AlloSeqTx

Návod k použití

IFU095
Číslo verze: 6.0
Datum vydání: červenec 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,
Austrálie

CareDx AB,
Franzéngatan 5,
SE-112 51
Stockholm, Švédsko

EC REP

Qarad BV,
Cipalstraat 3,
2440 Geel,
Belgie

CareDx®
CareDx Pty Ltd

© 2022 CareDx, Inc. Všechny ochranné známky vlastní nebo licencuje společnost CareDx, Inc., nebo její přidružené společnosti. Všechna práva vyhrazena.

Obsah

1. Přehled ... 3
   1.1 Princip ... 3
   1.2 Zamýšlené použití ... 4
   1.3 Cílový genetický obsah AlloSeq Tx ... 4
   1.4 Obsah soupravy AlloSeq Tx a požadavky na skladování ... 4
   1.5 Omezení a kontraindikace ... 6
   1.6 Požadavky na vzorek ... 6
   1.7 Interferující látky ... 6
   1.8 Výkonová charakteristika ... 7
   1.9 Přesnost ... 8
   1.10 Specificita ... 8
   1.11 Reprodukovatelnost a opakovatelnost ... 9
   1.12 Mez detekce ... 9
   1.13 Předpoklady ... 9
   1.14 Bezpečnost ... 9
2. Příprava knihovny (pracovní postup Early Pooling) ... 13
   2.0 Úvod k protokolu ... 13
   2.1 Příprava vzorku ... 13
   2.2 Příprava knihovny ... 13
   2.3 Výběr velikosti a přečištění ... 16
   2.4 Kvantifikace Qubit (volitelně) ... 18
   2.5 Vizualizace TapeStation (volitelně) ... 19
3. Hybridní záchyt (pracovní postup Early Pooling) ... 20
   3.0 Úvod k protokolu ... 20
   3.1 Sondová hybridizace ... 20
   3.2 Záchyt ... 21
   3.3 PCR po obohacení ... 22
   3.4 Přečištění PCR po obohacení ... 23
   3.5 Kvantifikace Qubit ... 24
   3.6 Vizualizace TapeStation (volitelně) ... 25
4. Příprava knihovny (původní pracovní postup) ... 25
   4.0 Úvod k protokolu ... 25
   4.1 Příprava vzorku ... 26
   4.2 Příprava knihovny ... 26
   4.3 Výběr velikosti a přečištění ... 29
   4.4 Kvantifikace Qubit (volitelně) ... 30
   4.5 Vizualizace TapeStation (volitelně) ... 31
5. Hybridní záchyt (původní pracovní postup) ... 32
   5.0 Úvod k protokolu ... 32
   5.1 Sdružování vzorků ... 32
   5.2 Koncentrace poolu knihovny (volitelně) ... 32
   5.3 Sondová hybridizace ... 34
   5.4 Záchyt ... 35
   5.5 PCR po obohacení ... 36
   5.6 Přečištění PCR po obohacení ... 37
   5.7 Kvantifikace Qubit ... 38
   5.8 Vizualizace TapeStation (volitelně) ... 38
6. Sekvenování ... 40
   6.0 Úvod k protokolu ... 40

6.1 Příprava PhiX 40
6.2 Zřeďte a denaturujte pro MiSeq 41
6.3 Zřeďte a denaturujte pro MiniSeq 42
6.4 Zřeďte pro iSeq 43
7. Sekvenční analýza 44
8. Řešení problémů 44
9. Podpůrné informace 45
Licence 45
Potřebný spotřební materiál a vybavení, které nejsou součástí dodávky 45
10. Kontaktní informace 47
11. Odkazy 48

1. Přehled

1.1 Princip

AlloSeq Tx je název řady produktů pro cílené genetické sekvenování, které jsou určeny na pomoc při stanovení genetické kompatibility mezi pacienty indikovanými k transplantaci a potenciálními dárci. AlloSeq Tx využívá technologii hybridního záchytu k obohacení zájmových genů z přípravy celogenomové knihovny. Použití technologie hybridního záchytu přináší oproti tradičním long-range PCR technikám výhody z hlediska pracovního postupu a flexibility variabilního obsahu genů/sekvencí bez nutnosti upravovat pracovní postup.

Soupravy AlloSeq Tx obsahují:

- reagencie na přípravu celogenomových knihoven,
- biotinylované sondy pro záchyt cílových sekvencí a
- reagencie pro obohacení zachycených cílů pro sekvenování.

Sekvenování se provádí na sekvenátoru Illumina (MiSeq, MiniSeq nebo iSeq) a výsledné sekvenační údaje mají výstupní podobu fastq souborů, které se importují do softwaru AlloSeq Assign®, který pomáhá při genotypizaci.

Tento *návod k použití* popisuje postup použití produktové řady CareDx AlloSeq Tx. Genový obsah, na který se cíleně zaměřují jednotlivé konkrétní produkty AlloSeq Tx, je uveden níže v tabulce *Cílový genetický obsah*.

Dodávány jsou také excelové sešity ke každému procesu na pomoc při zpracování a evidenci laboratorních vzorků. Tyto sešity pomáhají s výpočtem objemu reagencie a s vytvářením seznamu vzorků pro sekvenování. K podpůrným materiálům patří sešity:

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

V tomto dokumentu jsou popsány dvě možnosti pracovního postupu: Původní pracovní postup a pracovní postup Early Pooling. Při pracovním postupu Early Pooling jsou vzorky ihned po indexaci sdruženy do jedné zkumavky pro všechny následující kroky. Pracovní postup Early Pooling eliminuje potřebu výběru velikosti a purifikace na destičkách a volitelného kroku koncentrace při zpracování > 12 vzorků/běh. Tento pracovní postup umožňuje uživateli odebrat vzorky až po sekvenování během jedné pracovní směny. Tento pracovní postup je vhodný pro laboratoře, které nevyužívají automatizaci a dávají přednost protokolu s kratší dobou práce, menší spotřebou spotřebního materiálu a o 46 % menším počtem pipetovacích kroků ve srovnání s původním pracovním postupem. *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD* by se měl používat ve spojení s pracovním postupem Early Pooling.

Formát originálního pracovního postupu na bázi destiček je vhodný pro laboratoře, které se rozhodnou tento postup automatizovat. *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD, IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD a IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD* by se měly používat ve spojení s originálním pracovním postupem.

Souprava je určena pro použití odbornými pracovníky v regulovaných laboratořích. S produkty manipulujte s náležitou opatrností a pozorností. Doporučujeme, aby se všichni uživatelé před zahájením pracovního postupu seznámili s celým dokumentem, zejména pak s částí *Bezpečnost*. Postupy pro použití softwaru AlloSeq Assign najdete v návodu k použití softwaru AlloSeq Assign.

1.2 Zamýšlené použití

AlloSeq Tx je název řady produktů pro cílené genetické sekvenování, které jsou určeny na pomoc při stanovení genetické kompatibility mezi pacienty indikovanými k transplantaci a potenciálními dárci; včetně sond pro cílené obohacení až 17 lokusů.

Typizační soupravy AlloSeq Tx 17 jsou kvalitativní testy pro DNA typizaci HLA-A, B, C, E, F, G, H, DRB1/3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, MICA a MICB používané jako pomocné při genetickém porovnávání při transplantaci orgánů nebo kmenových buněk.

Typizační soupravy AlloSeq Tx 9 jsou kvalitativní testy pro DNA typizaci HLA-A, B, C, DRB1/3/4/5, DQB1, a DPB1 používané jako pomocné při genetickém porovnávání při transplantaci orgánů nebo kmenových buněk.

Výrobek je určen pro použití se sekvenátory Illumina MiSeq, MiniSeq a iSeq společně s interpretačním softwarem AlloSeq Assign.

Zařízení je určeno pro použití řádně odborně připravenými pracovníky se znalostmi četnosti typů HLA v jejich populaci, v řádně regulovaných laboratořích provádějících typizaci tkáně (HLA) pro porovnávání dárců a příjemců pro účely transplantací.

Produkty AlloSeq Tx jsou určeny pouze pro odborné použití a nesmí se používat jako jediný základ pro přijímání klinických rozhodnutí. Soupravy AlloSeq Tx se nepoužívají pro diagnostiku onemocnění.

1.3 Cílový genetický obsah AlloSeq Tx

Název produktu	Kód produktu	Cílové geny	Velikost soupravy	Sekvenační kapacita
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(24)-IVD	HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA a MICB	příprava 24 knihoven 4 obohacení (6 až 24 vzorků na jedno obohacení)	≤ 24 vzorků na MiSeq Micro Flowcell ≤ 6 vzorků na MiSeq Nano Flowcell ≤ 24 vzorků na iSeq ≤ 24 vzorků na MiniSeq 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 a MICB	příprava 96 knihoven 8 obohacení (12 až 96 vzorků na jedno obohacení)	≤ 96 vzorků na MiSeq v2 Standard Flowcell ≤ 24 vzorků na MiSeq Micro Flowcell ≤ 6 vzorků na MiSeq Nano Flowcell ≤ 48 vzorků na iSeq ≤ 24 vzorků na MiniSeq 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 a -DPB1	příprava 96 knihoven 8 obohacení (12 až 96 vzorků na jedno obohacení)	≤ 96 vzorků na MiSeq Standard Flowcell ≤ 24 vzorků na MiSeq Micro Flowcell ≤ 6 vzorků na MiSeq Nano Flowcell ≤ 48 vzorků na iSeq ≤ 24 vzorků na MiniSeq MidOutput Flowcell
AlloSeq Tx 9	ASTX9.1(96)-B-IVD			

1.4 Obsah soupravy AlloSeq Tx a požadavky na skladování

Při skladování při níže uvedených teplotách mohou být součásti soupravy používány až do dne spotřeby uvedeného na vnějších obalech soupravy a vydrží až 12 cyklů zmrazení a rozmrazení. Soupravy/součásti je po použití nutno okamžitě vrátit do skladovacích podmínek.

V současné době stále probíhají zrychlené studie stability pro překročení tohoto časového horizontu. Potvrzující testování reálné doby sice probíhá, důrazně se však doporučuje, aby se tyto soupravy NEPOUŽÍVALY po dni spotřeby.

Box reagencií 1 z 5, skladujte při -15 až -25 °C

Reagencie	Množství (24 testů)	Velikost/typ zkumavky (24 testů)	Množství (96 testů)	Velikost/typ zkumavky (96 testů)
Tagmentation Beads	1	0,5 ml	1	1,5 ml
Tagmentation Buffer	1	0,5 ml	1	1,5 ml
PCR Mix-1	N/A	N/A	1	5 ml

Box reagencií 2 z 5, skladujte při 15 až 30°C

Reagencie	Množství (24 testů)	Velikost/typ zkumavky (24 testů)	Množství (96 testů)	Velikost/typ zkumavky (96 testů)
Stop Buffer	1	1,5 ml	2	2 ml
Tagmentation Wash Buffer	2	5 ml	1	50 ml

Box reagencií 3 z 5, skladujte při -15 až -25 °C

Reagencie	Množství (24 testů)	Velikost/typ zkumavky (24 testů)	Množství (96 testů)	Velikost/typ zkumavky (96 testů)
AlloSeq Tx Index Primers	1 sada (10x)	zkumavka FluidX	1 destička	96jamková destička

Box reagencií 4 z 5, skladujte při -15 až -25 °C

Reagencie	Množství (24 testů)	Velikost/typ zkumavky (24 testů)	Množství (96 testů)	Velikost/typ zkumavky (96 testů)
Sondy AlloSeq Tx specifické pro daný produkt	1	0,5 ml	1	0,5 ml
PCR Mix	1	1,5 ml	N/A	N/A
PCR Mix-2	N/A	N/A	1	0,5 ml
PCR Primers	1	0,5 ml	1	0,5 ml
Hybridisation Buffer 1	1	1,5 ml, kónická	1	1,5 ml, Kónická
Capture Wash Buffer	4	1,5 ml, jantarová kónická	8	1,5 ml, jantarová kónická
Capture Elution Buffer 1	1	0,5 ml	1	0,5 ml
2N NaOH	1	0,5 ml	2	0,5 ml

Box reagencií 5 z 5, skladujte při 2 až 8 °C

Reagencie	Množství (24 testů)	Velikost/typ zkumavky (24 testů)	Množství (96 testů)	Velikost/typ zkumavky (96 testů)
Purification Beads	1	5 ml	N/A	N/A
Purification Beads-1	N/A	N/A	3	5 ml
Purification Beads-2	N/A	N/A	1	0,5 ml
Resuspension Buffer	2	1,5 ml	2	5 ml
Capture Beads	1	1,5 ml	1	5 ml
Hybridisation Buffer 2	1	0,5 ml	1	0,5 ml
Capture Elution Buffer 2	1	0,5 ml	1	0,5 ml

1.5 Omezení a kontraindikace

- Důrazně doporučujeme, aby uživatel tyto soupravy před jejich zavedením v laboratoři validoval pomocí vzorků, jejichž genotyp byl určen jinými molekulárními postupy.
- Důrazně se doporučuje, aby uživatel dodržoval veškeré pokyny uvedené na štítcích produktů. Odchylky od předepsaného postupu se nedoporučují, nemusí být podporovány a mohou vést k chybám při typizaci.
- Doporučuje se, aby příprava každé knihovny zahrnovala pozitivní kontrolu (lidská DNA) a kontrolu negativní/bez templátu (pomocí sterilní vody místo DNA). Pozitivní kontrola musí vést ke kvantifikovatelné knihovně (měřené Qubit nebo pomocí metriky sekvenování pokrytí) a výsledná sekvence musí odpovídat předpokládanému genotypu vzorku. U negativní kontroly u každého experimentu nesmí existovat žádná kvantifikovatelná knihovna (měřeno Qubit nebo označeno v softwaru Assign za nízké pokrytí). Pokud u kontroly bez templátu vznikne kvantifikovatelná knihovna, je třeba běh opakovat.
- Test AlloSeq Tx sekvenuje fragmenty DNA o průměrné velikosti inzertu 500 bp, což znamená, že polymorfismy větší než 500 bp od sebe nelze fázovat, což může vést k heterozygotním nejednoznačnostem.

