt rørene i Qubit Fluorometeret, og foretag aflæsning (se Qubit-fabrikantens protokol for nærmere oplysninger).
13. Dokumenter Qubit-aflæsningerne i tabellen i projektmappen for at beregne gennemsnittet pr. prøve.

BEMÆRK: Den forventede volumen af hvert bibliotek er cirka 30 - 100 ng/µl, men det kan variere afhængigt af DNA-kvaliteten og inputtet. Et volumen på 10 ng/µl eller derover forventes at give tilfredsstillende berigelsesresultater.

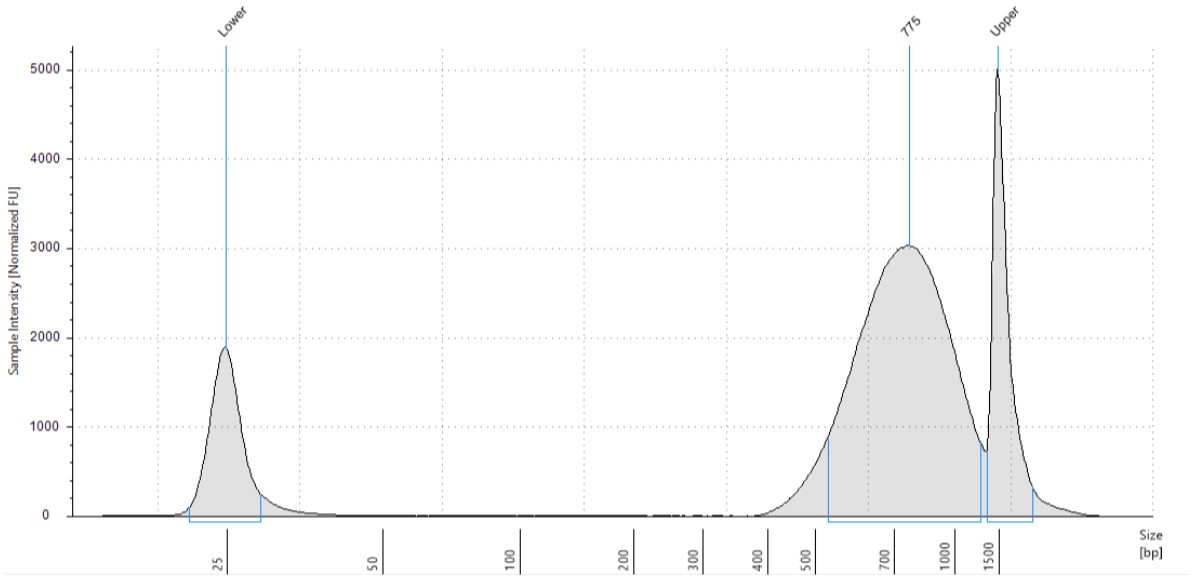
2.5 TapeStation-visualisering (valgfrit)

BEMÆRK: Alternative systemer til fragmentvisualisering såsom Fragment Analyzer, Bioanalyzer eller tilsvarende kan bruges, når brugeren har valideret anvendelsen.

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. prøve (µl)	Påkrævet klargøring
D1000 Ladder	2°C til 8°C Leveres af brugeren	1	Skal bringes op på stuetemperatur.
D1000 Sample Buffer	2°C til 8°C Leveres af brugeren	3	Skal bringes op på stuetemperatur.

2. Indsaml den påkrævede D1000 ScreenTape, samt TapeStation optiske rørstrimler og -hætter.
3. Overfør 1 µl af hver prøve til et nyt rør.
4. Tilsæt 1 µl D1000 Ladder til et referencerør.
5. Tilsæt 3 µl D1000 Sample Buffer til hvert prøverør og referencerør.
6. Forsegl alle rør med hætter.
7. Vortexbland alle rør grundigt med IKA-vortex ved 2000 o/min. i 1 minut.
8. Centrifugeres kort for at sikre, at alle prøver er i bunden af rørene.
9. Fjern hætten og indlæs prøverøret i 2200 TapeStation-instrumentet.
10. Vælg de påkrævede rør i 2200 TapeStation-styreenhedens software, og kør prøverne (se brugervejledningen til TapeStation for nærmere oplysninger).
11. Når kørslen er afsluttet, skal TapeStation-analysesoftwaren startes for at få vist resultaterne (se brugervejledningen til TapeStation for nærmere oplysninger).
12. Dokumentér resultaterne i projektmappen.



Figur 2.5.1: Repræsentativt billede af TapeStation-diagram for biblioteker.

3. Hybrid indfangning (Early Pooling-arbejdsgang)

3.0 Præsentation af protokollen

- Følg nedenstående AlloSeq Tx-protokollen i den viste rækkefølge ved brug af de anførte parametre.
- Inden du går i gang, skal du kontrollere kittets indhold og forsikre dig om, at du har de påkrævede forbrugsmaterialer og det påkrævede udstyr.
- For at lette anvendelsen er protokoltrinnene til hybrid indfangning også beskrevet i *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. Henvisninger til projektmappen i kapitel 3 vedrører denne projektmappe.

3.1 Hybridisering af prøverne

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
AlloSeq Tx Probe Panel	-15 °C til -25 °C BOKS 4	10	Skal bringes op på stuetemperatur.
Hybridisation Buffer 1	-15 °C til -25 °C BOKS 4	50	Anbringes i Hybex ved 58 °C i 15 minutter. Køres i en vortexmixer. Foretag derefter en visuel kontrol. Hvis der stadigvæk er udfældning, inkuberes ved 58 °C i yderligere 15 minutter.
Hybridisation Buffer 2	2°C til 8°C BOKS 5	10	Skal bringes op på stuetemperatur.

2. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
3. Stil de påkrævede PCR-rør/PCR-strimler og hætter klar.

BEMÆRK: Der er ikke noget sikkert stoppunkt, for indfangningsprotokollen er gennemført. Poolede prøver skal føres direkte fra holdetrinnet ved 62 °C i hybridiseringsreaktionen i thermocycleren til perleindfangningstrinnene og de opvarmede skylletrin.

BEMÆRK: Klargøringen af processen tager cirka 20 minutter, og det kræver minimum 1,5 timer og maksimalt 18 timer i thermocycleren (reaktioner, der står natten over, eller i op til 18 timer, skal holdes ved en temperatur på 62 °C på det endelige reaktionstrin).

4. For hver hybridiseringsreaktion skal følgende reagenser kombineres i den rækkefølge, der er anført nedenfor, i et PCR-rør/på en PCR-strimmel:

Reagens	Volumen pr. pool (µl)
Poolede prøvebiblioteker	30
AlloSeq Tx Probe Panel	10
Hybridisation Buffer 1	50
Hybridisation Buffer 2	10
I alt	100

5. Med en pipette, der er indstillet til 70 µl blandes hver hybridiseringsreaktionsbrønd 10 gange, hætten påsættes og derefter køres den i en rotator.
6. Hvis opløsningen stadigvæk er uklar, foretages der pipetteblanding 6-8 gange, hætten påsættes og derefter køres den i en rotator
7. Anbring røret/strimlen i en thermocycler, og kør Hybridisation-programmet med låget opvarmet til **100 °C** og en reaktionsvolumen på 100 µl:

Nr.	Trin	Temperatur	Tid	Antal cyklusser
1	Denaturering	98°C	5 minutter	1
2	Reduktion	98 °C - 62 °C, aftagende med 2 °C/cyklus	1 minut	1
3	Gå til trin 2 med henblik på 18 cyklusser mere (19 cyklusser i alt), hvor temperaturen reduceres med 2 °C/cyklus.			
4	Hybridisering	62°C	**60 minutter**	1
5	Endelig holdetid	62°C	Hold (må ikke overskride 18 timer ved 62 °C, inklusive trin 4)	1

8. Lad røret/strimlen forblive i termocycleren, indtil du er klar til at udføre indfangningen. Sørg for, at de anvendte Capture Beads, har stuetemperatur, og at den anvendte Capture Wash Buffer og Hybex er varmet op til 58 °C.

3.2 Indfangning

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
Capture Beads	2°C til 8°C BOKS 5	250	**Skal bringes op på stuetemperatur, mindst 30 minutter.**
Capture Wash Buffer	-15 °C til -25 °C BOKS 4	800	**Forvarmes til 58 °C før brug.**
Capture Elution Buffer 1	-15 °C til -25 °C BOKS 4	28.5	Skal bringes op på stuetemperatur.
2N NaOH	-15 °C til -25 °C BOKS 4	1.5	Skal bringes op på stuetemperatur. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**
Capture Elution Buffer 2	2°C til 8°C BOKS 5	4	Skal bringes op på stuetemperatur.

2. Klargør en elueringsmasterblanding bestående af følgende reagenser pr. pool, der skal indfanges:

Reagens	Volumen pr. pool (µl)
Capture Elution Buffer 1	28.5
2N NaOH (frisk)	1.5

BEMÆRK: NaOH-opløsningen absorberer CO_2 fra atmosfæren, hvilket ændrer reagensets pH-værdi og ydeevne. Sørg for, at røret med 2N NaOH er lukket, når det ikke er i brug.

3. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
4. Stil de påkrævede mikrocentrifugeringsrør på 1,5 ml, PCR-rør/PCR-strimler og hætter klar.

BEMÆRK: Denne proces tager cirka **1** time.

5. For hver hybridiseringsreaktion tilsættes 250 µl Capture Beads til et nyt rør på 1,5 ml.
6. **Overfør** 100 µl af hver hybridiseringsreaktion til det pågældende rør med Capture Beads.
7. Kør røret i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder. Må ikke centrifugeres eller køres i en rotator.
8. Inkubér røret ved 58 °C i Hybex i 15 minutter.
9. Kør røret hurtigt i en rotator.
10. Anbring omgående røret på magneten i 30 sekunder, så perlerne samles langs magneten.
11. Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
12. Skyl tre gange med opvarmet Capture Wash Buffer, som beskrevet nedenfor:

BEMÆRK: Capture Wash Bufferen skal opbevares i Hybex, når den ikke er i brug, for at holde temperaturen på 58 °C. Tage den først ud af Hybex, lige før den tilsættes til reaktionen i trin 12b og 14. Arbejd hurtigt under udførelsen af de opvarmede skylletrin for at minimere den tid prøvepoolen/bufferen tilbringer ved stuetemperatur.

a) Fjern røret fra magneten.
b) Tilsæt 200 µl opvarmet Capture Wash Buffer (58 °C).
c) Kør røret i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder. Må ikke centrifugeres eller køres i en rotator.
d) Inkubér røret ved 58 °C i Hybex i 5 minutter.
e) Kør i en rotator, og anbring derefter omgående røret på magneten i 30 sekunder, så perlerne samles langs magneten.
f) Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
g) Gentag trin a) til f) to gange mere, så der udføres 3 skylninger i alt.

13. Fjern røret fra magneten.
14. Tilsæt 200 µl opvarmet Capture Wash Buffer (58 °C).
15. Kør røret i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder. Må ikke centrifugeres eller køres i en rotator.
16. **Overfør** hele indholdet (skylleopløsningen og perlerne) til et nyt rør på 1,5 ml.

BEMÆRK: Dette overførselstrin er vigtigt med henblik på fjernelse af PCR-inhibitorer, som kan påvirker den senere ydeevne.

17. Inkubér røret ved 58 °C i Hybex i 5 minutter.
18. Kør omgående i en rotator, og anbring derefter røret på magneten i 30 sekunder, så perlerne samles langs magneten.
19. Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
20. Kør røret hurtigt i en rotator, og anbring derefter omgående røret på magneten i 30 sekunder, så perlerne samles langs magneten.
21. Brug en P20-pipette til at aspirere og bortskaffe resterende supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
22. Kør den elueringsmasterblanding, der blev klargjort ovenfor, i en vortexmixer, og fjern derefter reaktionsrøret fra magneten, og tilsæt 23 µl af elueringsmasterblandingen til hvert rør.
23. Kør røret i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder.
24. Inkubér ved stuetemperatur i 2 minutter.
25. Kør røret hurtigt i en rotator.
26. Anbring røret på magneten i 30 sekunder, så perlerne samles langs magneten.
27. **Overfør** 21 µl supernatant til et nyt PCR-rør/en ny PCR-strimmel.
28. Tilsæt 4 µl Capture Elution Buffer 2.
29. Foretag pipetteblanding 6-8 gange. Den endelige volumen er 25 µl.

BEMÆRK: Sikkert stoppunkt. Bibliotekerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 24 timer.

3.3 PCR efter berigelse

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
PCR Primers	-15 °C til -25 °C BOKS 4	5	Optøs på is. Blandes ved invertering, og centrifugeres derefter kort.
PCR Mix (eller PCR Mix-2 til 96 testkit)	-15 °C til -25 °C BOKS 4	20	Optøs ved stuetemperatur og stilles derefter på is.

2. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
3. Stil de påkrævede PCR-rør med de indfangede biblioteker fra trin 3.2 Indfangning klar.

BEMÆRK: Klargøringen af denne processen tager cirka 5 minutter og kræver **1:40** timer i en thermocycler.

4. Tilsæt 5 µl PCR Primers til de indfangede biblioteker i PCR-røret.
5. Tilsæt 20 µl PCR Mix til røret.
6. Foretag pipetteblanding 10 gange.
7. Kør røret hurtigt i en rotator.
8. Anbring røret/strimlen i termocycleren, og kør PCR-programmet efter berigelse med låget opvarmet til 105 °C og en reaktionsvolumen på 50 µl:

Nr.	Trin	Temperatur	Tid	Antal cyklusser
1	Denaturering	98°C	30 sekunder	1
2	Denaturering	98°C	1 minut	17
3	Hybridisering	60°C	30 sekunder	
4	Ekstension	72°C	3 minutter	
5	Endelig ekstension	72°C	5 minutter	1
6	Endelig holdetid	10°C	Holdetid	1

BEMÆRK: Sikkert stoppunkt. Bibliotekerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 uge.
BEMÆRK: Hvis der fortsættes med rensning med det samme skal de sikres, at de anvendte Purification Beads bringes op på stuetemperatur før brug.

3.4 Rensning af PCR efter berigelse

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
Purification Beads (Purification Beads-2 til 96 kit)	2 °C til 8 °C BOKS 5	27	Skal bringes op på stuetemperatur, mindst 30 minutter.
Sterilt vand	15°C til 30°C Leveres af brugeren	80	Ingen klargøring påkrævet.
100 % ætanol	15°C til 30°C Leveres af brugeren	320	Klargør 80 % ætanol, som beskrevet nedenfor.
Resuspension Buffer	2°C til 8°C BOKS 5	32	Skal bringes op på stuetemperatur. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**

2. Klargør frisk 80 % ætanol (2 skylninger per samling) med 480 µl 100 % ætanol og 120 µl steril vand (en overskydende volumen er inkluderet).
3. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
4. Stil de påkrævede mikrocentrifugeringsrør på 1,5 ml klar.

BEMÆRK: Processen tager cirka **30** minutter.

5. For hver rensningsreaktion tilsættes 27 µl grundigt vortexblandede Purification Beads til et nyt rør på 1,5 ml.
6. **Overfør** 45 µl af hver PCR-reaktion efter berigelse til det pågældende rør med Purification Beads.
7. Kør hvert rør i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder.
8. Kør røret hurtigt i en rotator.
9. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
10. Anbring røret på magneten i 30 sekunder, så perlerne samles langs magneten.
11. Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
12. Hold røret på magneten, og skyl to gange med 80 % ætanol:
    a) Tilsæt 200 µl 80 % ætanol til hvert rør.
    b) Inkubér ved stuetemperatur i 30 sekunder.
    c) Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe al supernatanten.
    d) Gentag trin a) til c), så der udføres 2 skylninger i alt.
13. Fjern al den resterende supernatant med en P20-pipette.
14. Lufttør røret i 5 minutter ved stuetemperatur, så eventuelle ætanolrester fordamper.
15. Tag røret af magneten, og tilsæt 32 µl Resuspension Buffer til hvert rør med henblik på eluering af målfragmenterne.
16. Kør hvert rør i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder.
17. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
18. Kør røret hurtigt i en rotator.
19. Anbring røret på magneten i 30 sekunder, så perlerne samles i røret langs magneten.
20. **Overfør** 30 µl supernatant til et nyt rør på 1,5 ml med henblik på opbevaring.

BEMÆRK: Sikkert stoppunkt. Bibliotekerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 måned.

3.5 Qubit-kvantificering

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
Qubit BR-buffer	-25°C til 30°C Leveres af brugeren	199	Ingen klargøring påkrævet.
Qubit BR-farvestof	-25 °C til 30 °C Leveres af brugeren	1	Ingen klargøring påkrævet.
BR-standard nr. 1	2°C til 8°C Leveres af brugeren	10	Skal bringes op på stuetemperatur.
BR-standard nr. 2	2°C til 8°C Leveres af brugeren	10	Skal bringes op på stuetemperatur.

2. Stil de påkrævede Qubit-rør og rør på 1,5 ml eller 5 ml til klargøring af arbejdsopløsningen klar, afhængigt af den påkrævede volumen.
3. Klargør to prøverør til standarderne og ét til hver pool.
4. Klargør 200 µl Qubit-arbejdsopløsning ved brug af 199 µl Qubit-buffer og 1 µl Qubit-farvestof for hver prøve/standard, der skal kvantificeres.
5. Kør arbejdsopløsningen i en vortexmixer i 2-3 sekunder og derefter i en rotator.
6. **190 µl** af arbejdsopløsningen alikveres i hvert af standardrørene.
7. **198 µl** af arbejdsopløsningen alikveres i hvert af poolrørene.
8. **10 µl** af standardopløsningen alikveres i hvert af de pågældende standardrør.
9. **2 µl** af hver pool alikveres i det pågældende rør.
10. Alle rør køres i en vortexmixer i 2-3 sekunder og derefter i en rotator.
11. Inkubér rørene i 2 minutter ved stuetemperatur.

12. Indsæt rørene i Qubit Fluorometeret, og foretag aflæsning (se Qubit-fabrikantens protokol for nærmere oplysninger).
13. Dokumentér Qubit-aflæsningerne i tabellen i projektmappen for at beregne den gennemsnitlige koncentration.

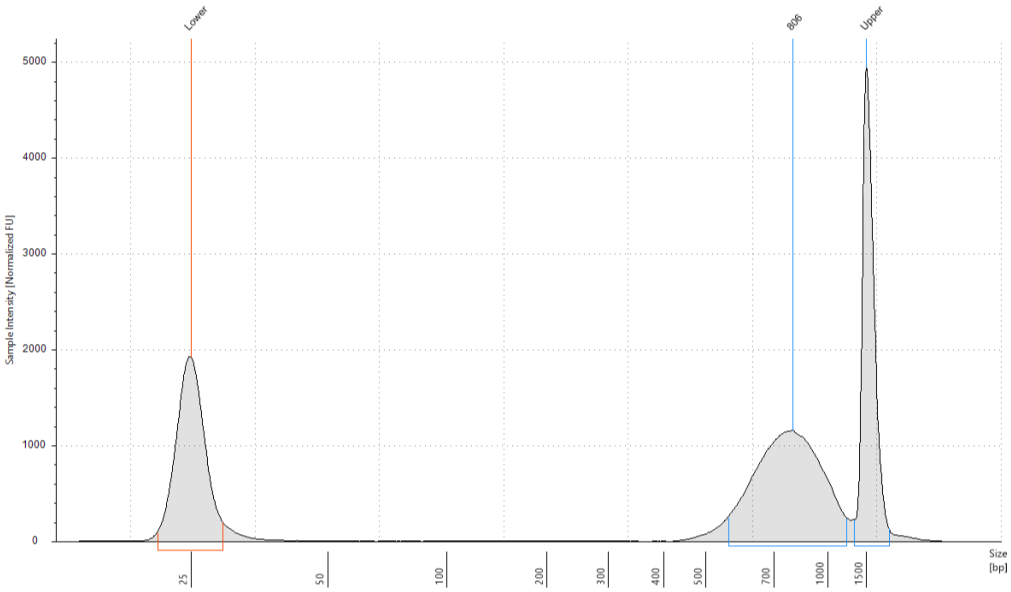
3.6 TapeStation-visualisering (valgfrit)

BEMÆRK: Alternative systemer til fragmentvisualisering såsom Fragment Analyzer, Bioanalyzer eller tilsvarende kan bruges, når brugeren har valideret anvendelsen.

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
D1000 Ladder	2°C til 8°C Leveres af brugeren	1	Skal bringes op på stuetemperatur.
D1000 Sample Buffer	2°C til 8°C Leveres af brugeren	3	Skal bringes op på stuetemperatur.

2. Indsaml det påkrævede D1000 ScreenTape, samt TapeStation optiske rørstrimler og -hætter.
3. Overfør 1 µl af hver pool til et nyt rør.
4. Tilsæt 1 µl D1000 Ladder til et referencerør.
5. Tilsæt 3 µl D1000 Sample Buffer til hver pool og referencerør.
6. Forsegl alle rør med hætter.
7. Vortexbland alle rør grundigt med IKA-pladevortex ved 2000 o/min. i 1 minut.
8. Centrifugeres kort for at sikre, at alle prøver er i bunden af rørene.
9. Fjern hætten og indlæs prøverøret i 2200 TapeStation-instrumentet.
10. Vælg de påkrævede rør i 2200 TapeStation-styreenhedens software, og kør prøverne (se brugervejledningen til TapeStation for nærmere oplysninger).
11. Når kørslen er afsluttet, skal TapeStation-analysesoftwaren startes for at få vist resultaterne (se brugervejledningen til TapeStation for nærmere oplysninger).
12. Dokumentér resultaterne i tabellen i projektmappen.



Figur 3.6.1: Repræsentativt billede af TapeStation-diagram for den endelige berigede bibliotekspool.

4. Library Preparation (original arbejdsgang)

4.0 Præsentation af protokollen

- Følg nedenstående AlloSeq Tx-protokollen i den viste rækkefølge ved brug af de anførte parametre.
- Inden du går i gang, skal du kontrollere kittets indhold og forsikre dig om, at du har de påkrævede forbrugsmaterialer og det påkrævede udstyr.
- For at lette anvendelsen er protokoltrinnene til bibliotheksklargøring også beskrevet i *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD*. Henvisninger til projektmappen i kapitel 4 vedrører denne projektmappe.

4.1 Prøveklargøring

1. Indtast et eksperiment-id, beskrivelse, operatør og datoen i projektmappen.
2. Vælg det AlloSeq-probesæt, der skal bruges til forsøget, fra rullemenuen i projektmappen.
3. Vælg den type sekventeringsinstrument, der skal bruges, fra rullemenuen i projektmappen.
4. Indtast id'et på de prøver, der skal testes, i den gule sektion af pladelayoutet i projektmappen i henhold til den ønskede konfiguration.

BEMÆRK: Du kan kun indtaste alfanumeriske tegn. Duplikerede prøve-id'er markeres med rød for at bede brugeren om at rette. Det er påkrævet af sekventeringsinstrumentets software kun at have unikke prøve-id'er på en kørsel. Undlad at indtaste oplysninger for brønde, som ikke skal indeholde nogen prøve.

5. Vælg den ønskede indeksindstilling i den orange rullemenu under Pladelayout i projektmappen.
6. Hvis påkrævet, og ved at bruge rørindeksformatet, kan i7-indeksrækkefølgen modificeres, vælg det alternative i7-indeks, som skal anvendes, blandt mulighederne i rullemenuen, for den påkrævede kolonne. Hvis duplikerede i7-indekser vælges, markeres cellerne med rød for at bede brugeren om at rette.
7. Hvis påkrævet, og ved at bruge rørindeksformatet, kan i5-indeksrækkefølgen modificeres, vælg det alternative i5-indeks, som skal anvendes, blandt mulighederne i rullemenuen, for den påkrævede række. Hvis duplikerede i5-indekser vælges, markeres cellerne med rød for at bede brugeren om at rette.
8. Så snart alle ovenstående handlinger er gennemført, skal du klikke på fanen 1.2 SampleSheet og gennemlæse. Rød tekst anvendes til at markere, hvor oplysninger stadig er påkrævede. Hvis ingen rød tekst viser sig, kan fanen SampleSheet gemmes som en CSV (komma-afgrænset) (*.csv). Gem filen som 'SampleSheet.csv'. At gemme i csv-format gemmer kun den aktive fane. Åbn den gemte SampleSheet.csv-fil i excel og slet enhver tom række i [Data]-tabellen, altså enhver række fra 22 til 117, som ikke indeholder prøveoplysninger. Så snart dette er gjort, gem filen. Så er prøvearket klar til at blive importeret til sekventering på et Illumina-sekventeringsinstrument.

4.2 Bibliotheksklargøring

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. prøve (µl)	Påkrævet klargøring
Tagmentation Buffer	-15 °C til -25 °C BOKS 1	10	Skal bringes op på stuetemperatur.
Sterilt vand	15°C til 30°C Leveres af brugeren	30	Ingen klargøring påkrævet.

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. prøve (µl)	Påkrævet klargøring
Tagmentation Beads	-15 °C til -25 °C BOKS 1	10	**Skal bringes op på stuetemperatur, mindst 30 minutter.**
Stop Buffer	15°C til 30°C BOKS 2	10	Ingen klargøring påkrævet.
Tagmentation Wash Buffer	15°C til 30°C BOKS 2	300	Ingen klargøring påkrævet.
PCR Mix (eller PCR Mix-1 til 96 kit)	-15 °C til -25 °C BOX 4 (eller BOX 1 til 96 kit)	20	Skal tøs op og opbevares på is. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**
Indekser: **ASTX17.1(24)-IVD:** H503, H505, H506, H517, H705, H706, H707, H710, H711, H714 **ASTX17.1(24)-B-IVD:** H502, H507, H508, H521, H701, H702, H703, H704, H712, H715 **ASTX17.1(96)-A-IVD/ASTX9.1(96)-A-IVD:** H503, H505, H506, H517, H502, H507, H508, H521, H705, H706, H707, H710, H711, H714, H701, H702, H703, H704, H712, H715 **ASTX17.1(96)-B-IVD/ASTX9.1(96)-B-IVD:** H510, H511, H513, H522, H515, H516, H518, H520, H716, H718, H719, H720, H721, H722, H723, H724, H726, H727, H728, H729	-15 °C til -25 °C BOKS 3	10 i alt	Skal tøs op og opbevares på is.

2. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
3. Stil den påkrævede plade med 96 brønde og semiskørt, Microseal B og mikrocentrifugeringsrørene på 1,5 ml klar.

BEMÆRK: Der er ikke noget sikkert stoppunkt før PCR-indekseringen. Processen tager cirka **1:50** timer (inklusive 50 minutters PCR-termocyklus).

4. For hver DNA-prøve skal 10 µl af prøven på 10-100 ng/µl alikvoteres i den passende brønd på en PCR-plade i henhold til pladelayoutet i arbejdsarket 1.0 Sample_Prep.
5. Klargør 40 µl Tagmentation Master Mix pr. prøve ved brug af 10 µl Tagmentation Buffer, 20 µl sterilt vand og 10 µl Tagmentation Beads.
6. Bland ovenstående master mix i en vortexmixer og derefter i en rotator.
7. 40 µl af Tagmentation Master Mix pipetteres i hver brønd, der indeholder en DNA-prøve.
8. Forsegl pladen med Microseal B-film.
9. Pladen skal centrifugeres ved 100 x g i 10 sekunder for at indsamle alle reagenser i bunden af brønden.
10. Bland med pladerysteren ved 1600 o/min. i 1 minut.
11. Foretag en visuel kontrol af pladen:
    a) Hvis perlerne ikke er fordelt jævnt i brønden, gentages rysteproceduren i henhold til trin 10.
    b) Hvis materialet ikke er i bunden af brønden, eller hvis der er stænk af materialet på Microseal B-filmen, skal den anbringes i rotatoren, og rysteproceduren fra trin 10 skal gentages.

12. Anbring pladen i en thermocycler, og kør Tagmentation-programmet med låget opvarmet til 105 °C og en reaktionsvolumen på 50 µl:

Temperatur	Tid
55 °C	5 minutter
10°C	2 minutter

13. Når programmet er afsluttet, skal pladen omgående tages ud af thermocycleren og stå ved stuetemperatur i 2 minutter.
14. Fjern Microseal B-filmen.
15. Tilsæt 10 µl Stop Buffer til hver reaktionsbrønd.
16. Forsegl pladen igen med ny Microseal B-film.
17. Bland med pladerysteren ved 1600 o/min. i 1 minut.
18. Inkubér pladen i 5 minutter mere ved stuetemperatur.
19. Under inkubationen tages PCR Mix og indekser ud af fryseren, så de kan tø op, hvorefter de anbringes på is/i et koldt stativ.
20. Foretag en visuel kontrol af pladen. Hvis materialet ikke er i bunden af brønden, eller hvis der er stænk af materialet på Microseal B-filmen, anbringes pladen i rotatoren.
21. Skyl tre gange med Tagmentation Wash Buffer, som beskrevet nedenfor:
    a) Fjern Microseal B-filmen, og anbring pladen i magnetstand-96 i 1 minut, så perlerne samles i brøndene langs magneten.
    b) Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i brøndene langs magneten.
    c) Tilsæt langsom 100 µl Tagmentation Wash Buffer til hver brønd.
    d) Forsegl pladen igen med ny Microseal B-film. Sørg for, at filmen er fastgjort korrekt.
    e) Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 2 minutter ved stuetemperatur.
    f) **FORSIGTIG:** Hvis der er stænk af prøverne på forseglingen, skal de centrifugeres ved 100 x g i 10 sekunder, inden forseglingen fjernes.
    g) Gentag trin a) til f) to gange mere, så der udføres 3 skylninger i alt.

BEMÆRK: Klargør PCR-mastermix blandingen som beskrevet nedenfor, inden supernatanten fra tredje skylning bortskaffes.

22. Klargør 40 µl PCR-mastermix blanding ved brug af 20 µl sterilt vand og 20 µl PCR Mix (eller PCR Mix-1, hvis du bruger 96 testkit).

BEMÆRK: PCR Mix anvendes til efterfølgende trin i protokollen. Du må ikke bortskaffe dette hætteglas.

23. Fjern Microseal B-filmen, og anbring pladen i Magnetic Stand-96 i 1 minut, så perlerne samles i brøndene langs magneten.
24. Brug en pipette, der er indstillet til 100 µl, til at aspirere og bortskaffe supernatanten fra den endelige Tagmentation-skylning.
25. Fjern pladen fra magnetstativet.
26. Tilsæt 40 µl af PCR-mastermix blandingen til hver brønd.
27. Forsegl pladen med Microseal B-film.
28. Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 2 minutter ved stuetemperatur.
29. Pladen skal centrifugeres ved 100 x g i 10 sekunder for at sikre, at alle perler er opslæmmet i PCR-masterblandingen.

Til indeksrør (T),

30. (T) Kør indeksrørene i en vortexmixer og en rotator for at sikre, at hele volumenet er i bunden af røret.
31. (T) Fjern Microseal B-filmen fra prøvepladen.
32. (T) Tilsæt 5 µl i7-indeks til hver brønd i henhold til pladelayoutet på arbejdsarket 1.0 Sample_Prep.
33. (T) Tilsæt 5 µl i5-indeks til hver brønd i henhold til pladelayoutet på arbejdsarket 1.0 Sample_Prep.

Fortsæt til trin 34.

Til indeksplade (P),

30. (P) Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 1 minut.
31. Pladen skal centrifugeres ved 100 x g i 10 sekunder for at sikre, at hele volumenet er i bunden af brønden.
32. Fjern Microseal B-filmen fra prøvepladen.
33. (P) **Bekræft den korrekte orientering af pladen og det korrekte indekssæt**. **Skræl ikke folieforseglingen af.** Gennembor indekspladens folieforsegling med en spids. Med en ny spids overføres 10 µl af de kombinerede indekser fra indekspladen til hver prøvebrønd i henhold til pladelayoutet på 1.0 Sample_Prep-arket.
Fortsæt til trin 34.

34. Forsegl med ny Microseal B-film.
35. Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 1 minut ved stuetemperatur.
36. Pladen skal centrifugeres ved 100 x g i 10 sekunder for at indsamle alle reagenser i bunden af brønden. Foretag en visuel kontrol for at sikre, at perlerne stadigvæk er jævnt fordelt i opløsningen. Hvis perlerne ikke er fordelt jævnt, gentages rysteproceduren i henhold til trin 35.
37. Anbring pladen i en thermocycler, og kør Indexing PCR-programmet med låget opvarmet til 105 °C og en reaktionsvolumen på 50 µl:

Nr.	Trin	Temperatur	Tid	Antal cyklusser
1	Udfyldning	72°C	3 minutter	1
2	Indledende denaturering	98°C	3 minutter	1
3	Denaturering	98°C	20 sekunder	9
4	Hybridisering	60°C	30 sekunder	
5	Ekstension	72°C	3 minutter	
6	Endelig ekstension	72°C	3 minutter	1
7	Endelig holdetid	10°C	Holdetid	1

BEMÆRK: Sikkert stoppunkt. Bibliotekerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 uge.
BEMÆRK: Hvis der fortsættes med størrelsesvalg og rensning med det samme skal de sikres, at de anvendte Purification Beads bringes op på stuetemperatur før brug.

4.3 Størrelsesvalg og rensning

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. prøve (µl)	Påkrævet klargøring
Purification Beads (Purification Beads – 1 til 96 testkit)	2 °C til 8 °C BOKS 5	110.8	Skal bringes op på stuetemperatur, mindst 30 minutter. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**
Sterilt vand	15°C til 30°C Leveres af brugeren	215	Ingen klargøring påkrævet.
100 % ætanol	15°C til 30°C Leveres af brugeren	320	Klargør 80 % ætanol, som beskrevet nedenfor.
Resuspension Buffer	2°C til 8°C BOKS 5	17	Skal bringes op på stuetemperatur. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**

2. Klargør fortyndede Purification Beads ved brug af 90 µl Purification Beads og 135 µl sterilt vand pr. prøve. Sørg for, at Purification Beads vortexblandet grundigt før brug.

3. Klargør 600 µl frisk 80 % ætanol pr. prøve, som er tilstrækkeligt til 2 skylninger, ved brug af 480 µl 100 % ætanol og 120 µl sterilt vand (en overskydende volumen er inkluderet).
4. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
5. Stil den påkrævede MIDI-plade, Microseal B og PCR-pladerne klar.

BEMÆRK: Processen tager cirka **1** time.

6. 225 µl fortyndede Purification Beads alikvoteres i de passende brønde på en MIDI-plade (i henhold til pladelayoutet i arbejdsarket 1.0 Sample_Prep).
7. Bland Tagmentation Beads og supernatanten fra PCR-indekseringen med pipette, **eller** ryst indekserings-PCR-pladen i 1 minut ved 1800 o/min., og tilsæt derefter 45 µl af hver blanding til den relevante brønd på MIDI-pladen, der indeholder fortyndede Purification Beads.
8. Forsegl MIDI-pladen med Microseal B-film.
9. Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 2 minutter.
10. Inkubér pladen i 5 minutter ved stuetemperatur. Under denne inkubation binder de største fragmenter til perlerne.
11. Centrifugér pladen ved 280 x g i 1 minut.
12. Fjern Microseal B-filmen, og anbring pladen i Magnetic Stand-96 i 5 minutter, så perlerne samles i brøndene langs magneten.
13. **Overfør 260 µl af supernatanten til en ny MIDI-plade, eller rengør brøndene i den samme plade.**
14. Tilsæt 20,8 µl Purification Beads (ufortyndede) til hver prøve. Forsegl med Microseal B-film.
15. Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 1 minut.
16. Inkubér pladen i 5 minutter ved stuetemperatur. Under denne inkubation binder fragmenterne med målstørrelsen til perlerne.
17. Fjern Microseal B-filmen, og anbring pladen i Magnetic Stand-96 i 5 minutter, så perlerne samles i brøndene langs magneten.
18. Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i brøndene langs magneten.
19. Hold pladen på magneten, og skyl to gange med 80 % ætanol:
    a) Tilsæt 200 µl 80 % ætanol til hver prøve.
    b) Inkubér ved stuetemperatur i 30 sekunder.
    c) Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe al supernatanten.
    d) Gentag trin a) til c), så der udføres 2 skylninger i alt.
20. Fjern al den resterende supernatant med en P20-pipette.
21. Lufttør pladen i 5 minutter ved stuetemperatur, så eventuelle ætanolrester fordamper.
22. Tilsæt 17 µl Resuspension Buffer til hver brønd for at eluere målfragmenterne.
23. Forsegl pladen med Microseal B-film.
24. Bland med pladerysteren ved 1800 o/min. i 2 minutter.
25. Inkubér pladen i 5 minutter ved stuetemperatur.
26. Centrifugér pladen ved 280 x g i 30 sekunder.
27. Fjern Microseal B-filmen, og anbring pladen i Magnetic Stand-96 i 5 minutter, så perlerne samles i brøndene langs magneten.
28. **Overfør** 15 µl supernatant til en ny PCR-plade med henblik på opbevaring.

BEMÆRK: Sikkert stoppunkt. Bibliotekerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 måned.

4.4 Qubit-kvantificering (valgfrit)

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. prøve (µl)	Påkrævet klargøring
Qubit BR-buffer	-25°C til 30°C Leveres af brugeren	199	Ingen klargøring påkrævet.
Qubit BR-farvestof	-25 °C til 30 °C Leveres af brugeren	1	Ingen klargøring påkrævet.
BR-standard nr. 1	2°C til 8°C Leveres af brugeren	10	Skal bringes op på stuetemperatur.
BR-standard nr. 2	2°C til 8°C Leveres af brugeren	10	Skal bringes op på stuetemperatur.