1.6 Požadavky na vzorek

Lidská genomická DNA o vysoké molekulové hmotnosti (suspendovaná v pufru Tris/EDTA a OD260/280 > 1,8) extrahovaná ze vzorků plné krve antikoagulovaných pomocí ACD nebo EDTA. NEPOUŽÍVEJTE vzorky plné krve s obsahem heparinu. Tuto metodu lze použít i pro DNA z bukálního stěru.

Důležité: Všechny odkazy na DNA z bukálního stěru v rámci tohoto dokumentu jsou určeny jako odkazy výhradně pro účely výzkumu. **DNA z bukálního stěru není s touto metodou validována pro diagnostické použití.**

1.7 Interferující látky

Společnost CareDx Pty Ltd identifikovala všechny potenciálně interferující látky, které mohou test ovlivnit. Viz tabulka níže.

Inhibitor	Potenciální zdroj	Riziko	Poznámky
EDTA	TE pufr, odběrové zkumavky	Velmi nízké	Resuspendujte DNA v Tris-HCl pH8 nebo TE s < 1 mM EDTA. Použijte komerční soupravy pro přípravu krevní DNA a/nebo se vyhněte odběrovým zkumavkám EDTA.
Alkoholy	Etanol, isopropanol, isoamylalkohol	Nízké	Dbejte, aby pelety nebo kuličky DNA byly vysušeny na vzduchu a zkontrolovány na přítomnost kapiček etanolu (1% etanol = 1,25ul 80% etanolu ve 100ul PCR reakci). V rámci protokolu AlloSeq Tx existuje několik kroků promývání 80% ethanolem, díky čemuž se riziko inhibice přenosem ethanolu snižuje, ale oproti jiným faktorům je o něco vyšší.
Přebytečné soli	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Velmi nízké	Zajistěte důkladné promytí pelet nebo kuliček DNA 80% etanolem. Zajistěte, aby OD 260/230 pro výchozí genomickou DNA bylo ~2.
Chaotropní soli	Guanidin hydrochlorid; MgCL2; močovina	Velmi nízké	Zajistěte důkladné promytí pelet nebo kuliček DNA 80% etanolem. Zajistěte, aby OD 260/230 pro výchozí genomickou DNA bylo ~2.
Fenol: chloroform	Organický přenos	Velmi nízké	Součást obecně používaného komerčního postupu extrakce DNA pomocí Trizol. Zajistěte důkladné promytí pelet nebo kuliček DNA 80% etanolem. Zajistěte, aby OD 260/230 pro výchozí genomickou DNA bylo ~2.

Inhibitor	Potenciální zdroj	Riziko	Poznámky
Proteiny	BSA, PEG, krevní albumin	Velmi nízké	Použijte komerční soupravy pro přípravu DNA z krve. Zajistěte, aby OD 260/280 výchozí genomické DNA bylo > 1,8.
Hem, hemoglobin, imunoglobuliny	Krev	Velmi nízké	Nepoužívejte krevní vzorky vykazující silnou hemolýzu. Použijte komerční soupravy pro přípravu DNA z krve. Zajistěte, aby OD 260/280 výchozí genomické DNA bylo > 1,8.
Detergenty/DDT	Deoxycholát sodný, sarkosyl, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, N-oktylglukosid	Velmi nízké	Zajistěte důkladné promytí pelet nebo kuliček DNA 80% etanolem. Zajistěte, aby OD 260/230 výchozí genomické DNA bylo ~2.
Proteázy	Proteináza K, manipulace se vzorky	Velmi nízké	Použijte komerční soupravy pro přípravu DNA z krve nebo slin. Stále mějte nasazené rukavice.
Nukleázy	Manipulace se vzorky, enzymy, mikrokoková nukleáza	Velmi nízké	Použijte komerční soupravy pro přípravu DNA z krve. Stále mějte nasazené rukavice.
Exogenní DNA/RNA	Přenos, kontaminace	Velmi nízké	Genomickou DNA připravujte ve vyhrazeném prostoru před PCR.
Nosiče	RNA, heparin, glykogen	Velmi nízké	Použijte komerční soupravy pro přípravu krevní DNA a/nebo se vyhněte odběrovým zkumavkám s heparinem.
Přebytek kovových iontů	Mg2+ z PCR pufru, ionty Fe	Velmi nízké	Zajistěte důkladné promytí pelet nebo kuliček DNA 80% etanolem. Zajistěte, aby OD 260/230 výchozí genomické DNA bylo ~2.
Antivirotika (např. acyclovir)	Krev	Velmi nízké	Použijte komerční soupravy pro přípravu DNA z krve. Zajistěte, aby OD 260/280 výchozí genomické DNA bylo > 1,8.
Pudr z rukavic	Pudrované rukavice	Velmi nízké	Používejte nepudrované rukavice.
PCR zkumavky ozářené UV	UV ošetření PCR zkumavek	Velmi nízké	Neošetřujte plastové nádobky pomocí UV.
Biotin	Z léčiv interagujících se streptavidinem	Velmi nízké	Protokol obsahuje mezi odběrem vzorku a krokem hybridního záchytu řadu purifikačních promytí, které umožní odstranění molekul biotinu. V případě zkoušky hybridním záchytem nepovede přítomnost biotinu (která je, jak je uvedeno výše, nepravděpodobná) k chybnému výsledku. Mohla by způsobit sníženou účinnost obohacení, která by byla detekována jako nízká výtěžnost obohacení, nebo bez výsledku.

1.8 Výkonová charakteristika

Výkonnost zkoušky byla posouzena pomocí panelu vzorků DNA se známými genotypy včetně interních kontrolních vzorků společnosti CareDx, referenčních standardů HLA podle International Histocompatibility Workshops (IHW) a vzorků získaných z mezinárodní burzy International HLA DNA Exchange, University of California, Los Angeles (UCLA). Příprava knihovny, obohacování a sekvenační výkon byly posouzeny podle stanovených kritérií přijatelnosti.

1.9 Přesnost

Produkt AlloSeq Tx společně se softwarem AlloSeq Assign jsou navrženy tak, aby splňovaly standard ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) a standard EFI (European Federation of Immunogenetics) pro HLA typizaci.

V rámci ověřovacích a validačních studií byl produkt AlloSeq Tx společně se softwarem AlloSeq Assign použit k posouzení genotypizační shody se vzorky typizovanými alternativní metodou. Interní kontrolní vzorky byly typizovány pomocí metody přímého sekvenování (sequence-based typing – SBT). V rámci ověřovacích studií byly použity vzorky z mezinárodně uznávaných úložišť IHW a UCLA typizované pomocí různých metod včetně SBT, SSP a SSO. Jedná se o charakterizované vzorky DNA, které představují nejčastější HLA alely a vybrané vzácné alely.

Shrnutí výsledků získaných z ověřovacích a validačních studií:

METRIKA	PANEL	VELIKOST PANELU (n)	VÝSLEDEK
Shoda genotypizace	Interní	190	100 %
Shoda genotypizace	UCLA	24	98,12 %
Shoda genotypizace	IHW	48	98,06 %
Shoda genotypizace	Betatestovací pracoviště	124	99,54 %
Celkem / celková shoda			**99,49%**

Ve všech případech, kdy byla v rámci ověřovacích/validačních studií pozorována neshoda, se má za to, že neshoda vyplývá z omezení předchozí typizační metody nebo technologie.

1.10 Specificita

Specificita v kontextu testů AlloSeq Tx assays popisuje podíl readů sekvence (představujících fragmenty DNA zachycené testem), které mapují na jiné než cílové lokusy. Prvek „nedostatku“ specificity bude vlastní všem HLA typizačním testům, které vycházejí z určité formy hybridizace mezi genomickou DNA a reagenciemi oligonukleotidové sekvence bez ohledu na to, zda jde o PCR testy, nebo testy s hybridním záchytem. To je výsledkem skutečnosti, že mnoho genů v lidském genomu je součástí vícegenových rodin. HLA geny nejsou výjimkou. HLA-A, -B a -C jsou součástí genové rodiny HLA 1. třídy. Kromě dobře známých genů však existují HLA pseudogeny a genové fragmenty a možné nepopsané funkční geny, které mohou být zachyceny inherentními charakteristikami specificity testů s hybridním záchytem. Celkový počet těchto genů není znám, ale liší se mezi genomy od různých jedinců.

Pro AlloSeq Tx je specificita zachycena jako „off target reads“. Cílem testu AlloSeq Tx je dosáhnout úrovně specificity, při níž:

1. nespecifické ready NEPOVEDOU k tomu, že cílové ready budou svým počtem příliš nízké na provedení přesné genotypizace,

2. nespecifické ready NEBUDOU přispívat ke konsenzuální sekvenci cílových lokusů,

3. vysoká specificita narušuje citlivost a některé oblasti alel nejsou zachyceny.

AlloSeq Assign dokáže identifikovat nespecifické/off-target ready a reprezentovat je vůči celkovému počtu zachycených readů. Tato data se používají jako metrika kontroly kvality pro výkonnost testu. Příliš vysoká nebo příliš nízká specificita může být známkou nesprávné hybridizační teploty, časů, problémů s reagenciemi a kvalitou sondy.

Z ověřovacích dat vyplývá, že specificita pouhých 12 % nemá na test vliv, přičemž typické hodnoty specificity leží v rozmezí od 64 do 92 %. Úplná specificita je nepravděpodobná a byla by ukazatelem možných problémů s kvalitou. Strategie provedení sond sice téměř vylučuje možnost chybějících alel, stále však patrně platí paradigma citlivosti vs.

specificity. To znamená: určitá míra snížené specificity zajistí úplnou citlivost a alely, včetně nových alel, budou sekvenovány úspěšně.

1.11 Reprodukovatelnost a opakovatelnost

Je prokázáno, že produkt AlloSeq Tx společně se softwarem AlloSeq Assign poskytuje ekvivalentní výsledky napříč dávkami v rámci lot-to-lot ověřovací studie a napříč laboratořemi, uživateli a přístroji, což bylo prokázáno při ověření a validaci na čtyřech externích pracovištích. U produktu AlloSeq Tx bylo ověřeno, že v opakovaných bězích pro stejný vzorek poskytuje ekvivalentní výsledky.

1.12 Mez detekce

Doporučené množství lidské genomické DNA o vysoké molekulové hmotnosti je 100–1000 ng. Interní testování ukázalo, že lze použít i vzorky s obsahem DNA již od 50 ng. Správné genotypy byly získány také z nekvalitní nebo stříhané DNA.

1.13 Předpoklady

- Přístroje jsou řádně zkalibrované, udržované a dle potřeby podléhají plánu údržby.
- Jsou zavedeny a kontrolovány standardní operační postupy (SOP).
- Soupravu používají odborně způsobilí a oprávnění pracovníci laboratoře.
- Reagencie se používají do uvedeného data spotřeby.
- Reagencie z různých dávek soupravy se nepoužívají společně. Toto může mít vliv na výkon soupravy.
- Používají se pouze reagencie zaznamenané jako reagencie, které nejsou součástí soupravy, avšak jsou požadovány.
- Dbá se na prevenci křížové kontaminace vzorků DNA nebo záměn vzorků.
- Ve všech fázích se dbá, aby nedocházelo k únikům.
- Spolu s tímto dokumentem se používají pracovní sešity dodané výrobcem.

1.14 Bezpečnost

Při provádění této procedury dodržujte obecně platné postupy laboratorní bezpečnosti a prevence kontaminace čistých prostor. Všechna rizika byla prostřednictvím procesu řízení rizik společnosti CareDx Pty Ltd zmírněna na přijatelnou mez. Aby nedocházelo k nebezpečným použitím, musí být dodržován návod k použití včetně přiložených pracovních sešitů. V této soupravě se nacházejí nebezpečné materiály. Přečtěte si prosím bezpečnostní listy a při manipulaci a odstraňování přijměte veškerá požadovaná opatření.

SOUČÁST SOUPRAVY	SYMBOL/PIKTOGRAMY	BEZPEČNOSTNÍ UPOZORNĚNÍ
TAGMENTATION BUFFER Obsahuje N,N-dimethylformamid		**Signální slovo:** Nebezpečí **Věty o nebezpečnosti:** H319 – Způsobuje vážné podráždění očí H332 – Zdraví škodlivý při vdechnutí H350 – Může způsobit rakovinu H360 – Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky **Pokyny pro bezpečné zacházení – EU (§28, 1272/2008)** P201 – Před použitím si obstarejte speciální pokyny P202 – Nepoužívejte, dokud si nepřečtete všechny pokyny pro bezpečné zacházení a neporozumíte jim P261 – Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů P270 – Při používání tohoto výrobku nejezte, nepijte ani nekuřte P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít P264 – Po manipulaci důkladně omyjte obličej, ruce a vystavenou pokožku

SOUČÁST SOUPRAVY	SYMBOL/PIKTOGRAMY	BEZPEČNOSTNÍ UPOZORNĚNÍ
		P272 – Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště P308 + P313 – PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření P304 + P340 – PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte jej v klidu v poloze usnadňující dýchání P313 – Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření P305 + P351 + P338 – PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. P337 + P313 – Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření P405 – Skladujte uzamčené P501 – Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení pro likvidaci odpadu
PCR MIX Obsahuje chlorid tetramethylamonný	 	**Signální slovo** Nebezpečí **Věty o nebezpečnosti** H302 – Zdraví škodlivý při požití H371 – Může způsobit poškození orgánů H412 – Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobým účinkem **Pokyny pro bezpečné zacházení – EU (§28, 1272/2008)** P260 – Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly P270 – Při používání tohoto výrobku nejezte, nepijte ani nekuřte P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít P264 – Po manipulaci důkladně omyjte obličej, ruce a vystavenou pokožku P272 – Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště P273 – Zabraňte uvolnění do životního prostředí P308 + P313 – PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření P301 + P312 – PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře P330 – Vypláchněte ústa P405 – Skladujte uzamčené P501 – Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení pro likvidaci odpadu
2N NaOH Obsahuje hydroxid sodný		**Signální slovo** Nebezpečí **Věty o nebezpečnosti** H314 – Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí H318 – Způsobuje vážné poškození očí **Pokyny pro bezpečné zacházení – EU (§28, 1272/2008)** P260 – Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly P264 – Po manipulaci důkladně omyjte obličej, ruce a vystavenou pokožku P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít P301 + P330 + P331 – PŘI POŽITÍ: vypláchněte ústa. NEVYVOLÁVEJTE zvracení P303 + P361 + P353 – PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte. P363 – Kontaminovaný oděv před opětovným použitím vyperte P310 – Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře P304 + P340 – PŘI VDECHNUTÍ: Přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte jej v klidu v poloze usnadňující dýchání

SOUČÁST SOUPRAVY	SYMBOL/PIKTOGRAMY	BEZPEČNOSTNÍ UPOZORNĚNÍ
		P305 + P351 + P338 – PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. P405 – Skladujte uzamčené P501 – Odstraňte obsah/obal v souladu s příslušnými místními, regionálními, vnitrostátními a mezinárodními předpisy
CAPTURE BEADS Obsahuje formamid		**Signální slovo** Nebezpečí **Věty o nebezpečnosti** H351 – Podezření na vyvolání rakoviny H360 – Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky H373 – Při dlouhodobé nebo opakované expozici může způsobit poškození orgánů **Pokyny pro bezpečné zacházení – EU (§28, 1272/2008)** P201 – Před použitím si obstarejte speciální pokyny P202 – Nepoužívejte, dokud si nepřečtete všechny pokyny pro bezpečné zacházení a neporozumíte jim P260 – Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly P270 – Při používání tohoto výrobku nejezte, nepijte ani nekuřte P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít P264 – Po manipulaci důkladně omyjte obličej, ruce a vystavenou pokožku P272 – Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště P308 + P313 – PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření P405 – Skladujte uzamčené P501 – Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení pro likvidaci odpadu
HYBRIDISATION BUFFER 1 Obsahuje formamid		**Signální slovo** Nebezpečí **Věty o nebezpečnosti** H351 – Podezření na vyvolání rakoviny H360 – Může poškodit reprodukční schopnost nebo plod v těle matky **Pokyny pro bezpečné zacházení – EU (§28, 1272/2008)** P201 – Před použitím si obstarejte speciální pokyny P202 – Nepoužívejte, dokud si nepřečtete všechny pokyny pro bezpečné zacházení a neporozumíte jim P261 – Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů P270 – Při používání tohoto výrobku nejezte, nepijte ani nekuřte P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít P264 – Po manipulaci důkladně omyjte obličej, ruce a vystavenou pokožku P272 – Kontaminovaný pracovní oděv neodnášejte z pracoviště P308 + P313 – PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření P405 – Skladujte uzamčené P501 – Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení pro likvidaci odpadu
STOP BUFFER Obsahuje dodecylsulfát sodný		**Signální slovo** Varování **Věty o nebezpečnosti** H319 – Způsobuje vážné podráždění očí **Pokyny pro bezpečné zacházení – EU (§28, 1272/2008)** P264 – Po manipulaci důkladně omyjte obličej, ruce a vystavenou pokožku

SOUČÁST SOUPRAVY	SYMBOL/PIKTOGRAMY	BEZPEČNOSTNÍ UPOZORNĚNÍ
		P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít P305 + P351 + P338 – PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně oplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. P337 + P313 – Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření

POZNÁMKA: Komponent „Purification Beads“ obsahuje azid sodný (< 0,1 %), který se nepovažuje za nebezpečný materiál podle ES 1272/2008 (CLP/GHS), směrnic 1999/45/ES a 67/548/EHS nebo US-OSHA (HCS 29 CFR 1910.1200) a UN GHS.

Další podrobné informace o všech nebezpečných materiálech v soupravě AlloSeq Tx najdete v bezpečnostním listu TEC478_AlloSeq Tx na adrese http://www.caredx.com.

2. Příprava knihovny (pracovní postup Early Pooling)

2.0 Úvod k protokolu

- Postupujte podle níže uvedeného protokolu AlloSeq Tx v uvedeném pořadí podle zadaných parametrů.
- Než budete pokračovat, zkontrolujte obsah sady a ujistěte se, zda máte potřebný spotřební materiál a vybavení.
- Pro snazší použití jsou kroky protokolu přípravy knihovny podrobně uvedeny také v sešitu *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. Odkazy této kapitoly 2 na pracovní sešit se týkají tohoto sešitu.

2.1 Příprava vzorku

1. Do sešitu zadejte ID experimentu, popis, operátora a datum.
2. Z rozbalovacího menu v pracovním sešitu vyberte sondu AlloSeq, která se má pro tento experiment použít.
3. Z rozbalovacího menu v sešitu vyberte používaný typ sekvenátoru. Po zvolení typu sekvenátpru se v sešitě zobrazí pokyny pro sekvenování.
4. V sešitu zadejte ID testovaných vzorků do žluté části v rozvržení destičky podle požadované konfigurace.

POZNÁMKA: Lze zadávat pouze alfanumerické znaky. Duplicitní ID vzorků budou označena červeně; toto označení upozorňuje uživatele, že je třeba provést opravu. Software sekvenátoru požaduje, aby byly v daném běhu používány pouze vzorky s jedinečným ID. Nezadávejte žádné informace pro jamky, které nemají obsahovat žádný vzorek.

5. V oranžovém rozevíracím seznamu v části Rozvržení destičky vyberte požadovanou sadu indexů.
6. V případě potřeby a při použití formátu indexových zkumavek lze pořadí indexů i7 upravit. Z rozevírací nabídky možností vyberte alternativní index i7, který se má použít pro požadovaný sloupec. Pokud jsou vybrány duplicitní indexy i7, budou buňky označeny červeně; toto označení upozorňuje uživatele, že je třeba provést opravu.
7. V případě potřeby a při použití formátu indexových zkumavek lze pořadí indexů i5 upravit. Z rozevírací nabídky možností vyberte alternativní index i5, který se má použít pro požadovaný řádek. Pokud jsou vybrány duplicitní indexy i5, budou buňky označeny červeně; toto označení upozorňuje uživatele, že je třeba provést opravu.
8. Po dokončení všech výše uvedených činností klikněte na záložku 1.2 SampleSheet a zkontrolujte ji. Červeným textem budou označeny případy, kdy jsou i nadále vyžadovány informace. Pokud není patrný žádný červený text, lze záložku SampleSheet uložit ve formátu CSV (čárkou oddělené hodnoty) (*.csv) Soubor uložte jako „SampleSheet.csv“. Při uložení ve formátu csv se uloží pouze aktivní záložka. Otevřete uložený soubor SampleSheet.csv v programu Excel a odstraňte všechny prázdné řádky v tabulce [Data], tj. všechny řádky mezi 22 až 117, které neobsahují informace o vzorku. Po provedení těchto úkonů soubor uložte. Seznam vzorků je připraven k importu pro sekvenování na sekvenátoru Illumina.

2.2 Příprava knihovny

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na vzorek (µl)	Požadovaná příprava
Tagmentation Buffer	-15 °C až -25 °C BOX 1	10	Uveďte na pokojovou teplotu.
Sterilní voda	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	30	Příprava není nutná.
Tagmentation Beads	-15 °C až -25 °C BOX 1	10	**Uveďte na pokojovou teplotu, nejméně 30 minut.**

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na vzorek (µl)	Požadovaná příprava
Stop Buffer	15°C až 30°C BOX 2	10	Příprava není nutná.
Tagmentation Wash Buffer	15°C až 30°C BOX 2	300	Příprava není nutná.
PCR Mix (nebo PCR Mix-1 pro 96 testů)	-15 °C až -25 °C BOX 4 (nebo Box 1 pro PCR Mix-1)	20	Rozmrazte a uchovávejte na ledu. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**
Indexy: **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 až -25 °C BOX 3	Celkem 10	Rozmrazte a uchovávejte na ledu.

2. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
3. Vezměte požadovanou 96jamkovou Half-Skirted Plate, Microseal B a mikrocentrifugační zkumavky 1,5 ml.

POZNÁMKA: Až do indexování PCR není žádný bezpečný bod zastavení. Proces trvá přibližně **1:50** hod. (včetně 50 minut termocyklování PCR).

4. Pro každý vzorek DNA přidejte alikvotní část 10 µL z 10–100ng/µl vzorku do příslušné jamky PCR destičky podle rozložení destičky na listu 1.0 Sample_Prep.
5. Připravte 40 µl Tagmentation Master Mixu na jeden vzorek pomocí: 10 µl Tagmentation Bufferu, 20 µl sterilní vody a 10 µl Tagmentation Beads.
6. Promíchejte tento master mix vortexováním a následným pulzním odstředěním.
7. Pipetou přeneste 40 µl Tagmentation Master Mixu do každé jamky, která obsahuje vzorek DNA.
8. Destičku utěsněte fólií Microseal B.
9. Proveďte odstředění destičky při 100 x g po dobu 10 sekund tak, aby se všechny reagencie shromáždily na dně jamky.
10. K promíchání použijte destičkovou třepačku při 1800 ot/min po dobu 1 minuty.
11. Destičku vizuálně zkontrolujte:
    a) Pokud v jamce nejsou kuličky rovnoměrně rozloženy, opakujte protřepání podle kroku č. 10.
    b) Pokud se materiál nenachází na dně jamky nebo se rozstříkl na fólii Microseal B film, proveďte pulzní odstředění a opakujte protřepání podle kroku č. 10.
12. Vložte destičku do termocykleru a spusťte program Tagmentation s víkem zahřátým na 105 °C a reakčním objemem 50 µl:

Teplota	Čas
55 °C	5 minut
10°C	2 minuty

13. Po skončení programu destičku z termocykleru ihned vyjměte a nechte ji při pokojové teplotě po dobu 2 minut.

14. Odstraňte fólii Microseal B.
15. Do každé reakční jamky přidejte 10 µl Stop Bufferu.
16. Destičku znovu utěsněte novou fólií Microseal B.
17. K promíchání použijte destičkovou třepačku při 1800 ot/min po dobu 1 minuty.
18. Destičku inkubujte dalších 5 minut při pokojové teplotě.
19. Během inkubace vyjměte PCR Mix a Indexy z mrazničky k rozmrazení a následně je umístěte na led/chladicí stojan.
20. Proveďte vizuální kontrolu destičky. Pokud se materiál nenachází na dně jamky nebo se rozstříkl na fólii Microseal B film, proveďte pulzní odstředění destičky.
21. Třikrát promyjte pomocí Tagmentation Wash Bufferu níže popsaným způsobem:
    a) Odstraňte fólii Microseal B a destičku umístěte na 30 sekund na Magnetic Stand-96 tak, aby se kuličky shromáždily v jamkách podél magnetu.
    b) Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte v jamkách podél magnetu.
    c) Do každé jamky pomalu přidejte 100 µl pufru Tagmentation Wash Buffer.
    d) Destičku znovu těsně překryjte fólií Microseal B a dbejte, aby byla fólie správně upevněna.
    e) Pomocí destičkové třepačky míchejte při 1800 ot/min po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
    f) **UPOZORNĚNÍ:** Pokud došlo k odstříknutí vzorku na těsnicí fólii, před sejmutím fólie odstřeďte destičku při 100 x g na dobu 10 sekund.
    g) Kroky a) až f) opakujte ještě dvakrát tak, aby proběhla celkem 3 promytí.