2. Stil de påkrævede Qubit-rør og rør på 1,5 ml eller 5 ml til klargøring af arbejdsopløsningen klar, afhængigt af den påkrævede volumen.
3. Klargør to prøverør til standarderne og ét til hver prøve.
4. Klargør 200 µl Qubit-arbejdsopløsning ved brug af 199 µl Qubit-buffer og 1 µl Qubit-farvestof for hver prøve/standard, der skal kvantificeres.
5. Kør arbejdsopløsningen i en vortexmixer i 2-3 sekunder og derefter i en rotator.
6. **190 µl** af arbejdsopløsningen alikveres i hvert af standardrørene.
7. **198 µl** af arbejdsopløsningen alikveres i hvert af prøverørene.
8. **10 µl** af standardopløsningen alikveres i hvert af de pågældende standardrør.
9. **2 µl** af hver prøve alikveres i det pågældende rør.
10. Alle rør køres i en vortexmixer i 2-3 sekunder og derefter i en rotator.
11. Inkubér rørene i 2 minutter ved stuetemperatur.
12. Indsæt rørene i Qubit Fluorometeret, og foretag aflæsning (se Qubit-protokollen for nærmere oplysninger).
13. Dokumentér Qubit-aflæsningerne i tabellen i projektmappen for at beregne gennemsnittet pr. prøve.

BEMÆRK: Den forventede volumen af hvert bibliotek er cirka 30 ng/µl, men den kan variere afhængigt af DNA-kvaliteten og inputtet. En volumen på 10 ng/µl eller derover forventes at give tilfredsstillende berigelsesresultater.

4.5 TapeStation-visualisering (valgfrit)

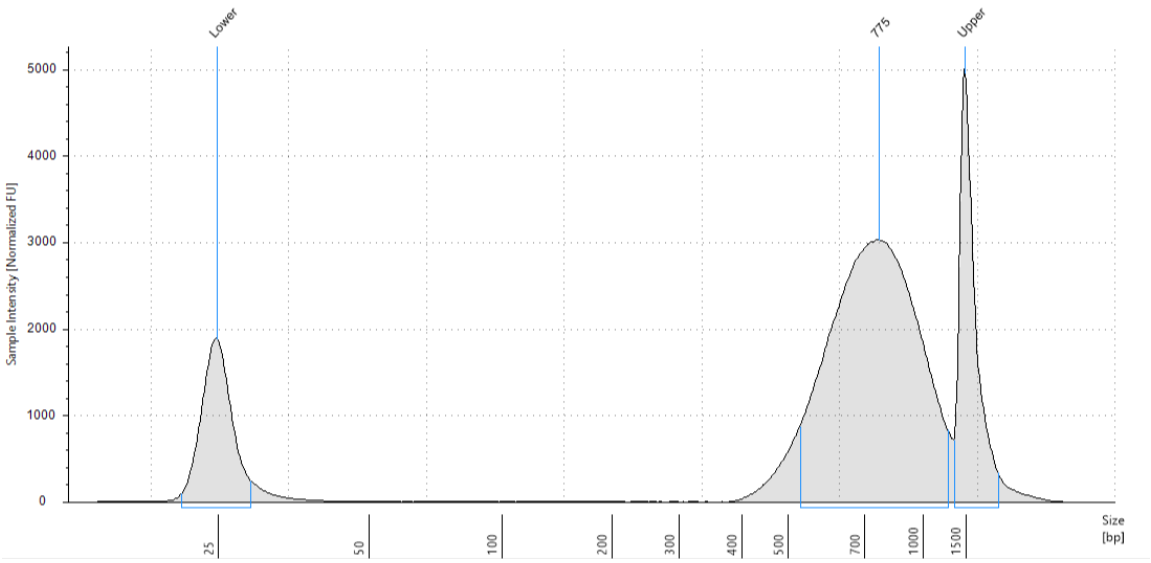
BEMÆRK: Alternative systemer til fragmentvisualisering såsom Fragment Analyzer, Bioanalyzer eller tilsvarende kan bruges, når brugeren har valideret anvendelsen.

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. prøve (µl)	Påkrævet klargøring
D1000 Ladder	2°C til 8°C Leveres af brugeren	1	Skal bringes op på stuetemperatur.
D1000 Sample Buffer	2°C til 8°C Leveres af brugeren	3	Skal bringes op på stuetemperatur.

2. Saml det påkrævede D1000 ScreenTape, en prøveplade med 96 brønde (tyndvægget) og folieforsegling.
3. Overfør 1 µl af hver beriget prøve til en ny PCR-plade med 96 brønde.
4. Tilsæt 1 µl D1000 Ladder til en referencebrønd.
5. Tilsæt 3 µl D1000 Sample Buffer til hver prøvebrønd og referencebrønden.
6. Forsegl pladen med folieforseglingen.
7. Køres i en vortexmixer med en IKA-vortexplade ved 2000 o/min. i 1 minut.
8. Centrifugeres kort for at sikre, at alle prøver er i bunden af brøndene
9. Indlæs prøvepladen i 2200 TapeStation-instrumentet.
10. Vælg de påkrævede brønde i 2200 TapeStation-styreenhedens software, og kør prøverne (se brugervejledningen til TapeStation for nærmere oplysninger).
11. Når kørslen er afsluttet, skal TapeStation analysesoftwaren startes for at få vist resultaterne (se brugervejledningen til TapeStation for nærmere oplysninger).

12. Dokumenter resultaterne i projektmappen.



Figur 4.5.1: Repræsentativt billede af TapeStation-diagram for biblioteker.

5. Hybrid indfangning (original arbejdsgang)

5.0 Præsentation af protokollen

- Følg nedenstående AlloSeq Tx-protokollen i den viste rækkefølge ved brug af de anførte parametre.
- Inden du går i gang, skal du kontrollere kittets indhold og forsikre dig om, at du har de påkrævede forbrugsmaterialer og det påkrævede udstyr.
- For at lette anvendelsen er protokoltrinnene til hybrid indfangning også beskrevet i *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD*. Henvisninger til projektmappen i kapitel 5 vedrører denne projektmappe.

5.1 Pooling af prøver

1. Indtast et forsøgs-id i det relevante gule felt i projektmappen.
2. Indtast antallet af poolinger, der skal behandles, i det relevante gule felt i projektmappen.
3. Kopier de passende prøveoplysninger fra fanen 1.1 Linear View under *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD* og sæt dem ind i Bibliotekspool-listen under *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD* med den særlige indsætningsmulighed "Værdi- og talformatering".
4. Ved pooling af ≤12 prøver tilsættes 2,5 µl af hvert bibliotek, der skal beriges, til et PCR-rør/en PCR-strimmel, og det passende volumen Resuspension Buffer tilsættes, så der opnås 30 µl i alt i henhold til nedenstående tabel.
5. Ved pooling af >12 prøver tilsættes 2,5 µl af hvert bibliotek, der skal beriges, til et mikrocentrifugeringsrør på 1,5 ml, og der fortsættes til koncentrationstrinnet (1.1 i projektmappen *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD*).
6. Ved behandling af flere poolinger skal denne fane kopieres, og trin 1-5 ovenfor følges. Sørg for entydig identifikation af hver pooling.

BEMÆRK: Ved biblioteker med mindre volumen, herunder biblioteker fra klargøring af DNA fra bukkalceller, kan det være hensigtsmæssigt at bruge en større biblioteksinputvolumen (der ikke overstiger den samlede biblioteksinputvolumen på i alt 30 µl). Behandling af biblioteker med mindre volumen (bukkale biblioteker) i en berigelsespool, der er adskilt fra biblioteker med større volumen (genomiske biblioteker), anbefales, når det er muligt. Kontakt den lokale tekniske repræsentant for særlig rådgivning.

5.2 Koncentration af bibliotekspoolinger (valgfrit)

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
Purification Beads (Purification Beads -1 til 96 testkit)	2 °C til 8 °C BOKS 5	58,5-108	Skal bringes op på stuetemperatur, mindst 30 minutter. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**
Sterilt vand	15°C til 30°C Leveres af brugeren	480	Ingen klargøring påkrævet.
100 % ætanol	15°C til 30°C Leveres af brugeren	1.920	Klargør 80 % ætanol, som beskrevet nedenfor.
Resuspension Buffer	2°C til 8°C BOKS 5	32	Skal bringes op på stuetemperatur. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**

2. Klargør frisk 80 % ætanol (2 skylninger per prøve) med 1.920 µl 100 % ætanol og 480 µl sterilt vand (et overskydende volumen er inkluderet).
3. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
4. Stil de påkrævede mikrocentrifugeringsrør på 1,5 ml klar.

BEMÆRK: Processen tager cirka 30 minutter.

5. Foretag pooling af prøvebibliotekerne i et rør på 1,5 ml i henhold til anvisningerne i projektmappen 1.0 Sample Pooling.
6. Tilføj et passende volumen (1,8 x poolet prøvevolumen eller se beregninger i projektmappen) af grundigt vortexbehandlede renseperler til 1,5 ml-røret, der indeholder poolede biblioteker.
7. Kør hvert rør i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder 3 gange.
8. Kør røret hurtigt i en rotator.
9. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
10. Anbring røret på magneten i 1 minut (op til 2,5 minutter for biblioteker med 96 prøver), så perlerne samles langs magneten. Hvis supernatanten forbliver uklar, lad den forblive på magneten, indtil den er klar.
11. Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
12. Hold røret på magneten, og skyl to gange med 80 % ætanol:
    a) Tilsæt 800 µl 80 % ætanol til hvert rør.
    b) Inkubér ved stuetemperatur i 30 sekunder.
    c) Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe al supernatanten.
    d) Gentag trin a) til c), så der udføres 2 skylninger i alt.
13. Fjern al den resterende supernatant med en P20-pipette.
14. Lufttør røret i 5 minutter ved stuetemperatur, så eventuelle ætanolrester fordamper.
15. Tilsæt 32 µl Resuspension Buffer til røret for at eluere bibliotekerne.
16. Kør hvert rør i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder 3 gange.
17. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
18. Kør røret hurtigt i en rotator.
19. Anbring rørene på magneten i 1 minut, så perlerne samles i rørene langs magneten.
20. **Overfør** 30 µl supernatant til et nyt PCR-rør/en ny PCR-strimmel med henblik på hybridisering.

BEMÆRK: Sikkert stoppunkt. Bibliotekerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 uge.

5.3 Hybridisering af prøverne

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
AlloSeq Tx Probe Panel	-15 °C til -25 °C BOKS 4	10	Skal bringes op på stuetemperatur.
Hybridisation Buffer 1	-15 °C til -25 °C BOKS 4	50	Anbringes i Hybex ved 50 °C i 15 minutter. Køres i en vortexmixer. Foretag derefter en visuel kontrol. Hvis der stadigvæk er udfældning, inkuberes ved 50 °C i yderligere 15 minutter.
Hybridisation Buffer 2	2°C til 8°C BOKS 5	10	Skal bringes op på stuetemperatur.

2. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
3. Stil de påkrævede PCR-rør/PCR-strimler og hætter klar.

BEMÆRK: Der er ikke noget sikkert stoppunkt, for indfangningsprotokollen er gennemført. Poolede prøver skal føres direkte fra holdetrinnet ved 62 °C i hybridiseringsreaktionen i thermocycleren til perleindfangningstrinnene og de opvarmede skylletrin.

BEMÆRK: Klargøringen af processen tager cirka 20 minutter, og det kræver minimum 2 timer og maksimalt 18 timer i thermocycleren (reaktioner, der står natten over, eller i op til 18 timer, skal holdes ved en temperatur på 62 °C på det endelige reaktionstrin).

4. For hver hybridiseringsreaktion skal følgende reagenser kombineres i den rækkefølge, der er anført nedenfor, i et PCR-rør/på en PCR-strimmel:

Reagens	Volumen pr. pool (µl)
Poolede prøvebiblioteker	30
AlloSeq Tx Probe Panel	10
Hybridisation Buffer 1	50
Hybridisation Buffer 2	10
I alt	100

5. Med en pipette, der er indstillet til 70 µl blandes hver hybridiseringsreaktionsbrønd 10 gange, hvorefter den forsegles og køres i en rotator.
6. Hvis opløsningen stadigvæk er uklar, foretages der pipetteblanding 6-8 gange mere.
7. Anbring røret/strimlen i en thermocycler, og kør Hybridisation-programmet med låget opvarmet til **100 °C** og en reaktionsvolumen på 100 µl:

Nr.	Trin	Temperatur	Tid	Antal cyklusser
1	Denaturering	98°C	5 minutter	1
2	Reduktion	98 °C - 62 °C, aftagende med 2 °C/cyklus	1 minut	1
3	Gå til trin 2 med henblik på 18 cyklusser mere (19 cyklusser i alt), hvor temperaturen reduceres med 2 °C/cyklus.			
4	Hybridisering	62°C	90 minutter	1
5	Endelig holdetid	62°C	Hold (må ikke overskride 18 timer ved 62 °C, inklusive trin 4)	1

8. Lad røret/strimlen forblive i termocycleren, indtil du er klar til at udføre indfangningen. Sørg for, at de anvendte Capture Beads, har stuetemperatur, og at den anvendte Capture Wash Buffer og Hybex er varmet op til 58 °C.