POZNÁMKA: Před odstraněním supernatantu ze třetího promytí připravte níže uvedeným způsobem PCR master mix.

22. Připravte 40 µl PCR master mixu pomocí 20 µl sterilní vody a 20 µl PCR Mixu. (nebo PCR Mix-1 při použití 96 testovacích souprav).

POZNÁMKA: PCR Mix se používá pro další kroky protokolu. Tuto lahvičku nevyhazujte.

23. Odstraňte fólii Microseal B a destičku umístěte na 30 sekund na Magnetic Stand-96 tak, aby se kuličky shromáždily v jamkách podél magnetu.
24. Pipetou nastavenou na 100 µl odsajte a odstraňte supernatant z posledního promytí Tagmentation Wash.
25. Vyjměte destičku z magnetického stojanu.
26. Do každé jamky přidejte 40 µl PCR master mixu.
27. Destičku utěsněte fólií Microseal B.
28. Destičkovou třepačkou promíchejte při 1800 ot/min po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
29. Destičku odstřeďujte při 100 x g po dobu 10 sekund tak, aby se kuličky suspendovaly v PCR master mixu.

Pro indexové zkumavky (T),

30. (T) Indexové zkumavky vortexujte a pulzně odstřeďte tak, aby byl veškerý objem na dně zkumavky.
31. (T) Odstraňte z destičky se vzorky fólii Microseal B.
32. (T) Do každé jamky přidejte 5 µl indexu i7 podle rozvržení destičky na listu 1.0 Sample_Prep.
33. (T) Do každé jamky přidejte 5 µl indexu i5 podle rozvržení destičky na listu 1.0 Sample_Prep.

<u>Pokračujte krokem 34.</u>

Pro indexové destičky (P),

30. (P) K promíchání pro indexovou destičku použijte destičkovou třepačku při 1800 ot/min po dobu 1 minuty.
31. (P) Proveďte odstředění indexové destičky při 100 x g po dobu 10 sekund tak, aby se všechny reagencie shromáždily na dně jamky.
32. (P) Odstraňte z destičky se vzorky fólii Microseal B.
33. (P) **Zkontrolujte, že je destička správně orientovaná, a že používáte správnou sadu indexů. Neodlepujte fóliové těsnění.** Probodněte fóliové těsnění indexové destičky hrotem. Pomocí nového hrotu přeneste 10 µL

promíchaných indexů z každé indexové destičky do každé jamky se vzorkem podle rozvržení destičky na listu 1.0 Sample_Prep.
Pokračujte krokem 34.

34. Utěsněte novou fólií Microseal B.
35. Destičkovou třepačkou promíchejte při 1800 ot/min po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.
36. Proveďte odstředění destičky při 100 x g po dobu 10 sekund tak, aby se všechny reagencie shromáždily na dně jamky. Vizuální kontrolou ověřte, zda jsou kuličky stále rovnoměrně rozmístěny v roztoku. Pokud kuličky nejsou rovnoměrně rozloženy, zopakujte protřepávání podle kroku 35.
37. Vložte destičku do termocykleru a spusťte program Indexing PCR s víkem zahřátým na 105 °C a při reakčním objemu 50 µl:

Č.	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Gap fill	72°C	3 minuty	1
2	Výchozí denaturace	98°C	3 minuty	1
3	Denaturace	98°C	20 sekund	9
4	Nasedání	60°C	30 sekund	
5	Extenze	72°C	3 minuty	
6	Závěrečná extenze	72°C	3 minuty	1
7	Závěrečné ustálení	10°C	Ustálení teploty	1

POZNÁMKA: Bod bezpečného zastavení. Knihovny lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 týdne.
POZNÁMKA: Pokud se okamžitě pokračuje výběrem velikosti a přečištěním, dbejte, aby byly Purification Beads před použitím uvedeny na pokojovou teplotu.

2.3 Výběr velikosti a přečištění

1. Pro optimální výtěžek a výběr velikosti se objem vzorku, kuliček a supernatantu mění podle velikosti série. V níže uvedené tabulce jsou uvedeny objemy testované pro specifikovaný rozsah vzorků na jeden běh.

Objemy reagencií pro výpočty	6–24 Vzorky/Pool	25–48 Vzorky/Pool	49–96 Vzorky/Pool
Počet vzorků, které mají být sdruženy (max. počet uvedený pro rozsahy)	24	48	96
Objem knihovny, která se má sloučit na vzorek (µl)	10	5	2,5
Objem naředěných kuliček na vzorek (µl)	50	25	12,5
Objem přeneseného supernatantu na vzorek (µl)	55	27,5	13,75
Objem čistých kuliček na vzorek, krok 8 (µl)	4,4	2,2	1,1

2. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na vzorek (µl)	Požadovaná příprava
Purification Beads (Purification Beads – 1 pro 96 testovacích souprav)	2 °C až 8 °C BOX 5	24,7	Uveďte na pokojovou teplotu, nejméně 30 minut. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**
Sterilní voda	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	Různé	Příprava není nutná.

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na vzorek (µl)	Požadovaná příprava
100% etanol	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	1920	Níže popsaným způsobem připravte 80% etanol.
Resuspension Buffer	2°C až 8°C BOX 5	Různé	Uveďte na pokojovou teplotu. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**

3. Připravte zředěné kuličky Purification Beads pomocí kuliček Purification Beads a sterilní vody s použitím objemů vypočtených podle *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD***.** Před použitím kuličky Purification Beads důkladně promíchejte.
4. Připravte 2400 µl čerstvého 80% ethanolu na jeden pool, tj. dostatečné množství na 2 promytí, pomocí 1920 µl 100% ethanolu a 480 µl sterilní vody.

POZNÁMKA: Počet poolů na experiment je ve žluté buňce přednastaven na 1 v kroku 3 sešitu. V případě potřeby lze tuto funkci manuálně zrušit. Úpravou této buňky se aktualizuje počet poolů pro následující kroky tohoto protokolu/sešitu. Pokud má být v tomto experimentu proveden více než 1 pool se stejným počtem vzorků v každém poolu, měl by být objem kuliček Purification Beads odpovídajícím způsobem zvýšen (tj. zdvojnásoben pro dva pooly) a níže uvedené pokyny by měly být provedeny v plném rozsahu pro každý pool.

Pokud je požadováno více poolů s různým počtem vzorků, měla by být tato záložka v sešitě duplikována a žlutě označené buňky by měly být aktualizovány tak, aby odrážely počet vzorků, aby byly správně upraveny objemy požadovaných/převáděných reagencií. Chcete-li záložku duplikovat, klikněte pravým tlačítkem myši na některou ze záložek a vyberte možnost „Přesunout nebo kopírovat“, ze seznamu vyberte možnost „3.0 SS_Purification“, zaškrtněte políčko „Vytvořit kopii“ a klikněte na tlačítko „OK“.

5. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
6. Vezměte zkumavky o objemu 1,5 ml (**volitelně:** Preferenčně lze použít 2ml zkumavky, v takovém případě je třeba navýšit množství ethanolu k promytí z 1200 µl na 1500 µl v kroku 20a níže).

POZNÁMKA: Proces trvá přibližně **1** hodinu.

7. Alikvotně odměřte příslušný objem (viz tabulka výpočtů výše nebo pracovní sešit) zředěných kuliček Purification Beads do 1,5ml zkumavky.
8. Pipetou smíchejte kuličky Tagmentation Beads a supernatant z indexovací PCR **nebo** indexovací PCR destičku protřepávejte po dobu 1 minuty při 1800 ot/min a poté přidejte příslušný objem každého vzorku (viz tabulka výpočtů výše nebo pracovní sešit) do zkumavky obsahující zředěné kuličky Purification Beads.
9. Každou zkumavku vortexujte po dobu 10 sekund, dokud se vzorek při vizuální kontrole nezdá být homogenní.
10. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Během této inkubace se na kuličky navážou největší fragmenty.
11. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
12. Umístěte zkumavku na 2,5 minut na magnet, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu. Pokud je supernatant stále zakalený, ponechejte ho na magnetu, dokud se nevyčistí.
13. **Přeneste** příslušný objem supernatantu (viz tabulka výpočtů výše nebo pracovní sešit) do nové zkumavky.
14. Přidejte příslušný objem (viz tabulka výpočtů výše nebo pracovní sešit) kuliček Purification Beads (nezředěných) do zkumavky se supernatantem.
15. Vortexujte každou zkumavku vysokou rychlostí po dobu 10 sekund.
16. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Během této inkubace se na kuličky vážou fragmenty cílové velikosti.
17. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
18. Umístěte zkumavku na 2,5 minut na magnet, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu. Pokud je supernatant stále zakalený, ponechejte ho na magnetu, dokud se nevyčistí.
19. Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.

20. Zkumavku nechte na magnetu a dvakrát ji promyjte 80% etanolem:
    a) Do každé zkumavky přidejte 1200 µl 80% ethanolu,
    b) Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30 sekund.
    c) Pipetou odsajte a odstraňte veškerý supernatant.
    d) Kroky a) až c) opakujte ještě tak, aby proběhla celkem 2 promytí.
21. Pipetou P20 odstraňte veškerý zbylý supernatant.
22. Zkumavku vysušte vzduchem na dobu 5 minut při pokojové teplotě tak, aby se odpařil zbytkový alkohol.
23. Sejměte zkumavku z magnetu a přidejte do každé zkumavky 37 µl Resuspension Bufferu pro eluci cílových fragmentů.
24. Vortexujte každou zkumavku vysokou rychlostí po dobu 10 sekund.
25. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
26. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
27. Umístěte zkumavku na 30 sekund na magnet, aby se kuličky mohly ve zkumavkách shromáždit podél magnetu.
28. **Přeneste** 35 µl supernatantu do nové 1,5ml zkumavky pro skladování. Tento pool může pokračovat až do hybridizace.

POZNÁMKA: Bod bezpečného zastavení. Knihovny lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 měsíce.

2.4 Kvantifikace Qubit (volitelně)

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
Pufr Qubit BR	-25°C až 30°C Zajistí uživatel.	199	Příprava není nutná.
Barvivo Qubit BR	-25°C až 30°C Zajistí uživatel.	1	Příprava není nutná.
BR Standard #1	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	10	Uveďte na pokojovou teplotu.
BR Standard #2	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	10	Uveďte na pokojovou teplotu.

2. Vezměte požadované zkumavky Qubit a 1,5ml nebo 5ml zkumavku pro přípravu pracovního roztoku v závislosti na požadovaném objemu.
3. Připravte dvě zkušební zkumavky pro standardy a jednu pro každý pool.
4. Připravte 200 µl pracovního roztoku Qubit pomocí 199 µl pufru Qubit a 1 µl barviva Qubit na každý kvantifikovaný pool/standard.
5. Vortexujte pracovní roztok na 2–3 sekundy a následně jej pulzně odstřeďte.
6. Alikvotně odměřte do každé zkumavky Standardu **190 µl** pracovního roztoku.
7. Alikvotně odměřte do každé zkumavky s poolem **198 µl** pracovního roztoku.
8. Alikvotně odměřte do každé zkumavky s příslušným standardem **10 µl** roztoku Standard.
9. Alikvotně odměřte **2 µl** každého poolu do příslušné zkumavky.
10. Vortexujte všechny zkumavky na 2–3 sekundy a následně je pulzně odstřeďte.
11. Zkumavky inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
12. Vložte zkumavky do fluorometru Qubit a odečtěte hodnoty (další informace naleznete v protokolu výrobce fluorometru Qubit).
13. Pro výpočet průměru na jeden pool zaznamenejte hodnoty Qubit do tabulky v pracovním sešitu.