5.4 Indfangning

9. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
Capture Beads	2°C til 8°C BOKS 5	250	**Skal bringes op på stuetemperatur, mindst 30 minutter.**
Capture Wash Buffer	-15 °C til -25 °C BOKS 4	800	**Forvarmes til 58 °C før brug.**
Capture Elution Buffer 1	-15 °C til -25 °C BOKS 4	28.5	Skal bringes op på stuetemperatur.
2N NaOH	-15 °C til -25 °C BOKS 4	1.5	Skal bringes op på stuetemperatur. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**
Capture Elution Buffer 2	2°C til 8°C BOKS 5	4	Skal bringes op på stuetemperatur.

1. Klargør en elueringsmasterblanding bestående af følgende reagenser pr. pool, der skal indfanges:

Reagens	Volumen pr. pool (µl)
Capture Elution Buffer 1	28.5
2N NaOH (frisk)	1.5

BEMÆRK: NaOH-opløsningen absorberer CO_2 fra atmosfæren, hvilket ændrer reagensets pH-værdi og ydeevne. Sørg for, at røret med 2N NaOH er lukket, når det ikke er i brug.

2. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
3. Stil de påkrævede mikrocentrifugeringsrør på 1,5 ml, PCR-rør/PCR-strimler og hætter klar.

BEMÆRK: Denne proces tager cirka **1** time.

4. For hver hybridiseringsreaktion tilsættes 250 µl Capture Beads til et nyt rør på 1,5 ml.
5. **Overfør** 100 µl af hver hybridiseringsreaktion til det pågældende rør med Capture Beads.
6. Kør røret i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder 3 gange. Må ikke centrifugeres eller køres i en rotator.
7. Inkubér røret ved 58 °C i Hybex i 15 minutter.
8. Kør røret hurtigt i en rotator.
9. Anbring omgående røret på magneten i 1 minut, så perlerne samles langs magneten.
10. Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
11. Skyl tre gange med opvarmet Capture Wash Buffer, som beskrevet nedenfor:

BEMÆRK: Capture Wash Buffer skal opbevares i Hybex, når den ikke er i brug, for at holde temperaturen på 58 °C. Den må først tages ud lige før, den tilsættes til reaktionen i trin 12b og 14. Arbejd hurtigt under udførelsen af de opvarmede skylletrin for at minimere den tid prøvepoolen/bufferen tilbringer ved stuetemperatur.

a) Fjern røret fra magneten.
b) Tilsæt 200 µl opvarmet Capture Wash Buffer (58 °C).
c) Kør røret i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder 3 gange. Må ikke centrifugeres eller køres i en rotator.
d) Inkubér røret ved 58 °C i Hybex i 5 minutter.
e) Kør i en rotator, og anbring derefter omgående røret på 1,5 ml-magneten i 1 minut, så perlerne samles langs magneten.
f) Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
g) Gentag trin a) til f) to gange mere, så der udføres 3 skylninger i alt.

12. Fjern røret fra magneten.
13. Tilsæt 200 µl opvarmet Capture Wash Buffer (58 °C).
14. Kør røret i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder 3 gange. Må ikke centrifugeres eller køres i en rotator.
15. **Overfør** hele indholdet (skylleopløsningen og perlerne) til et nyt rør på 1,5 ml.

BEMÆRK: Dette overførselstrin er vigtigt med henblik på fjernelse af PCR-inhibitorer, som kan påvirker den senere ydeevne.

16. Inkubér røret ved 58 °C i Hybex i 5 minutter.
17. Kør omgående i en rotator, og anbring derefter røret på magneten i 1 minut, så perlerne samles langs magneten.
18. Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
19. Kør røret hurtigt i en rotator, og anbring derefter omgående røret magneten i 1 minut, så perlerne samles langs magneten.
20. Brug en P20-pipette til at aspirere og bortskaffe resterende supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
21. Kør den elueringsmasterblanding, der blev klargjort ovenfor, i en vortexmixer, og fjern derefter reaktionsrøret fra magneten, og tilsæt 23 µl af elueringsmasterblandingen til hvert rør.
22. Kør røret i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder 3 gange.
23. Inkubér ved stuetemperatur i 2 minutter.
24. Kør røret hurtigt i en rotator.
25. Anbring røret på magneten i 1 minut, så perlerne samles langs magneten.
26. **Overfør** 21 µl supernatant til et nyt PCR-rør/en ny PCR-strimmel.
27. Tilsæt 4 µl Capture Elution Buffer 2.
28. Foretag pipetteblanding 6-8 gange. Den endelige volumen er 25 µl.

BEMÆRK: Sikkert stoppunkt. Bibliotekerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 24 timer.

5.5 PCR efter berigelse

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
PCR Primers	-15 °C til -25 °C BOKS 4	5	Optøs på is. Blandes ved invertering, og centrifugeres derefter kort.
PCR Mix (eller PCR Mix-2 til 96 kit)	-15 °C til -25 °C BOKS 4	20	Optøs ved stuetemperatur og stilles derefter på is.

2. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
3. Stil de påkrævede PCR-rør med de indfangede biblioteker fra trin 5.4 Indfangning klar.

BEMÆRK: Klargøringen af denne processen tager cirka 5 minutter og kræver **1:40** timer i en thermocycler.

4. Tilsæt 5 µl PCR Primers til de indfangede biblioteker i PCR-røret.
5. Tilsæt 20 µl PCR Mix til røret.
6. Foretag pipetteblanding 10 gange.
7. Kør røret hurtigt i en rotator.
8. Anbring røret/strimlen i termocycleren, og kør PCR-programmet efter berigelse med låget opvarmet til 105 °C og en reaktionsvolumen på 50 µl:

Nr.	Trin	Temperatur	Tid	Antal cyklusser
1	Denaturering	98°C	30 sekunder	1
2	Denaturering	98°C	1 minut	17
3	Hybridisering	60°C	30 sekunder	
4	Ekstension	72°C	3 minutter	
5	Endelig ekstension	72°C	5 minutter	1
6	Endelig holdetid	10°C	Holdetid	1

BEMÆRK: Sikkert stoppunkt. Bibliotekerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 uge.
BEMÆRK: Hvis der fortsættes med rensning med det samme skal de sikres, at de anvendte Purification Beads bringes op på stuetemperatur før brug.

5.6 Rensning af PCR efter berigelse

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
Purification Beads (Purification Beads-2 til 96 kit)	2 °C til 8 °C BOKS 5	27	Skal bringes op på stuetemperatur, mindst 30 minutter.
Sterilt vand	15°C til 30°C Leveres af brugeren	80	Ingen klargøring påkrævet.
100 % ætanol	15°C til 30°C Leveres af brugeren	320	Klargør 80 % ætanol, som beskrevet nedenfor.
Resuspension Buffer	2°C til 8°C BOKS 5	32	Skal bringes op på stuetemperatur. **Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin.**

2. Klargør frisk 80 % ætanol (2 skylninger per prøve) med 480 µl 100 % ætanol og 120 µl steril vand (en overskydende volumen er inkluderet).
3. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
4. Stil de påkrævede mikrocentrifugeringsrør på 1,5 ml klar.

BEMÆRK: Processen tager cirka **30** minutter.

5. For hver rensningsreaktion tilsættes 27 µl grundigt vortexblandede Purification Beads til et nyt rør på 1,5 ml.
6. **Overfør** 45 µl af hver PCR-reaktion efter berigelse til det pågældende rør med Purification Beads.
7. Kør hvert rør i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder 3 gange.
8. Kør røret hurtigt i en rotator.
9. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
10. Anbring røret på magneten i 1 minut, eller indtil alle perlerne er samlet langs magneten.
11. Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe supernatant, så perlerne forbliver i røret langs magneten.
12. Hold røret på magneten, og skyl to gange med 80 % ætanol:
    a) Tilsæt 200 µl 80 % ætanol til hvert rør.
    b) Inkubér ved stuetemperatur i 30 sekunder.
    c) Brug en pipette til at aspirere og bortskaffe al supernatanten.
    d) Gentag trin a) til c), så der udføres 2 skylninger i alt.
13. Fjern al den resterende supernatant med en P20-pipette.
14. Lufttør røret i 5 minutter ved stuetemperatur, så eventuelle ætanolrester fordamper.
15. Tag røret af magneten, og tilsæt 32 µl Resuspension Buffer til hvert rør med henblik på eluering af målfragmenterne.
16. Kør hvert rør i en vortexmixer ved høj hastighed i 10 sekunder 3 gange.
17. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.

18. Kør røret hurtigt i en rotator.
19. Anbring rørene på magneten i 1 minut, så perlerne samles i rørene langs magneten.
20. **Overfør** 30 µl supernatant til et nyt rør på 1,5 ml med henblik på opbevaring.

BEMÆRK: Sikkert stoppunkt. Bibliotekerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 måned.

5.7 Qubit-kvantificering

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
Qubit BR-buffer	-25°C til 30°C Leveres af brugeren	199	Ingen klargøring påkrævet.
Qubit BR-farvestof	-25 °C til 30 °C Leveres af brugeren	1	Ingen klargøring påkrævet.
BR-standard nr. 1	2°C til 8°C Leveres af brugeren	10	Skal bringes op på stuetemperatur.
BR-standard nr. 2	2°C til 8°C Leveres af brugeren	10	Skal bringes op på stuetemperatur.

2. Stil de påkrævede Qubit-rør og rør på 1,5 ml eller 5 ml til klargøring af arbejdsopløsningen klar, afhængigt af den påkrævede volumen.
3. Klargør to prøverør til standarderne og ét til hver pool.
4. Klargør 200 µl Qubit-arbejdsopløsning ved brug af 199 µl Qubit-buffer og 1 µl Qubit-farvestof for hver prøve/standard, der skal kvantificeres.
5. Kør arbejdsopløsningen i en vortexmixer i 2-3 sekunder og derefter i en rotator.
6. **190 µl** af arbejdsopløsningen alikveres i hvert af standardrørene.
7. **198 µl** af arbejdsopløsningen alikveres i hvert af poolrørene.
8. **10 µl** af standardopløsningen alikveres i hvert af de pågældende standardrør.
9. **2 µl** af hver pool alikveres i det pågældende rør.
10. Alle rør køres i en vortexmixer i 2-3 sekunder og derefter i en rotator.
11. Inkubér rørene i 2 minutter ved stuetemperatur.
12. Indsæt rørene i Qubit Fluorometeret, og foretag aflæsning (se Qubit-fabrikantens protokol for nærmere oplysninger).
13. Dokumentér Qubit-aflæsningerne i tabellen i projektmappen for at beregne den gennemsnitlige koncentration.

5.8 TapeStation-visualisering (valgfrit)

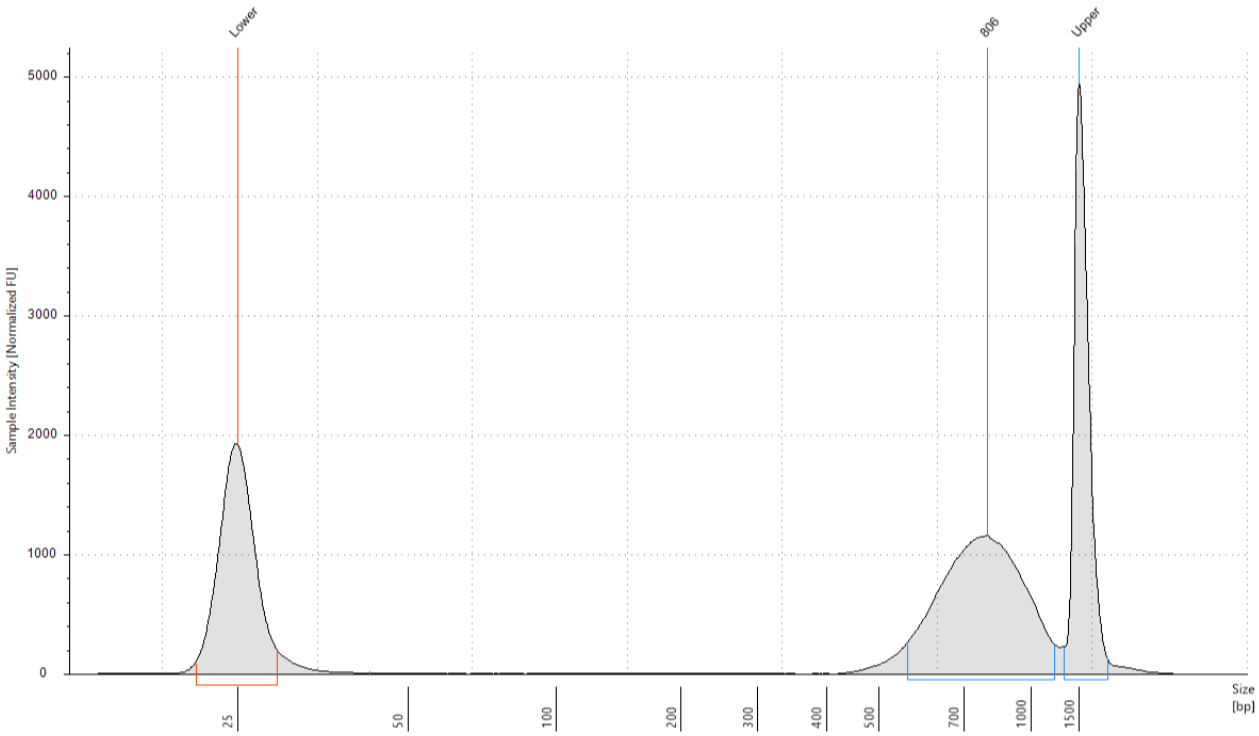
BEMÆRK: Alternative systemer til fragmentvisualisering såsom Fragment Analyzer, Bioanalyzer eller tilsvarende kan bruges, når brugeren har valideret anvendelsen.

1. Stil de påkrævede reagenser klar (volumen er anført i nedenstående tabel), og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Volumen pr. pool (µl)	Påkrævet klargøring
D1000 Ladder	2°C til 8°C Leveres af brugeren	1	Skal bringes op på stuetemperatur.
D1000 Sample Buffer	2°C til 8°C Leveres af brugeren	3	Skal bringes op på stuetemperatur.

2. Indsaml den påkrævede D1000 ScreenTape, samt TapeStation optiske rørstrimler og -hætter.
3. Overfør 1 µl af hver pool til et nyt rør.
4. Tilsæt 1 µl D1000 Ladder til et referencerør.

5. Tilsæt 3 µl D1000 Sample Buffer til hvert prøverør og referencerør.
6. Forsegl alle rør med hætter.
7. Vortexbland alle rør grundigt med IKA-vortex ved 2000 o/min. i 1 minut.
8. Centrifugeres kort for at sikre, at alle prøver er i bunden af rørene.
9. Fjern hætten og indlæs prøverøret i 2200 TapeStation-instrumentet.
10. Vælg de påkrævede rør i 2200 TapeStation-styreenhedens software, og kør prøverne (se brugervejledningen til TapeStation for nærmere oplysninger).
11. Når kørslen er afsluttet, skal TapeStation-analysesoftwaren startes for at få vist resultaterne (se brugervejledningen til TapeStation for nærmere oplysninger).
12. Dokumentér resultaterne i tabellen i projektmappen.



Figur 5.8.1: Repræsentativt billede af TapeStation-diagram for den endelige berigede bibliotekspool.

6. Sekventering

6.0 Præsentation af protokollen

AlloSeq Tx-biblioteker er validerede til sekventering, der udføres på Illumina-sekventeringsinstrumenter, herunder MiSeq, MiniSeq eller iSeq, hvor den resulterende datasekvens udlæses i fastq-filformatet. Antallet af prøver, der tilføjes til hver berigede samling bestemmer den nødvendige flowcelle for sekventeringsinstrumentet som beskrevet i afsnittet *1.3 AlloSeq Tx Targeted Gene Content* i denne IFU.

- Følg nedenstående AlloSeq Tx-protokol i den viste rækkefølge ved brug af de anførte parametre.
- Inden du går i gang, skal du kontrollere kittets indhold og forsikre dig om, at du har de påkrævede forbrugsmaterialer og det påkrævede udstyr.
- For lettere anvendelse, er protokoltrinnene også beskrevet detaljeret i *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD (*Early Pooling-arbejdsgang) og *IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD* (original arbejdsgang). Henvisninger til projektmappen i kapitel 6 vedrører denne projektmappe.
- Sekventeringsmaskiner skal indlæses i henhold til instrumentprotokollen, som angivet i instruktionerne nedenfor.

- Hvis du bruger et MiSeq-instrument, anbefales det at udføre vask med skabelonblegemiddel (natriumhypoklorit) i henhold til MiSeq-brugervejledningens instruktioner for optimal ydeevne.

BEMÆRK: Den Illumina-formaterede .csv-importeringsfil fra sekventeringsprøven kan genereres og gemmes som beskrevet i *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD* (arbejdsarket "1.0 Sample_Prep"), fra "1.2 SampleSheet" *(*Early Pooling-arbejdsgang), eller *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD* (arbejdsarket "1.0 Sample_Prep"), fra "1.2 SampleSheet" (oprindelig arbejdsgang).

6.1 PhiX-klargøring

1. Stil de påkrævede reagenser klar, og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Påkrævet klargøring
10 nM PhiX	-15 °C til -25 °C Leveres af brugeren	Skal tøs op og derefter opbevares på is.
2N NaOH	-15 °C til -25 °C BOKS 4	Skal bringes op på stuetemperatur.
Sterilt vand	15°C til 30°C Leveres af brugeren	Ingen klargøring påkrævet.
Resuspension Buffer	2°C til 8°C BOKS 5	Skal bringes op på stuetemperatur.
HT1 (med sekventeringskassette)	-15 °C til -25 °C Leveres af brugeren	Skal tøs op og derefter opbevares på is.

2. Klargør en 0,2 NaOH-arbejdsopløsning ved brug af 45 µl sterilt vand og 5 µl 2N NaOH.

BEMÆRK: NaOH-opløsningen absorberer CO_2 fra atmosfæren, hvilket ændrer reagensets pH-værdi og ydeevne. Sørg for, at røret med 2N NaOH er lukket, når det ikke er i brug.

3. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
4. Stil de påkrævede mikrocentrifugeringsrør på 1,5 ml klar.

6.1.1 Fortynding og denaturering af PhiX til kørsel på MiSeq og MiniSeq

1. Tilsæt 3 µl Resuspension Buffer til et nyt rør.
2. Tilsæt 2 µl 10 nM PhiX til røret.
3. Tilsæt 5 µl 0,2N NaOH-arbejdsopløsning (der er fortyndet som beskrevet ovenfor) til røret.
4. Kør røret i en vortexmixer og en rotator.
5. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
6. Tilsæt 990 µl forkølet HT1 til røret med denatureret PhiX.
7. **Blandes ved invertering** (må IKKE køres i en vortexmixer), hvorefter røret køres i en rotator.

BEMÆRK: Dette giver 1 ml 20 pM PhiX, som er klar til brug ved kørsel på MiSeq. Til kørsel på MiniSeq skal det ekstra fortyndingstrin til 5 pM, som er beskrevet nedenfor, gennemføres. Denatureret PhiX kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 måned.

6.1.2 Yderligere fortynding af PhiX til 5 pM til kørsel på MiniSeq

1. Indtast den ønskede fortyndingsvolumen i projektmappen for at beregne den passende fortynding af PhiX.
2. Fortynd PhiX til 5 pM ved at kombinere reagensvoluminen (se projektmappen) i et mikrocentrifugerør.
3. **Blandes ved invertering** (må IKKE køres i en vortexmixer), hvorefter røret køres i en rotator.

BEMÆRK: Denatureret PhiX kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 måned.

6.1.3 Fortynding af PhiX til 20 pM (uden denaturering) til kørsel på iSeq

1. Indtast den ønskede fortyndingsvolumen i projektmappen for at beregne den passende fortynding af PhiX.
2. Fortynd PhiX til 20 pM ved at kombinere reagensvoluminen (se projektmappen) i et mikrocentrifugerør.
3. **Blandes ved invertering** (må IKKE køres i en vortexmixer), hvorefter røret køres i en rotator.

BEMÆRK: Denatureret PhiX kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 måned.

6.2 Fortynding og denaturering til MiSeq

1. Stil de påkrævede reagenser klar, og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Påkrævet klargøring
AlloSeq Tx Enriched Sample Pool	-15 °C til -25 °C Klargjort af brugeren	Skal tøs op og derefter opbevares på is.
2N NaOH	-15 °C til -25 °C BOKS 4	Skal bringes op på stuetemperatur.
Sterilt vand	15°C til 30°C Leveres af brugeren	Ingen klargøring påkrævet.
HT1 (med MiSeq-kassette)	-15 °C til -25 °C Leveres af brugeren	Skal tøs op og derefter opbevares på is.
Resuspension Buffer	2°C til 8°C BOKS 5	Skal bringes op på stuetemperatur.
20 pM PhiX (fortyndet tidligere)	-15 °C til -25 °C Leveres af brugeren	Skal tøs op og derefter opbevares på is.

2. Klargør en 0,2N NaOH-arbejdsopløsning ved brug af 45 µl sterilt vand og 5 µl 2N NaOH.

BEMÆRK: NaOH-opløsningen absorberer CO_2 fra atmosfæren, hvilket ændrer reagensets pH-værdi og ydeevne. Sørg for, at røret med 2N NaOH er lukket, når det ikke er i brug.

3. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
4. Stil de påkrævede mikrocentrifugeringsrør på 1,5 ml klar.

5. Indtast koncentrationen af den berigede prøvepool, fragmentstørrelsen (forvent cirka 800 bp) og den ønskede samlede volumen (30 µl anbefales) ved 4 nM i projektmappen for at beregne den passende fortynding for biblioteket.
6. Fortynd prøvepoolen til 4 nM ved at kombinere reagenserne (se projektmappen) i et mikrocentrifugerør.
7. Kør den fortyndede prøvepool i en vortexmixer og en rotator, inden de anvendes.
8. Tilsæt 5 µl prøvepool, der er beriget til 4 nM, til et nyt rør.
9. Tilsæt 5 µl 0,2N NaOH-arbejdsopløsning (der er fortyndet som beskrevet ovenfor) til røret.
10. Kør røret i en vortexmixer og en rotator.
11. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
12. Tilsæt 990 µl forkølet HT1 til røret med denatureret og beriget prøvepool.
13. **Blandes ved invertering** (må IKKE køres i en vortexmixer), hvorefter røret køres i en rotator.

BEMÆRK: Dette giver 1 ml prøvepool på 20 pM. Poolerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 måned.

14. Indtast antallet af pooler, der skal kombineres med henblik på sekventeringen, indlæsningskoncentrationen (12 pM anbefales), den ønskede tilsætning af PhiX i % (1 % anbefales som minimum) og indlæsningsvoluminen (minimum 600 µl) i projektmappen for at beregne den passende fortynding for biblioteket.
15. Fortynd prøvepoolen til indlæsningskoncentrationen ved at kombinere reagenserne (se projektmappen) i et mikrocentrifugerør.
16. **Blandes ved invertering** (må IKKE køres i en vortexmixer), hvorefter røret køres i en rotator.
17. Stilles til side på is, indtil den skal indløses i MiSeq-reagenskassetten med henblik på sekventering.

BEMÆRK: Poolerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 48 timer forud for sekventeringen.

18. Indlæses i MiSeq i henhold til instrumentets protokol.

6.3 Fortynding og denaturering til MiniSeq

1. Stil de påkrævede reagenser klar, og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Påkrævet klargøring
AlloSeq Tx Enriched Sample Pool	-15 °C til -25 °C Klargjort af brugeren	Skal tøs op og derefter opbevares på is.
2N NaOH	-15 °C til -25 °C BOKS 4	Skal bringes op på stuetemperatur.
Sterilt vand	15°C til 30°C Leveres af brugeren	Ingen klargøring påkrævet.
HT1 (med sekventeringskassette)	-15 °C til -25 °C Leveres af brugeren	Skal tøs op og derefter opbevares på is.
Resuspension Buffer	2°C til 8°C BOKS 5	Skal bringes op på stuetemperatur.
200 mM Tris-HCl, pH 7,0	15°C til 30°C Leveres af brugeren	Ingen klargøring påkrævet.
5 pM PhiX (fortyndet tidligere)	-15 °C til -25 °C Leveres af brugeren	Skal tøs op og derefter opbevares på is.

2. Klargør en 0,1N NaOH-arbejdsopløsning ved brug af 95 µl sterilt vand og 5 µl 2N NaOH.

BEMÆRK: NaOH-opløsningen absorberer CO_2 fra atmosfæren, hvilket ændrer reagensets pH-værdi og ydeevne. Sørg for, at røret med 2N NaOH er lukket, når det ikke er i brug.

3. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
4. Stil de påkrævede mikrocentrifugeringsrør på 1,5 ml klar.

5. Indtast koncentrationen af den berigede prøvepool, fragmentstørrelsen (forvent cirka 800 bp) og den ønskede samlede volumen (100 µl anbefales) ved 1 nM i projektmappen for at beregne den passende fortynding for biblioteket.
6. Fortynd prøvepoolen til 1 nM ved at kombinere reagenserne (se projektmappen) i et mikrocentrifugerør.
7. Kør den fortyndede prøvepool i en vortexmixer og en rotator, inden de anvendes.
8. Tilsæt 5 µl prøvepool, der er beriget til 1 nM, til et nyt rør.
9. Tilsæt 5 µl 0,1N NaOH-arbejdsopløsning (der er fortyndet som beskrevet ovenfor) til røret.
10. Kør røret i en vortexmixer og en rotator.
11. Inkubér ved stuetemperatur i 5 minutter.
12. Tilsæt 5 µl 200 mM Tris-HCl ved en pH på 7,0.
13. Kør røret i en vortexmixer og en rotator.
14. Tilsæt 985 µl forkølet HT1 til røret med denatureret og beriget prøvepool.
15. **Blandes ved invertering** (må IKKE køres i en vortexmixer), hvorefter røret køres i en rotator.

BEMÆRK: Dette giver 1 ml prøvepool på 5 pM. Poolerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 1 måned.

16. Indtast antallet af pooler, der skal kombineres med henblik på sekventeringen, indlæsningskoncentrationen (1,6 pM anbefales), den ønskede tilsætning af PhiX i % (1 % anbefales som minimum) og indlæsningsvoluminen (minimum 500 µl) i projektmappen for at beregne den passende fortynding for biblioteket.
17. Fortynd prøvepoolen til indlæsningskoncentrationen ved at kombinere reagenserne (se projektmappen) i et mikrocentrifugerør.
18. **Blandes ved invertering** (må IKKE køres i en vortexmixer), hvorefter røret køres i en rotator.
19. Stilles til side på is, indtil den skal indløses i MiniSeq-reagenskassetten med henblik på sekventering.

BEMÆRK: Poolerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 48 timer forud for sekventeringen.

20. Indlæses i MiniSeq i henhold til instrumentets protokol.

6.4 Fortynding til iSeq

1. Stil de påkrævede reagenser klar, og klargør dem i henhold til tabellen:

Reagens	Opbevaringsbetingelser	Påkrævet klargøring
AlloSeq Tx Enriched Sample Pool	-15 °C til -25 °C Klargjort af brugeren	Skal tøs op og derefter opbevares på is.
Resuspension Buffer	2°C til 8°C BOKS 5	Skal bringes op på stuetemperatur.
20 pM PhiX (fortyndet tidligere)	-15 °C til -25 °C Leveres af brugeren	Skal tøs op og derefter opbevares på is.

2. Alle reagenser skal i en vortexmixer og en rotator før brug.
3. Stil de påkrævede mikrocentrifugeringsrør på 1,5 ml klar.
4. Indtast koncentrationen af den berigede prøvepool, fragmentstørrelsen (forvent cirka 800 bp) og den ønskede totalvolumen (100 µl anbefales) ved 1 nM i projektmappen for at beregne den passende fortynding for biblioteket.
5. Fortynd prøvepoolen til 1 nM ved at kombinere reagenserne (se projektmappen) i et mikrocentrifugerør.
6. Kør den fortyndede prøvepool i en vortexmixer og en rotator, inden de anvendes.
7. Indtast pool-antallet, der skal kombineres med henblik på sekventeringen, indlæsningskoncentrationen (200 pM anbefales), den ønskede tilsætning af PhiX i % (1 % anbefales som minimum) og indlæsningsvolumen (minimum 100 µl) i projektmappen for at beregne den passende fortynding for biblioteket.
8. Fortynd prøvepoolen til indlæsningskoncentrationen ved at kombinere reagenserne (se projektmappen) i et mikrocentrifugerør.
9. **Blandes ved invertering** (må IKKE køres i en vortexmixer), hvorefter røret køres i en rotator.

10. Stilles til side på is, indtil den skal indløses i iSeq-reagenskassetten med henblik på sekventering.

BEMÆRK: Poolerne kan opbevares ved -15 °C til -25°C i op til 48 timer forud for sekventeringen.

11. Indlæs 20 µl fortyndet prøvesamling i iSeq-kassetten efter instrumentprotokollen.

7. Sekvensanalyse

De oprettede Fastq-filer skal analyseres med AlloSeq Assign-softwaren. Procedurerne for anvendelsen af AlloSeq Assign-softwaren kan findes i *IFU094_AlloSeq Assign IFU CE IVD*.

8. Fejlfindingsvejledning

PROBLEM	MULIG ÅRSAG	Løsning
Lav eller ingen udbytte volumen fra bibliotheksklargøringen (påvist ved Qubit-kvantificering)	Dårlig kvalitet eller lav koncentration af DNA-inputtet	Foretag vurdering af DNA-kvaliteten ved brug af gelelektroforese. Intakt DNA bør være cirka 3 kB med få eller ingen tegn på udsmøring på gelen. Ekstrahér DNA'en igen, og gentag proceduren, hvis det er muligt.
	Der blev anvendt en forkert primær prøvetype.	Undlad at anvende blodprøver, som indeholder heparin. Ekstrahér igen DNA'en fra fuldblodet, der er konserveret med ACD eller EDTA, og gentag proceduren, hvis det er muligt.
	Tab af biblioteker under indfangningen	Se protokollen. Sørg for, at rensningstrinnene, som indeholder supernatant, og trin med bortskaffelse af supernatant udføres korrekt. Sørg for, at ætanolkoncentrationen er korrekt. Hvis der udelukkende anvendes vand, eller hvis der anvendes for meget vand, kan det eluere DNA'en for tidligt.
	Biblioteker ikke elueret fra de anvendte Capture Beads	Se protokollen. Sørg for at anvende elueringsbufferne i den rigtige rækkefølge. Sørg for tilstrækkelig fjernelse af reagenser/buffere forud for opslæmning og eluering. Undgå at tørre DNA'en eller perlebundet DNA for meget i forbindelse med tørretrinnene. Længere tids tørring af DNA-perlerne kan forringe opslæmningen og den efterfølgende ydeevne.
	Manglende tilsætning af vigtige reagenser (dvs. perler, indeksprimer, PCR-masterblanding osv.) eller anvendelse i den forkerte rækkefølge.	Se protokollen. Sørg for, at reagenserne tilsættes i den rigtige rækkefølge og i den rigtige volumen. Kontrollér, at de resterende reagensvoluminer ikke er for store. Gentag om nødvendigt proceduren.
	Forkerte inkuberings- eller cyklusbetingelser	Kontrollér betingelserne for den termiske cyklus: Tagmentation-program Indexing PCR-program
Lav eller ingen udbytte volumen fra berigelsen (påvist ved Qubit-kvantificering)	Tab af biblioteker under indfangningen	Kontrollér protokollen, og sørg for, at trinnene, der indeholder supernatant, og trinnene med bortskaffelse af supernatant udføres korrekt. Sørg for den rigtige koncentration af de fortyndede Purification Beads, og at ufortyndede Purification Beads (ikke rester af fortyndede perler) anvendes efter størrelsesvalget.

PROBLEM	MULIG ÅRSAG	Løsning
	Biblioteker ikke elueret fra de anvendte Capture Beads	Sørg for at anvende elueringsbufferne i den rigtige rækkefølge. Sørg for tilstrækkelig fjernelse af reagenser/buffere forud for opslæmning og eluering. Undgå at tørre DNA'en eller perlebundet DNA for meget i forbindelse med tørretrinnene. Længere tids tørring af DNA-perlerne kan forringe evnen til opslæmning af opløsningen og den efterfølgende ydeevne.
	Forkerte inkuberings- eller cyklusbetingelser	Kontrollér betingelserne for den termiske cyklus: Hybridisation-program PCR-program efter berigelse
Fragmenter af forkert størrelse efter bibliotheksklargøring eller berigelse (påvist ved fragmentanalyse)	Forkert forhold mellem prøve og Purification Beads.	Gentag protokollen. Sørg for, at perlerne anvendes i den korrekte koncentration på trinnene til størrelsesvalg og rensning i protokollen.
Sekventeringen mislykkedes		Kontrollér, at protokollen blev fulgt. Se den pågældende brugervejledning til den anvendte sekventeringsinstrumentmodel.
Lav dækning for målloci i Assign på trods af stor berigelsesvolumen.	Non-specifikke fragmenter indfanget på grund af lavere temperatur under trinnene til indfangning og opvarmet skylning.	Sørg for, at det Hybex-instrument, der anvendes til de opvarmede skylletrin kalibreres og vedligeholdes. Det er vigtigt at arbejde hurtigt under de opvarmede skylletrin for at sikre, at poolens temperatur ikke falder betydeligt.

9. Supplerende oplysninger

For den protokol, der er beskrevet i denne vejledning, er det en forudsætning, at du har gennemgået indholdet i dette afsnit, bekræftet og anskaffet alle påkrævede forbrugsmaterialer og alt påkrævet udstyr.

Licens

AlloSeq Tx-kittene indeholder Nextera Flex for Enrichment-reagenser, som fremstilles af Illumina Inc. og distribueres af CareDx Pty Ltd.

Påkrævede forbrugsmaterialer og påkrævet udstyr, som ikke medfølger

De forbrugsmaterialer og det udstyr, der er anført nedenfor, er påkrævet til gennemførelse af analysen, men de følger ikke med i AlloSeq Tx-kittet.

Protokollen er optimeret og valideret med de komponenter, der er anført nedenfor. En tilsvarende ydeevne kan ikke garanteres ved brug af andre forbrugsmaterialer og andet udstyr.

Forbrugsmateriale	Leverandør/varenr.
Vand af PCR-kvalitet	Sigma-Aldrich, W3500
Ren ætanol til molekylærbiologi	Generel laboratorieleverandør
Qubit™ dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Q32850 eller Q32853
Qubit™ prøverør	Thermo Fisher Scientific, Q32856
D1000 ScreenTape (valgfrit)	Agilent Technologies, 5067-5584
D1000 Reagents (valgfrit)	Agilent Technologies, 5067-5585
96-brøndprøveplader (valgfri)	Agilent Technologies, 5067-5150

Forbrugsmateriale	Leverandør/varenr.
Folieforsegling af 96-brøndplade (valgfri)	Agilent Technologies, 5067-5154
Optiske rørstrimler (8x strimmel) (valgfri)	Agilent Technologies, 401428
Optiske rørstrimmelhætter (8x strimmel) (valgfri)	Agilent Technologies, 401425
Et af nedenstående sekventeringsreagenskit:	
• MiSeq V2 Standard (300 cyklusser)	• Illumina, MS-102-2002
• MiSeq V2 Micro (300 cyklusser)	• Illumina, MS-103-1002
• MiSeq V2 Nano (300 cyklusser)	• Illumina, MS-103-1001
• MiniSeq Mid Output Kit (300 cyklusser)	• Illumina, FC-420-1004
• iSeq 100 i1 Reagent v2 (300 cyklusser)	• Illumina, 20031371
PhiX Control v3	Illumina, FC-110-3001
20 µl-spærrepipettespidser	Generel laboratorieleverandør
200 µl-spærrepipettespidser	Generel laboratorieleverandør
1000 µl-spærrepipettespidser	Generel laboratorieleverandør
Mikrocentrifugeringsrør på 1,5 ml	Generel laboratorieleverandør
5 ml-rør	Generel laboratorieleverandør
Koniske centrifugeringsrør på 15 ml	Generel laboratorieleverandør
Reagensbeholdere på 25 ml	Generel laboratorieleverandør
PCR 8-rørstrimler på 0,2 ml med hætter	Generel laboratorieleverandør
PCR-plader med 96 brønde	Generel laboratorieleverandør
Microseal 'B' selvklæbende forseglinger	Bio-Rad, MSB1001
Abgene™ 96 Well 0.8mL Polypropylene Deepwell Storage Plate (MIDI-plade, kun original arbejdsgang)	Thermo Fisher, AB0859 eller AB0765
Natriumhypoklorit (NaOCl) til sekventeringsskylning efter kørsel (valgfrit)	Sigma, 239305