POZNÁMKA: Předpokládaná výtěžnost knihovny činí cca 30–100 ng/µl, může se však lišit podle kvality a vstupu DNA. Předpokládá se, že výtěžnost 10 ng/µl a vyšší poskytne uspokojivé výsledky obohacení.

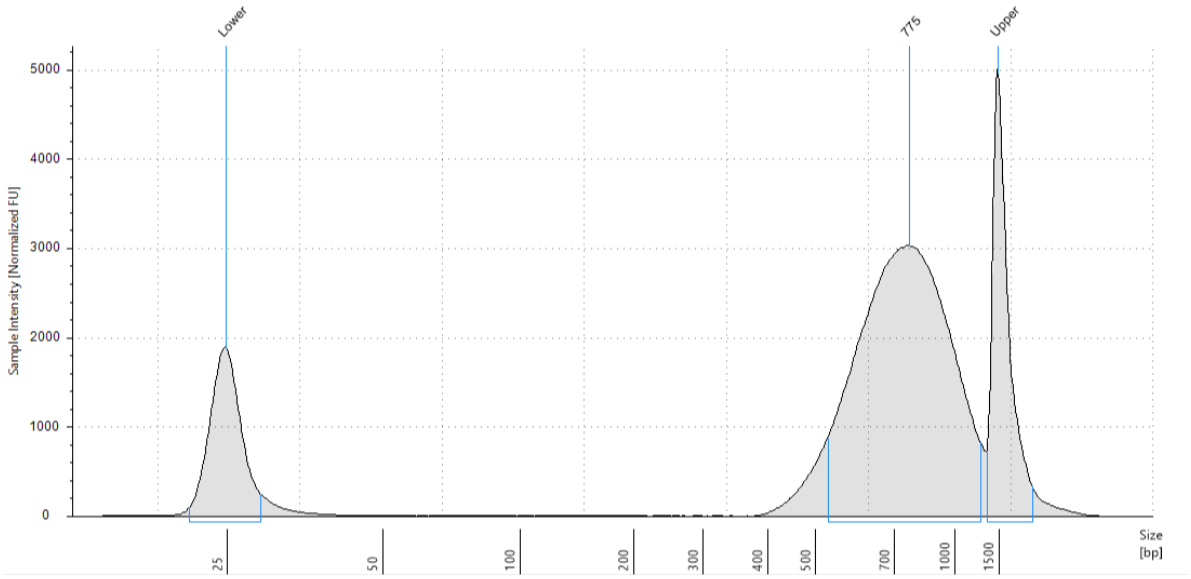
2.5 Vizualizace TapeStation (volitelně)

POZNÁMKA: Po validaci ze strany uživatele mohou být používány alternativní systémy pro vizualizaci fragmentů, jako např. Fragment Analyzer, Bioanalyzer apod.

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na vzorek (µl)	Požadovaná příprava
D1000 Ladder	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	1	Uveďte na pokojovou teplotu.
D1000 Sample Buffer	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	3	Uveďte na pokojovou teplotu.

2. Vezměte požadovanou D1000 ScreenTape, stripy a víčka optických zkumavek TapeStation.
3. Přeneste 1 µl každého vzorku do nové zkumavky.
4. Do referenční zkumavky přidejte 1 µl D1000 Ladder.
5. Přidejte 3 µl pufru vzorku D1000 do každé jamky se vzorkem a do referenční zkumavky.
6. Uzavřete všechny zkumavky víčkem.
7. Všechny zkumavky důkladně promíchejte pomocí vortexu IKA při 2000 ot/min po dobu 1 minuty.
8. Krátce odstřeďte tak, aby se všechny vzorky nacházely na dně jamek.
9. Odklopte víčka a vložte zkumavky se vzorky do přístroje 2200 TapeStation.
10. Na ovládacím softwaru přístroje 2200 TapeStation vyberte požadované zkumavky a spusťte (další informace najdete v uživatelské příručce TapeStation).
11. Po dokončení běhu zobrazte výsledky spuštěním TapeStation Analysis Software (další informace najdete v uživatelské příručce TapeStation).
12. Výsledek zaznamenejte do pracovního sešitu.



Obrázek 2.5.1: Reprezentativní obrázek trasování knihoven v TapeStation.

3. Hybridní záchyt (pracovní postup Early Pooling)

3.0 Úvod k protokolu

- Postupujte podle níže uvedeného protokolu AlloSeq Tx v uvedeném pořadí podle zadaných parametrů.
- Než budete pokračovat, zkontrolujte obsah sady a ujistěte se, zda máte potřebný spotřební materiál a vybavení.
- Pro snazší použití jsou kroky protokolu hybridního záchytu podrobně uvedeny také v sešitu *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. Odkazy této kapitoly 3 na pracovní sešit se týkají tohoto sešitu.

3.1 Sondová hybridizace

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
AlloSeq Tx Probe Panel	-15 °C až -25 °C BOX 4	10	Uveďte na pokojovou teplotu.
Hybridisation Buffer 1	-15 °C až -25 °C BOX 4	50	Umístěte na 15 minut do Hybexu při teplotě 58 °C Promíchejte na vortexu a vizuálně zkontrolujte; pokud přetrvává precipitát, inkubujte při 58 °C dalších 15 minut.
Hybridisation Buffer 2	2°C až 8°C BOX 5	10	Uveďte na pokojovou teplotu.

2. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
3. Vezměte potřebné PCR zkumavky/stripy a uzávěry.

POZNÁMKA: V protokolu záchytu neexistuje až do jeho dokončení žádný bezpečný bod zastavení. Pooly vzorků musí postupovat přímo z kroku ustálení teploty (hold) 62 °C v rámci hybridizační termocyklické reakce do kroků záchytu kuliček a vymytí s ohřevem.

POZNÁMKA: Příprava procesu trvá přibližně 20 minut a další nejméně 1,5 hodiny a nejvýše 18 hodin v termocykleru (reakce ponechané přes noc nebo trvající až 18 hodin musí být v kroku závěrečného ustálení (final hold) podrženy při teplotě 62 °C).

4. Pro každou hybridizační reakci zkombinujte do PCR zkumavky/stripu následující reagencie v níže uvedeném pořadí:

Reagencie	Objem na jeden pool (µl)
Pool knihoven vzorku	30
AlloSeq Tx Probe Panel	10
Hybridisation Buffer 1	50
Hybridisation Buffer 2	10
Celkem	100

5. Pipetou nastavenou na 70 µl každou hybridizační reakci 10krát dobře promíchejte, utěsněte a následně pulzně odstřeďte.
6. Pokud roztok zůstane zakalený, promíchejte jej pipetou ještě 6 až 8krát, utěsněte a následně pulzně odstřeďte.
7. Vložte zkumavku/strip do termocykleru a spusťte program Hybridisation s víkem zahřátým na **100 °C** a reakčním objemem 100 µl:

Č.	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Denaturace	98°C	5 minut	1
2	Snižování	98 °C – 62 °C, snižování po 2 °C/cyklus	1 minuta	1
3	Přejděte na krok 2 po dalších 18 cyklů (celkem 19 cyklů) se snižováním po 2 °C/cyklus.			
4	Hybridizace	62°C	**60 minut**	1
5	Závěrečné ustálení	62°C	Ustálení (nepřekračujte 18 hodin při 62 °C včetně kroku č. 4)	1

8. Nechte zkumavku/strip v termocykleru, dokud nebudete připraveni pokračovat v záchytu. Zkontrolujte, zda záchytné kuličky dosáhly pokojové teploty a zda jsou Capture Wash Buffer a Hybex ohřáty na 58 °C.

3.2 Záchyt

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
Capture Beads	2°C až 8°C BOX 5	250	**Uveďte na pokojovou teplotu, nejméně 30 minut.**
Capture Wash Buffer	-15 °C až -25 °C BOX 4	800	**Před použitím předehřejte na 58 °C.**
Capture Elution Buffer 1	-15 °C až -25 °C BOX 4	28,5	Uveďte na pokojovou teplotu.
2N NaOH	-15 °C až -25 °C BOX 4	1,5	Uveďte na pokojovou teplotu. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**
Capture Elution Buffer 2	2°C až 8°C BOX 5	4	Uveďte na pokojovou teplotu.

2. Pro každý pool, v němž má být proveden záchyt, si připravte eluční master mix:

Reagencie	Objem na jeden pool (µl)
Capture Elution Buffer 1	28,5
2N NaOH (čerstvý)	1,5

POZNÁMKA: Roztok NaOH snadno absorbuje CO_2 z ovzduší, čímž mění pH a chování reagencie. Dbejte, aby byla zkumavka s 2N NaOH těsně uzavřená, když se nepoužívá.

3. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
4. Vezměte potřebné 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky, PCR zkumavky/stripy a uzávěry.

POZNÁMKA: Tento proces trvá přibližně **1** hodinu.

5. Pro každou hybridizační reakci přidejte 250 µl Capture Beads do čerstvé 1,5ml zkumavky.
6. **Přeneste** 100 µl každé hybridizační reakce do příslušné zkumavky obsahující Capture Beads.
7. Vortexujte zkumavku vysokou rychlostí po dobu 10 sekund. Nepoužívejte centrifugu nebo pulzní odstředění.
8. Zkumavku 15 minut inkubujte v Hybexu při 58 °C.
9. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
10. Zkumavku okamžitě umístěte na 30 sekund na magnet, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu.
11. Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.
12. Třikrát promyjte zahřátým Capture Wash Bufferem níže popsaným způsobem:

POZNÁMKA: Pokud se pufr Capture Wash Buffer nepoužívá, nechte jej uložený v Hybexu tak, aby si udržel teplotu 58 °C. Vytahujte jej z Hybexu pouze bezprostředně před přidáním do reakce v kroku 12b a 14. Při provádění kroků promývání s ohřevem postupujte rychle, aby se minimalizovala doba, po kterou je pool/pufr při pokojové teplotě.

a) Vyjměte zkumavku z magnetu.
b) Přidejte 200 µl ohřátého pufru Capture Wash Buffer (58 °C).
c) Vortexujte zkumavku vysokou rychlostí po dobu 10 sekund. Nepoužívejte centrifugu nebo pulzní odstředění.
d) Zkumavku 5 minut inkubujte v Hybexu při 58 °C.
e) Zkumavku pulzně odstřeďte a okamžitě umístěte na 30 sekund na magnet, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu.
f) Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.
g) Kroky a) až f) opakujte ještě dvakrát tak, aby proběhla celkem 3 promytí.

13. Vyjměte zkumavku z magnetu.
14. Přidejte 200 µl ohřátého pufru Capture Wash Buffer (58 °C).
15. Vortexujte zkumavku vysokou rychlostí po dobu 10 sekund. Nepoužívejte centrifugu nebo pulzní odstředění.
16. **Přeneste** celý obsah (promývací roztok a kuličky) do nové 1,5ml zkumavky.

POZNÁMKA: Tento krok přenosu je zásadní pro odstranění inhibitorů PCR, které mohou mít dopad na pozdější výkon testu.

17. Zkumavku 5 minut inkubujte v Hybexu při 58 °C.
18. Zkumavku okamžitě pulzně odstřeďte a poté umístěte zkumavku na magnet na 30 sekund, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu.
19. Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.
20. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte a okamžitě ji umístěte na 30 sekund na magnet, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu.
21. Pipetou P20 odsajte a odstraňte případný zbývající supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.
22. Vortexem promíchejte výše připravený eluční master mix a pak sejměte reakční zkumavku z magnetu a přidejte do každé zkumavky 23 µl elučního master mixu.
23. Vortexujte zkumavku vysokou rychlostí po dobu 10 sekund.
24. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 2 minut.
25. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
26. Zkumavku umístěte na 30 sekund na magnet, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu.
27. **Přeneste** 21 µl supernatantu do nové PCR zkumavky/stripu.
28. Přidejte 4 µl pufru Capture Elution Buffer 2.
29. 6 až 8krát promíchejte pipetou. Konečný objem je 25 µl.

POZNÁMKA: Bod bezpečného zastavení. Knihovny lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 24 hodin.

3.3 PCR po obohacení

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
PCR Primers	-15 °C až -25 °C BOX 4	5	Rozmrazte na ledu. Promíchejte obrácením, poté krátce odstřeďte.
PCR Mix (nebo PCR Mix-2 pro 96 testových souprav)	-15 °C až -25 °C BOX 4	20	Rozmrazte na pokojovou teplotu a poté umístěte na led.

2. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
3. Vezměte požadované PCR zkumavky obsahující zachycené knihovny z kroku 3.2 Záchyt.

POZNÁMKA: Tento proces trvá přibližně 5 minut na přípravě, **1:40** hod. v termocykleru.

4. Přidejte 5 µl primerů PCR Primers k zachyceným knihovnám v PCR zkumavce.
5. Přidejte do zkumavky 20 µl PCR Mixu.
6. 10krát promíchejte pipetou.
7. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
8. Vložte zkumavku/strip do termocykleru a spusťte program Post-Enrichment PCR s víkem zahřátým na 105 °C a reakčním objemem 50 µl:

Č.	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Denaturace	98°C	30 sekund	1
2	Denaturace	98°C	1 minuta	17
3	Nasedání	60°C	30 sekund	
4	Extenze	72°C	3 minuty	
5	Závěrečná extenze	72°C	5 minut	1
6	Závěrečné ustálení	10°C	Ustálení teploty	1

POZNÁMKA: Bod bezpečného zastavení. Knihovny lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 týdne.
POZNÁMKA: Pokud se okamžitě pokračuje čištěním, dbejte, aby byly Purification Beads před použitím uvedeny na pokojovou teplotu.

3.4 Přečištění PCR po obohacení

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
Purification Beads (Purification Beads-2 pro 96 souprav testů)	2 °C až 8 °C BOX 5	27	Uveďte na pokojovou teplotu, nejméně 30 minut.
Sterilní voda	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	80	Příprava není nutná.
100% etanol	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	320	Níže popsaným způsobem připravte 80% etanol.
Resuspension Buffer	2°C až 8°C BOX 5	32	Uveďte na pokojovou teplotu. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**

2. Připravte čerstvý 80% ethanol (2 promytí na pool) za použití 480 µl 100% ethanolu a 120 µl sterilní vody (dodávka obsahuje nadbytečné množství).
3. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
4. Vezměte potřebné 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

POZNÁMKA: Proces trvá přibližně **30** minut.

5. Pro každou purifikační reakci přidejte 27 µl důkladně vortexovaných kuliček Purification Beads do čerstvé 1,5ml zkumavky.
6. **Přeneste** 45 µl každé PCR reakce po obohacení do příslušné zkumavky obsahující Purification Beads.
7. Vortexujte každou zkumavku vysokou rychlostí po dobu 10 sekund.

8. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
9. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
10. Zkumavku umístěte na 30 sekund na magnet, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu.
11. Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.
12. Zkumavku nechte na magnetu a dvakrát ji promyjte 80% etanolem:
    a) Přidejte do každé zkumavky 200 µl 80% etanolu.
    b) Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30 sekund.
    c) Pipetou odsajte a odstraňte veškerý supernatant.
    d) Kroky a) až c) opakujte tak, aby proběhla celkem 2 promytí.
13. Pipetou P20 odstraňte veškerý zbylý supernatant.
14. Zkumavku vysušte vzduchem na dobu 5 minut při pokojové teplotě tak, aby se odpařil zbytkový alkohol.
15. Sejměte zkumavku z magnetu a přidejte do každé zkumavky 32 µl Resuspension Bufferu pro eluci cílových fragmentů.
16. Vortexujte každou zkumavku vysokou rychlostí po dobu 10 sekund.
17. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
18. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
19. Umístěte zkumavku na 30 sekund na magnet, aby se kuličky mohly ve zkumavkách shromáždit podél magnetu.
20. **Přeneste** 30 µl supernatantu do nové 1,5ml zkumavky pro skladování.

POZNÁMKA: Bod bezpečného zastavení. Knihovny lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 měsíce.

3.5 Kvantifikace Qubit

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
Pufr Qubit BR	-25°C až 30°C Zajistí uživatel.	199	Příprava není nutná.
Barvivo Qubit BR	-25°C až 30°C Zajistí uživatel.	1	Příprava není nutná.
BR Standard #1	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	10	Uveďte na pokojovou teplotu.
BR Standard #2	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	10	Uveďte na pokojovou teplotu.

2. Vezměte požadované zkumavky Qubit a 1,5ml nebo 5ml zkumavku pro přípravu pracovního roztoku v závislosti na požadovaném objemu.
3. Připravte dvě zkušební zkumavky pro standardy a jednu pro každý pool.
4. Připravte 200 µl pracovního roztoku Qubit pomocí 199 µl pufru Qubit a 1 µl barviva Qubit na každý kvantifikovaný pool/standard.
5. Vortexujte pracovní roztok na 2–3 sekundy a následně jej pulzně odstřeďte.
6. Alikvotně odměřte do každé zkumavky Standardu **190 µl** pracovního roztoku.
7. Alikvotně odměřte do každé zkumavky s poolem **198 µl** pracovního roztoku.
8. Alikvotně odměřte do každé zkumavky s příslušným standardem **10 µl** roztoku Standardu.
9. Alikvotně odměřte **2 µl** každého poolu do příslušné zkumavky.
10. Vortexujte všechny zkumavky na 2–3 sekundy a následně je pulzně odstřeďte.
11. Zkumavky inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
12. Vložte zkumavky do fluorometru Qubit a odečtěte hodnoty (další informace naleznete v protokolu výrobce fluorometru Qubit).
13. Pro výpočet průměrné koncentrace zaznamenejte hodnoty Qubit do tabulky v pracovním sešitu.

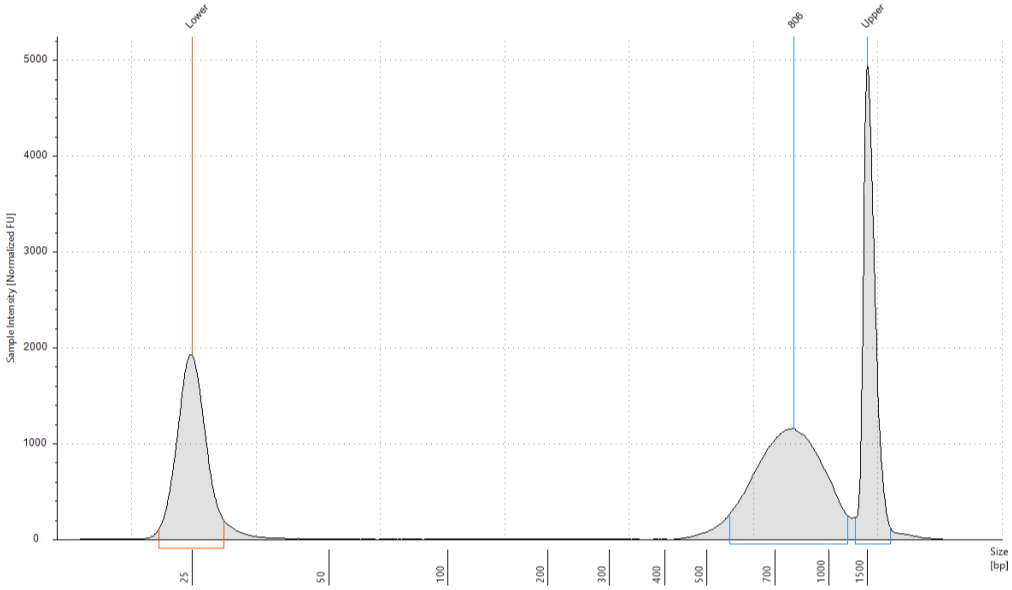
3.6 Vizualizace TapeStation (volitelně)

POZNÁMKA: Po validaci ze strany uživatele mohou být používány alternativní systémy pro vizualizaci fragmentů, jako např. Fragment Analyzer, Bioanalyzer apod.

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
D1000 Ladder	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	1	Uveďte na pokojovou teplotu.
D1000 Sample Buffer	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	3	Uveďte na pokojovou teplotu.

2. Vezměte požadovanou D1000 ScreenTape, stripy pro optické zkumavky TapeStation a uzávěry.
3. Přeneste 1 µl každého poolu do nové zkumavky.
4. Do referenční zkumavky přidejte 1 µl D1000 Ladder.
5. Přidejte 3 µl vzorku pufru D1000 do každého poolu a do referenční zkumavky.
6. Uzavřete všechny zkumavky víčky.
7. Všechny zkumavky důkladně promíchejte pomocí destičkového vortexu IKA při 2000 ot/min po dobu 1 minuty.
8. Krátce odstřeďte tak, aby se všechny vzorky nacházely na dně jamek.
9. Odklopte víčka a vložte zkumavky se vzorky do přístroje 2200 TapeStation.
10. Na ovládacím softwaru přístroje 2200 TapeStation vyberte požadované zkumavky a spusťte (další informace najdete v uživatelské příručce TapeStation).
11. Po dokončení běhu zobrazte výsledky spuštěním TapeStation Analysis Software (další informace najdete v uživatelské příručce TapeStation).
12. Výsledky zaneste do tabulky v sešitu.



Obrázek 3.6.1: Reprezentativní obrázek trasování finálního poolu obohacených knihoven v TapeStation

4. Příprava knihovny (původní pracovní postup)

4.0 Úvod k protokolu

- Postupujte podle níže uvedeného protokolu AlloSeq Tx v uvedeném pořadí podle zadaných parametrů.
- Než budete pokračovat, zkontrolujte obsah sady a ujistěte se, zda máte potřebný spotřební materiál a vybavení.

- Pro snazší použití jsou kroky protokolu přípravy knihovny podrobně uvedeny také v sešitu *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD*. Odkazy této kapitoly 4 na pracovní sešit se týkají tohoto sešitu.

4.1 Příprava vzorku

1. Do sešitu zadejte ID experimentu, popis, operátora a datum .
2. Z rozbalovacího menu v pracovním sešitu vyberte sondu AlloSeq, která se má pro tento experiment použít.
3. Z rozbalovacího menu v sešitu vyberte používaný typ sekvenátoru.
4. V sešitu zadejte ID testovaných vzorků do žluté části v rozvržení destičky podle požadované konfigurace.

POZNÁMKA: Lze zadávat pouze alfanumerické znaky. Duplicitní ID vzorků budou označena červeně; toto označení upozorňuje uživatele, že je třeba provést opravu. Software sekvenátoru požaduje, aby byly v daném běhu používány pouze vzorky s jedinečným ID. Nezadávejte žádné informace pro jamky, které nemají obsahovat žádný vzorek.

5. V oranžovém rozevíracím seznamu v části pracovního sešitu Rozvržení destičky vyberte požadovanou sadu indexů.
6. V případě potřeby a při použití formátu indexových zkumavek lze pořadí indexů i7 upravit. Z rozevírací nabídky možností vyberte alternativní index i7, který se má použít pro požadovaný sloupec. Pokud jsou vybrány duplicitní indexy i7, budou buňky označeny červeně; toto označení upozorňuje uživatele, že je třeba provést opravu.
7. V případě potřeby a při použití formátu indexových zkumavek lze pořadí indexů i5 upravit. Z rozevírací nabídky možností vyberte alternativní index i5, který se má použít pro požadovaný řádek. Pokud jsou vybrány duplicitní indexy i5, budou buňky označeny červeně; toto označení upozorňuje uživatele, že je třeba provést opravu.
8. Po dokončení všech výše uvedených činností klikněte na záložku 1.2 SampleSheet a zkontrolujte ji. Červeným textem budou označeny případy, kdy jsou i nadále vyžadovány informace. Pokud není patrný žádný červený text, lze záložku SampleSheet uložit ve formátu CSV (čárkou oddělené hodnoty) (*.csv) Uložte soubor jako „SampleSheet.csv“. Při uložení ve formátu csv se uloží pouze aktivní záložka. Otevřete uložený soubor SampleSheet.csv v programu Excel a odstraňte všechny prázdné řádky v tabulce [Data], tj. všechny řádky mezi 22 až 117, které neobsahují informace o vzorku. Po provedení těchto úkonů soubor uložte. Seznam vzorků je připraven k importu pro sekvenování na sekvenátoru Illumina.

4.2 Příprava knihovny

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na vzorek (µl)	Požadovaná příprava
Tagmentation Buffer	-15 °C až -25 °C BOX 1	10	Uveďte na pokojovou teplotu.
Sterilní voda	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	30	Příprava není nutná.
Tagmentation Beads	-15 °C až -25 °C BOX 1	10	**Uveďte na pokojovou teplotu, nejméně 30 minut.**
Stop Buffer	15°C až 30°C BOX 2	10	Příprava není nutná.
Tagmentation Wash Buffer	15°C až 30°C BOX 2	300	Příprava není nutná.