Udstyr	Leverandør/varenr.
20 µl pipette	Generel laboratorieleverandør
200 µl pipette	Generel laboratorieleverandør
1000 µl pipette	Generel laboratorieleverandør
Pipetter på 20 µl med flere kanaler	Generel laboratorieleverandør
Pipetter på 200 µl med flere kanaler	Generel laboratorieleverandør
Mikrocentrifuge	Generel laboratorieleverandør
Mikropladecentrifuge	Generel laboratorieleverandør
Vortexmixer	Generel laboratorieleverandør
Valse til forseglingsfilm	Generel laboratorieleverandør
Indeks fastholdelsesplade	Illumina, FC-130-1005
Et af nedenstående magnetstativer:	
• DynaMag™-2 Magnet	Thermo Fisher, 12321D
• MagJET Separation Rack, 2 x rør på 1,5 ml	Thermo Fisher, MR01
Magnetic Stand-96	Thermo Fisher, AM10027
BioShake iQ, eller BioShake XP	BioShake iQ, 1808-0506 BioShake XP, 1808-0505
Agilent 2200 TapeStation System (valgfrit)	Agilent Technologies
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher
En af nedenstående thermocyclere til 96 brønde:	
• Veriti™ 96-Well Thermal Cycler	Thermo Fisher, 4375786
• Eppendorf Thermo Cycler	Eppendorf, 6325000560
Hybex System	SciGene, 1057-30-2
Hybex 1.5 ml tube block. (32 x rør på 1,5 ml).	SciGene, 1057-34-0
Et af nedenstående sekventeringsinstrumenter:	
• Illumina MiSeq	Illumina, SY-410-1003
• Illumina MiniSeq	Illumina, SY-420-1001
• Illumina iSeq	Illumina, 20021532

10. Kontaktoplysninger

Fabrikant:

CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Australien, 6160.
Tlf.: +61-8-9336-4212
E-mail: orders-aus@caredx.com
Hjemmeside: http://www.caredx.com

Distribueret af:

Asia Pacific (APAC)
CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Australien, 6160.
Tlf.: +61-8-9336-4212
E-mail: orders-aus@caredx.com
Hjemmeside: http://www.caredx.com

Europa, Mellemøsten og Afrika (EMEA)
CareDx AB,
Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Sverige.
Tlf.: +46-8-508 939 00
Fax: +46-8-717 88 18
E-mail: orders-se@caredx.com
Hjemmeside: http://www.caredx.com/

Nord- og Sydamerika
CareDx Lab Solutions Inc.,
901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
Tlf.: 1-877-OLERUP1
Fax: 610-344-7989
E-mail: orders-us@caredx.com
Hjemmeside: http://www.caredx.com

Teknisk support og rapportering af alvorlige hændelser:
E-mail: techsupport-global@caredx.com

Enhver alvorlig hændelse, der er opstået i forbindelse med udstyret, skal rapporteres til fabrikanten og de ansvarlige myndigheder i det medlemsland, hvor brugeren og/eller patienten er etableret.

Yderligere oplysninger kan findes på CareDx-hjemmesiden (https://www.caredx.com/contact-us/).

Tilknyttede produkter:
IVD'er med CE-mærkning:
AlloSeq Assign

11. Referencer

1. Teknisk meddelelse fra Illumina. **Nextera XT library prep: tips and troubleshooting** (06/29/18)
2. Teknisk meddelelse fra Illumina. **DNA/RNA isolation considerations for Illumina library preparation kits.** (12/21/18)
3. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. **PCR inhibitors – occurrence, properties and removal.** 2012 J Appl Micro. 113:1014-26 (se også henvisningerne deri)
4. Demeke T, Jenkins GR. **Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits**. Anal Bioanal Chem. 2009 396:1977-90.
5. Wilson IG. **Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification.** 1997 Appl Environ Micro. 63:3741-51 (se også henvisningerne deri)
6. Al-Soud WA, Rådström P. **Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples.** Appl Env Micro. 1998 64:3748-53.
7. Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadsö L, Steffen CR, Vallone PM, Rådström P. **Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR.** Anal Bioanal Chem. 2018 410:2569-83
8. Al-Soud WA, Rådström P. **Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells**. J Clin Micro. 2001 39:485-93
9. Yedidag EN, Koffron AJ, Mueller KH, Kaplan B, Kaufman DB, Fryer JP, Stuart FP, Abecassis M. **Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus.** Transplantation. 1996 27;62(2):238-42.
10. de Lomas JG, Sunzeri FJ, Busch MP. **False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder.** Transfusion. 1992 32:83-5.
11. Burgess LC, Hall JO. **UV Light Irradiation of Plastic Reaction Tubes Inhibits PCR**. Biotechniques. 1999 27:252-57.
12. Picelli S, Bjorklund AK, Reinius B, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. **Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects.** Genome Res. 2014 24:2033-44.
13. Steiniger M, Adams CD, Marko JF, Reznikoff WS. **Defining characteristics of Tn5 Transposase non-specific DNA binding.** Nucl Acid Res. 2006 34:2920-34.
14. **CareDx AlloSure Interfering Substances report** 2018.

Metodehistorik

Version	Dato	Ændring	Godkendt af
1.0	19. februar 2020	Første version af AlloSeq Tx IFU CE. Udgivet af E. Naughton den 19. februar 2020.	L. Westwood
1.1	28. april 2020	Tilføjede "AlloSeq Tx-analysen sekventerer DNA-fragmenter med en gennemsnitlig størrelse på 700 bp, hvilket vil sige, at der ikke kan foretages indfasning af polymorfier, hvor afstanden er større end 700 bp, hvilket kan resultere i heterozygote flertydigheder." til afsnittet Begrænsninger. Udgivet af E. Naughton den 29. april 2020.	L. Westwood
1.2	8. maj 2020	Opdatering af de forstyrrende stoffer. Udgivet igen af E. Naughton den 8. maj 2020.	L. Westwood
1.3	13. maj 2020	Tilføjede biotin til tabellen over forstyrrende stoffer. Tilføjede oplysninger om kontrolprøven til afsnit 1.9. Udgivet igen af E. Naughton den 14. maj 2020.	L. Westwood
1.4	20. maj 2020	Opdatering af afsnit 1.4 AlloSeq Tx-kittets indhold og opbevaringsbetingelser med følgende rettelser: 2x rør til Tagmentation Wash Buffer, 2x rør til Capture Wash Buffer. Udgivet igen af E. Naughton den 20. maj 2020.	L. Westwood
1.5	5. juni 2020	Foretog følgende ændringer: - Rettelse af H714 i reagenstabellen i afsnit 2.2. - Rettelse af henvisningen til hybrid indfangning i afsnit 3.0. - Rettelse af henvisningen til PhiX under Forbrugsmaterialer. - Tilføjelse af en henvisning til projektmapper i afsnit 3.1.5 og 3.2.5. Udgivet igen af E. Naughton den 5. juni 2020.	L. Westwood
1.6	20. oktober 2020	Tilføjede en note om brugen af NaOH. Udgivet igen af E. Naughton den 20. oktober 2020.	H. Hogan
2.0	26. marts 2021	Opdaterede distributøren fra Wien til Stockholm i afsnit 8.0 i henhold til CR 2020-097. Opdaterede iSeq-reagens v1 til ophørt og udskiftet med v2 i afsnit 7.0 i henhold til CR 2020-077. Rettede 25 til 12 frysning-optøningscyklusser i afsnit 1.4. Udgivet igen af S. Antony den 9. april 2021.	S. Carnachan
3.0	6May21	Opdaterede følgende: • Afsnit 1: Afsnittet Understøttende projektmapper flyttet til sektion 9; IFU095-5 tilføjet. Inkluderede forklaring vedrørende den originale kontra Early Pooling-arbejdsgangen. Tilføjede ASTX17.1(24)-B-IVD målrettet genindhold. Opdaterede formatering af indholdsfortegnelsen for Tx-kit. Tilføjede reference for bukkal-vatpind (RUO) Rettede detektionsgrænse for reflektering af DNA, ikke DNA koncentration. Tilføjede afsnit H318-advarsel for 2N NaOH, H351 og H373-fareadvarsler for Capture Beads, H351-advarsel for hybridiseringsbuffer 1; tilføjede sikkerhedsoplysninger om stopbuffer til tabellen. • Afsnit 2 – afsnittet Library Preparation (Early Pooling-arbejdsgang) er tilføjet • Afsnit 3 – afsnittet Hybrid Capture (Early Pooling-arbejdsgang) er tilføjet • Afsnit 4.1 – opdaterede beskrivelse af prøveklargøring for at passe med projektmappen. • Afsnit 4.2 – Indstillede B-indekser i tabel tilføjet, tidsestimering fra 2:45 timer til 1:50 timer er opdateret, centrifugetrin ændret fra 280 x g i 30 sekunder til 100 x g i 10 sekunder trin 9, 21f, centrifugetrin ændret fra 280 x g i 1 minut til 100 x g i 10 sekunder trin 29, centrifugetrin ændret fra 280 x g i 10 sekunder til 100 x g i 10 sekunder, trin 36, kommentaren 'gentag rysteproceduren i henhold til trin 35' i trin 36 er tilføjet	S. Carnachan

Version	Dato	Ændring	Godkendt af
		• Afsnit 4.4/5.7 – Broad Range (BR)-klarlæggelse i alle Qubit-reagenstabeller er inkluderet • Afsnit 5.3 – klarlæggelseskommentaren ”Hold (må ikke overskride 18 timer ved 62 °C, inklusive trin 4)” i programtabellen for hybridisering er inkluderet • Afsnit 5.8 – TabeStation-plade-/forseglingsreferencer til rør/hætter er rettet • Afsnit 6.0 – tabel fjernet. Denne tabel er i Afsnit 1.1 • Afsnit 6.2 – MiSeq-totalvolumen ændret fra 100 ul til 30 ul for at matche med projektmappen er ønsket • Afsnit 6.4 – kommentar for at klarlægge, at kun 20 ul af 100 ul fortyndet samling indlæses i iSeq • Afsnit 9 – ansvarsfralæggelsen ”Kun original arbejdsgang” for MIDI-pladen er tilføjet, natriumhypochlorit (NaOCl) for sekventeringsskylning efter kørsel er tilføjet • Afsnit 9 – MiSeq-reagensnavne ændret for at passe med Illumina-ordineringsoplysninger. MiSeq Reagent Kit v3 (600 cyklusser) for AlloSeq Tx 8 er tilføjet, ordingeringsoplysninger for Qubit-rør og TapeStation-rør/hætte/plade/folie er tilføjet Generelt: Tilføjede ASTX17.1(24)-B-IVD på forsiden "**Returner til opbevaring efter anvendelse for efterfølgende trin"** er tilføjet. Anbefalinger for reagenser, der skal tilbageholdes for rettelser af efterfølgende trin, mindre formatering, grammatik, tegnsætning og stavefejl i dokumentet. Tilføjede yderligere vejledning for ’grundig vortexblanding’ alle tilfælde af fin Purification Bead-anvendelse efterfulgt af feedback fra feltholdet. Rettede alle forekomster af 'hybex' til 'Hybex' og 'QuBit' til 'Qubit' og 'pulse spin' til 'pulse-spin'. Opdaterede afsnit 2.2 og 4.2 i tabellen for Stop Buffer og rettede Klargøring påkrævet til ’Ingen klargøring påkrævet’ Tilføjede ”importeret af” og symbol som per ISO 15223-1-2021 og IVDR Genudgivet af L.Langley 13. okt. ’21	
4.0	28Jan22	Rettede grammatik Rettede begrænsningserklæring om kvantificering af kontroller. Rettede ydeevneegenskaber, så de passer til indlægssedlen. Rettelser lavet som svar på ZD-2445 Baseret på den summative evaluering er afsnit 2.3 trin 8, 12, 18 og afsnit 4.3 trin 7 blevet opdateret med yderligere detaljer for blanding af Tagmentation Beads og Purification Beads. Opdaterede indholdet af kassen for at afspejle den opdaterede kitkonfiguration CR2020-096 (SCN 2021-08-13).	K. Hunter
5.0	31Mar22	Tilføjede Tx 17 (96) sæt A og B til produktkoder, målrettet genindhold, kitindhold. Detalje tilføjet i hele brugsanvisningen for at instruere om brugen af det præ-platerede indeks, især afsnit 2.2 og 4.2. Udgivet af E. Naughton d. 27. april 2022.	K. Hunter
6.0	13Jun22	Tilføjede Tx 9 (96) sæt A og B til produktkoder, målrettet genindhold, anvendelse. Fjernede ™ fra AlloSeq Tx logoet. Rettede OD-værdierne i interfererende stoffer. Afstemte frasering mellem projektmappe og IFU. Afsnit 5.2, punkt 12; ændrede volumen af ætanol fra 200 µl til 800 µl. Afsnit 10: Tilføjelse af vagtrapporteringskrav	K. Hunter