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na vzorek (µl)	Požadovaná příprava
PCR Mix (nebo PCR Mix-1 pro 96 testů)	-15 °C až -25 °C BOX 4 (nebo BOX 1 pro 96 testů)	20	Rozmrazte a uchovávejte na ledu. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**
Indexy: **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 až -25 °C BOX 3	Celkem 10	Rozmrazte a uchovávejte na ledu.

2. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
3. Vezměte požadovanou 96jamkovou Half-Skirted Plate, Microseal B a mikrocentrifugační zkumavky 1,5 ml.

POZNÁMKA: Až do indexování PCR není žádný bezpečný bod zastavení. Proces trvá přibližně **1:50** hod. (včetně 50 minut termocyklování PCR).

4. Pro každý vzorek DNA přidejte alikvotní část 10 µL z 10–100ng/µl vzorku do příslušné jamky PCR destičky podle rozložení destičky na listu 1.0 Sample_Prep.
5. Připravte 40 µl Tagmentation Master Mixu na jeden vzorek pomocí: 10 µl Tagmentation Bufferu, 20 µl sterilní vody a 10 µl Tagmentation Beads.
6. Promíchejte tento master mix vortexováním a následným pulzním odstředěním.
7. Pipetou přeneste 40 µl Tagmentation Master Mixu do každé jamky, která obsahuje vzorek DNA.
8. Destičku utěsněte fólií Microseal B.
9. Proveďte odstředění destičky při 100 x g po dobu 10 sekund tak, aby se všechny reagencie shromáždily na dně jamky.
10. K promíchání použijte destičkovou třepačku při 1600 ot/min po dobu 1 minuty.
11. Destičku vizuálně zkontrolujte:
    a) Pokud v jamce nejsou kuličky rovnoměrně rozloženy, opakujte protřepání podle kroku č. 10.
    b) Pokud se materiál nenachází na dně jamky nebo se rozstříkl na fólii Microseal B film, proveďte pulzní odstředění a opakujte protřepání podle kroku č. 10.
12. Vložte destičku do termocykleru a spusťte program Tagmentation s víkem zahřátým na 105 °C a reakčním objemem 50 µl:

Teplota	Čas
55 °C	5 minut
10°C	2 minuty

13. Po skončení programu destičku z termocykleru ihned vyjměte a nechte ji při pokojové teplotě po dobu 2 minut.
14. Odstraňte fólii Microseal B.
15. Do každé reakční jamky přidejte 10 µl Stop Bufferu.
16. Destičku znovu utěsněte novou fólií Microseal B.
17. K promíchání použijte destičkovou třepačku při 1600 ot/min po dobu 1 minuty.

18. Destičku inkubujte dalších 5 minut při pokojové teplotě.
19. Během inkubace vyjměte PCR Mix a Indexy z mrazničky k rozmrazení a následně je umístěte na led/chladicí stojan.
20. Proveďte vizuální kontrolu destičky. Pokud se materiál nenachází na dně jamky nebo se rozstříkl na fólii Microseal B film, proveďte pulzní odstředění destičky.
21. Třikrát promyjte pomocí Tagmentation Wash Bufferu níže popsaným způsobem:
    a) Odstraňte fólii Microseal B a destičku umístěte na 1 minutu na Magnetic Stand-96 tak, aby se kuličky shromáždily v jamkách podél magnetu.
    b) Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte v jamkách podél magnetu.
    c) Do každé jamky pomalu přidejte 100 µl pufru Tagmentation Wash Buffer.
    d) Destičku znovu těsně překryjte fólií Microseal B a dbejte, aby byla fólie správně upevněna.
    e) Pomocí destičkové třepačky míchejte při 1800 ot/min po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
    f) **UPOZORNĚNÍ:** Pokud došlo k odstříknutí vzorku na těsnicí fólii, před sejmutím fólie odstřeďte destičku při 100 x g po dobu 10 sekund.
    g) Kroky a) až f) opakujte ještě dvakrát tak, aby proběhla celkem 3 promytí.

POZNÁMKA: Před odstraněním supernatantu ze třetího promytí připravte níže uvedeným způsobem PCR master mix.

22. Připravte 40 µl PCR master mixu pomocí 20 µl sterilní vody a 20 µl PCR Mix (nebo PCR Mix-1 při použití 96 testovacích souprav).

POZNÁMKA: PCR Mix se používá pro další kroky protokolu. Tuto lahvičku nevyhazujte.

23. Odstraňte fólii Microseal B a destičku umístěte na 1 minutu na Magnetic Stand-96 tak, aby se kuličky shromáždily v jamkách podél magnetu.
24. Pipetou nastavenou na 100 µl odsajte a odstraňte supernatant z posledního promytí Tagmentation Wash.
25. Vyjměte destičku z magnetického stojanu.
26. Do každé jamky přidejte 40 µl PCR master mixu.
27. Destičku utěsněte fólií Microseal B.
28. Destičkovou třepačkou promíchejte při 1800 ot/min po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
29. Destičku odstřeďujte při 100 x g po dobu 10 sekund tak, aby se kuličky suspendovaly v PCR master mixu.

Pro indexové zkumavky (T),

30. (T) Indexové zkumavky vortexujte a pulzně odstřeďte tak, aby byl veškerý objem na dně zkumavky.
31. (T) Odstraňte z destičky se vzorky fólii Microseal B.
32. (T) Do každé jamky přidejte 5 µl indexu i7 podle rozvržení destičky na listu 1.0 Sample_Prep.
33. (T) Do každé jamky přidejte 5 µl indexu i5 podle rozvržení destičky na listu 1.0 Sample_Prep.

<u>Pokračujte krokem 34.</u>

Pro indexové destičky (P),

30. (P) K promíchání pro indexovou destičku použijte destičkovou třepačku při 1800 ot/min po dobu 1 minuty.
31. (P) Proveďte odstředění indexové destičky při 100 x g po dobu 10 sekund tak, aby se všechny reagencie shromáždily na dně jamky.
32. (P) Odstraňte z destičky se vzorky fólii Microseal B.
33. (P) **Zkontrolujte, že je destička správně orientovaná, a že používáte správnou sadu indexů**. **Neodlepujte fóliové těsnění.** Probodněte fóliové těsnění indexové destičky hrotem. Pomocí nového hrotu přeneste 10 µL promíchaných indexů z každé indexové destičky do každé jamky se vzorkem podle rozvržení destičky na listu 1.0 Sample_Prep.

<u>Pokračujte krokem 34.</u>

34. Utěsněte novou fólií Microseal B.

35. Destičkovou třepačkou promíchejte při 1800 ot/min po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.
36. Proveďte odstředění destičky při 100 x g po dobu 10 sekund tak, aby se všechny reagencie shromáždily na dně jamky. Vizuální kontrolou ověřte, zda jsou kuličky stále rovnoměrně rozmístěny v roztoku. Pokud kuličky nejsou rovnoměrně rozloženy, zopakujte protřepávání podle kroku 35.
37. Vložte destičku do termocykleru a spusťte program Indexing PCR s víkem zahřátým na 105 °C a při reakčním objemu 50 µl:

Č.	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Gap fill	72°C	3 minuty	1
2	Výchozí denaturace	98°C	3 minuty	1
3	Denaturace	98°C	20 sekund	9
4	Nasedání	60°C	30 sekund	
5	Extenze	72°C	3 minuty	
6	Závěrečná extenze	72°C	3 minuty	1
7	Závěrečné ustálení	10°C	Ustálení teploty	1

POZNÁMKA: Bod bezpečného zastavení. Knihovny lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 týdne.
POZNÁMKA: Pokud se okamžitě pokračuje výběrem velikosti a přečištěním, dbejte, aby byly Purification Beads před použitím uvedeny na pokojovou teplotu.

4.3 Výběr velikosti a přečištění

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na vzorek (µl)	Požadovaná příprava
Purification Beads (Purification Beads – 1 pro 96 testovacích souprav)	2 °C až 8 °C BOX 5	110,8	Uveďte na pokojovou teplotu, nejméně 30 minut. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**
Sterilní voda	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	215	Příprava není nutná.
100% etanol	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	320	Níže popsaným způsobem připravte 80% etanol.
Resuspension Buffer	2°C až 8°C BOX 5	17	Uveďte na pokojovou teplotu. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**

2. Připravte zředěné Purification Beads pomocí 90 µl Purification Beads a 135 µl sterilní vody na jeden vzorek. Před použitím kuličky Purification Beads důkladně promíchejte.
3. Připravte 600 µl čerstvého 80% ethanolu na jeden vzorek, tj. dostatečné množství na 2 promytí, pomocí 480 µl 100% ethanolu a 120 µl sterilní vody (dodávka obsahuje nadbytečné množství).
4. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
5. Vezměte potřebnou MIDI destičku, fólii Microseal B a PCR destičky.

POZNÁMKA: Proces trvá přibližně **1** hodinu.

6. Alikvotně rozdělte 225 µl zředěných Purification Beads do příslušných jamek v MIDI destičce (podle rozvržení destičky na listu 1.0 Sample_Prep).
7. Pipetou promíchejte kuličky Tagmentation Beads a supernatant z indexovací PCR **nebo** indexovací PCR destičku protřepávejte po dobu 1 minuty při 1800 ot/min a poté přidejte 45 µl každé směsi do příslušné jamky na MIDI destičce obsahující zředěné Purification Beads.
8. MIDI destičku utěsněte fólií Microseal B.

9. K promíchání použijte destičkovou třepačku při 1800 ot/min po dobu 2 minut.
10. Destičku inkubujte 5 minut při pokojové teplotě. Během této inkubace se na kuličky vážou největší fragmenty.
11. Destičku odstřeďte při 280 x g na 1 minutu.
12. Odstraňte fólii Microseal B a destičku umístěte na 5 minut na Magnetic Stand-96 tak, aby se kuličky shromáždily v jamkách podél magnetu.
13. **Přeneste 260 µl supernatantu do nové MIDI destičky nebo do čistých jamek téže destičky.**
14. Do každého vzorku přidejte 20,8 µl důkladně promíchaných kuliček Purification Beads (neředěných). Utěsněte fólií Microseal B.
15. K promíchání použijte destičkovou třepačku při 1800 ot/min po dobu 1 minuty.
16. Destičku inkubujte 5 minut při pokojové teplotě. Během této inkubace se na kuličky navážou fragmenty cílové velikosti.
17. Odstraňte fólii Microseal B a destičku umístěte na 5 minut na Magnetic Stand-96 tak, aby se kuličky shromáždily v jamkách podél magnetu.
18. Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte v jamkách podél magnetu.
19. Destičku ponechte na magnetu a dvakrát ji promyjte 80% etanolem:
    a) Přidejte do každého vzorku 200 µl 80% etanolu.
    b) Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30 sekund.
    c) Pipetou odsajte a odstraňte veškerý supernatant.
    d) Kroky a) až c) opakujte ještě tak, aby proběhla celkem 2 promytí.
20. Pipetou P20 odstraňte veškerý zbylý supernatant.
21. Destičku sušte vzduchem na dobu 5 minut při pokojové teplotě tak, aby se odpařil zbytkový alkohol.
22. Pro eluci cílových fragmentů přidejte do každé jamky 17 µl Resuspension Bufferu.
23. Utěsněte destičku fólií Microseal B.
24. K promíchání použijte destičkovou třepačku při 1800 ot/min po dobu 2 minut.
25. Destičku inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.
26. Destičku odstřeďte při 280 x g na 30 sekund.
27. Odstraňte fólii Microseal B a destičku umístěte na 5 minut na Magnetic Stand-96 tak, aby se kuličky shromáždily v jamkách podél magnetu.
28. **Přeneste** 15 µl supernatantu na novou PCR destičku pro skladování.

POZNÁMKA: Bod bezpečného zastavení. Knihovny lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 měsíce.

4.4 Kvantifikace Qubit (volitelně)

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na vzorek (µl)	Požadovaná příprava
Pufr Qubit BR	-25°C až 30°C Zajistí uživatel.	199	Příprava není nutná.
Barvivo Qubit BR	-25°C až 30°C Zajistí uživatel.	1	Příprava není nutná.
BR Standard #1	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	10	Uveďte na pokojovou teplotu.
BR Standard #2	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	10	Uveďte na pokojovou teplotu.

2. Vezměte požadované zkumavky Qubit a 1,5ml nebo 5ml zkumavku pro přípravu pracovního roztoku v závislosti na požadovaném objemu.
3. Připravte dvě zkušební zkumavky pro standardy a jednu pro každý vzorek.

4. Připravte 200 µl pracovního roztoku Qubit pomocí 199 µl pufru Qubit a 1 µl barviva Qubit na každý kvantifikovaný vzorek/standard.
5. Vortexujte pracovní roztok na 2–3 sekundy a následně jej pulzně odstřeďte.
6. Alikvotně odměřte do každé zkumavky Standardu **190 µl** pracovního roztoku.
7. Alikvotně odměřte do každé zkumavky se vzorkem **198 µl** pracovního roztoku.
8. Alikvotně odměřte do každé zkumavky s příslušným standardem **10 µl** roztoku Standardu.
9. Alikvotně odměřte **2 µl** každého vzorku do příslušné zkumavky.
10. Vortexujte všechny zkumavky na 2–3 sekundy a následně je pulzně odstřeďte.
11. Zkumavky inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
12. Zkumavky vložte do fluorometru Qubit Fluorometer a odečtěte hodnoty (další informace najdete v protokolu Qubit).
13. Pro výpočet průměru na jeden vzorek zaznamenejte hodnoty Qubit do tabulky v pracovním sešitu.

POZNÁMKA: Předpokládaná výtěžnost knihovny činí cca 30 ng/µl, může se však lišit podle kvality a vstupu DNA. Předpokládá se, že výtěžnost 10 ng/µl a vyšší poskytne uspokojivé výsledky obohacení.

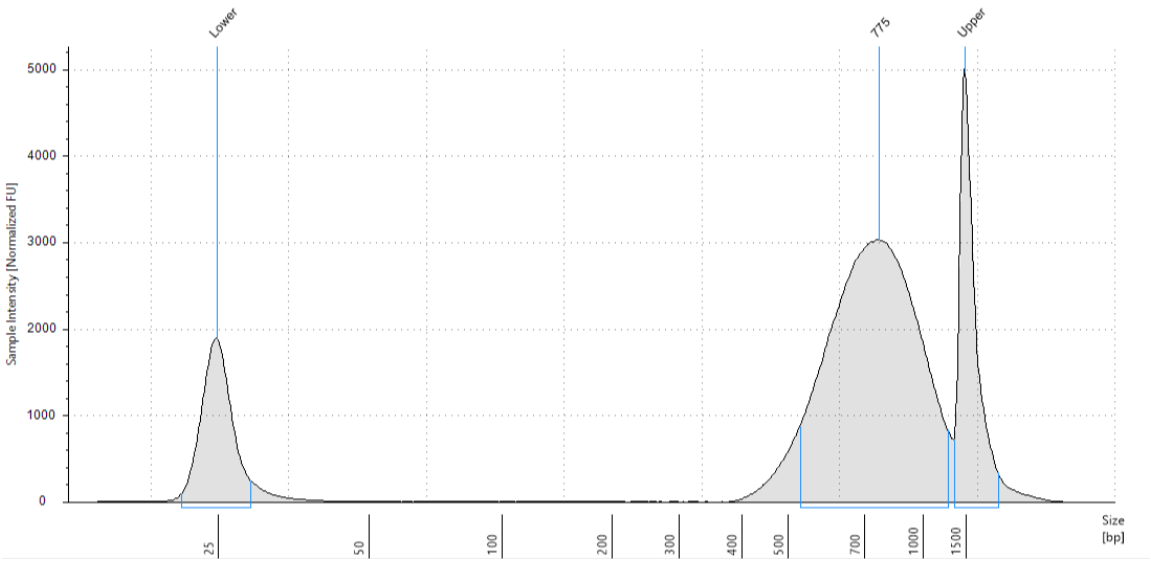
4.5 Vizualizace TapeStation (volitelně)

POZNÁMKA: Po validaci ze strany uživatele mohou být používány alternativní systémy pro vizualizaci fragmentů, jako např. Fragment Analyzer, Bioanalyzer apod.

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na vzorek (µl)	Požadovaná příprava
D1000 Ladder	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	1	Uveďte na pokojovou teplotu.
D1000 Sample Buffer	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	3	Uveďte na pokojovou teplotu.

2. Vezměte požadovanou D1000 ScreenTape, 96jamkovou Sample Plate (tenkostěnnou) a fóliové těsnění.
3. Přeneste 1 µl každého vzorku na novou 96jamkovou PCR destičku.
4. Do referenční jamky přidejte 1 µl D1000 Ladder.
5. Přidejte 3 µl pufru vzorku D1000 do každé jamky se vzorkem a do referenční jamky.
6. Destičku utěsněte fólií.
7. Vortexujte pomocí destičkového vortexu IKA při 2000 ot/min po dobu 1 minuty.
8. Krátce odstřeďte tak, aby se všechny vzorky nacházely na dně jamek.
9. Destičku se vzorky vložte do přístroje 2200 TapeStation.
10. Na ovládacím softwaru přístroje 2200 TapeStation vyberte požadované jamky a spusťte (další informace najdete v uživatelské příručce TapeStation).
11. Po dokončení běhu zobrazte výsledky spuštěním TapeStation Analysis Software (další informace najdete v uživatelské příručce TapeStation).
12. Výsledek zaznamenejte do pracovního sešitu.



Obrázek 4.5.1: Reprezentativní obrázek trasování knihoven v TapeStation.

5. Hybridní záchyt (původní pracovní postup)

5.0 Úvod k protokolu

- Postupujte podle níže uvedeného protokolu AlloSeq Tx v uvedeném pořadí podle zadaných parametrů.
- Než budete pokračovat, zkontrolujte obsah sady a ujistěte se, zda máte potřebný spotřební materiál a vybavení.
- Pro snazší použití jsou kroky protokolu hybridního záchytu podrobně uvedeny také v sešitu *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD*. Odkazy této kapitoly 5 na pracovní sešit se týkají tohoto sešitu.

5.1 Sdružování vzorků

1. Do příslušného žlutého pole v sešitu zadejte ID experimentu.
2. Do příslušného žlutého pole v sešitu zadejte počet poolů vzorků, které mají být zpracovány.
3. Zkopírujte příslušné informace o vzorku ze záložky 1.1 Linear View *sešitu IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD* a vložte je do seznamu Library Pool v *sešitu IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD* pomocí speciální volby vložení „Values & Number Formatting“.
4. Pokud sdružujete 12 nebo méně vzorků, přidejte 2,5 µl z každé obohacované knihovny do PCR zkumavky/stripu a doplňte odpovídajícím objemem Resuspension Bufferu na celkem 30 µl podle níže uvedené tabulky.
5. Pokud sdružujete více než 12 vzorků, přidejte 2,5 µl z každé obohacované knihovny do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky a pokračujte koncentračním krokem (1.1 v sešitu *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD*).
6. Pokud zpracováváte více sdružených poolů, duplikujte tuto kartu a postupujte podle kroků 1–5, přičemž každý pool unikátně identifikujte.

POZNÁMKA: Knihovny s nižší výtěžností, včetně knihoven z přípravků DNA z bukálních buněk, mohou těžit z použití většího vstupního objemu knihovny (který nepřekročí celkový vstupní objem knihovny 30 µl). Doporučuje se pokud možno zpracovávat knihovny s nízkou výtěžností (bukální) v poolu obohacení samostatném od knihoven s vyšší výtěžností (genomických). Pro konkrétní rady se obraťte na svého místního technického zástupce.

5.2 Koncentrace poolu knihovny (volitelně)

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
Purification Beads (Purification Beads-1 pro 96 testovacích souprav)	2 °C až 8 °C BOX 5	58,5–108	Uveďte na pokojovou teplotu, nejméně 30 minut. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**
Sterilní voda	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	480	Příprava není nutná.
100% etanol	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	1 920	Níže popsaným způsobem připravte 80% etanol.
Resuspension Buffer	2°C až 8°C BOX 5	32	Uveďte na pokojovou teplotu. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**

2. Připravte čerstvý 80% ethanol (2 promytí na vzorek) za použití 1920 µl 100% ethanolu a 480 µl sterilní vody (dodávka obsahuje nadbytečné množství).
3. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
4. Vezměte potřebné 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

POZNÁMKA: Proces trvá přibližně 30 minut.

5. Proveďte pooling knihoven vzorku v 1,5ml zkumavce podle pokynů sešitu 1.0 Sample Pooling.
6. Přidejte příslušný objem (1,8násobek objemu sdruženého vzorku nebo objem podle výpočtů v pracovním sešitě) důkladně vortexovaných kuliček Purification Beads do 1,5ml zkumavky se sdruženými knihovnami.
7. Každou zkumavku 3× vortexujte při vysoké rychlosti po dobu 10 sekund.
8. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
9. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
10. Umístěte zkumavku na 1 minutu na magnet (pro knihovny s 96 testy až na 2,5 minuty), aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu. Pokud je supernatant stále zakalený, ponechejte ho na magnetu, dokud se nevyčistí.
11. Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.
12. Zkumavku nechte na magnetu a dvakrát ji promyjte 80% etanolem:
    a) Přidejte do každé zkumavky 800 µl 80% etanolu.
    b) Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30 sekund.
    c) Pipetou odsajte a odstraňte veškerý supernatant.
    d) Kroky a) až c) opakujte tak, aby proběhla celkem 2 promytí.
13. Pipetou P20 odstraňte veškerý zbylý supernatant.
14. Zkumavku vysušte vzduchem na dobu 5 minut při pokojové teplotě tak, aby se odpařil zbytkový alkohol.
15. Pro eluci knihoven do zkumavky přidejte 32 µl Resuspension Bufferu.
16. Každou zkumavku při vysoké rychlosti 10 sekund 3x vortexujte.
17. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
18. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
19. Umístěte zkumavku na 1 minutu na magnet, aby se kuličky mohly ve zkumavkách shromáždit podél magnetu.
20. **Přeneste** 30 µl supernatantu do nové PCR zkumavky/stripu pro hybridizaci.

POZNÁMKA: Bod bezpečného zastavení. Knihovny lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 týdne.

5.3 Sondová hybridizace

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
AlloSeq Tx Probe Panel	-15 °C až -25 °C BOX 4	10	Uveďte na pokojovou teplotu.
Hybridisation Buffer 1	-15 °C až -25 °C BOX 4	50	Umístěte na 15 minut do Hybexu při teplotě 50°C Promíchejte na vortexu a vizuálně zkontrolujte; pokud přetrvává precipitát, inkubujte při 50 °C dalších 15 minut.
Hybridisation Buffer 2	2°C až 8°C BOX 5	10	Uveďte na pokojovou teplotu.

2. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
3. Vezměte potřebné PCR zkumavky/stripy a uzávěry.

POZNÁMKA: V protokolu záchytu neexistuje až do jeho dokončení žádný bezpečný bod zastavení. Pooly vzorků musí postupovat přímo z kroku ustálení teploty (hold) 62 °C v rámci hybridizační termocyklické reakce do kroků záchytu kuliček a vymytí s ohřevem.

POZNÁMKA: Příprava procesu trvá přibližně 20 minut a další nejméně 2 hodiny a nejvýše 18 hodin v termocykleru (reakce ponechané přes noc nebo trvající až 18 hodin musí být v kroku závěrečného ustálení (final hold) podrženy při teplotě 62 °C).

4. Pro každou hybridizační reakci zkombinujte do PCR zkumavky/stripu následující reagencie v níže uvedeném pořadí:

Reagencie	Objem na jeden pool (µl)
Pool knihoven vzorku	30
AlloSeq Tx Probe Panel	10
Hybridisation Buffer 1	50
Hybridisation Buffer 2	10
Celkem	100

5. Pipetou nastavenou na 70 µl každou hybridizační reakci 10krát dobře promíchejte, utěsněte a následně pulzně odstřeďte.
6. Pokud roztok zůstane zakalený, promíchejte jej pipetou ještě 6 až 8krát.
7. Vložte zkumavku/strip do termocykleru a spusťte program Hybridisation s víkem zahřátým na **100 °C** a reakčním objemem 100 µl:

Č.	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Denaturace	98°C	5 minut	1
2	Snižování	98 °C – 62 °C, snižování po 2 °C/cyklus	1 minuta	1
3	Přejděte na krok 2 po dalších 18 cyklů (celkem 19 cyklů) se snižováním po 2 °C/cyklus.			
4	Hybridizace	62°C	90 minut	1
5	Závěrečné ustálení	62°C	Ustálení (nepřekračujte 18 hodin při 62 °C včetně kroku č. 4)	1

8. Nechte zkumavku/strip v termocykleru, dokud nebudete připraveni pokračovat v záchytu. Zkontrolujte, zda záchytné kuličky dosáhly pokojové teploty a zda jsou Capture Wash Buffer a Hybex ohřáty na 58 °C.

5.4 Záchyt

9. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
Capture Beads	2°C až 8°C BOX 5	250	**Uveďte na pokojovou teplotu, nejméně 30 minut.**
Capture Wash Buffer	-15 °C až -25 °C BOX 4	800	**Před použitím předehřejte na 58 °C.**
Capture Elution Buffer 1	-15 °C až -25 °C BOX 4	28,5	Uveďte na pokojovou teplotu.
2N NaOH	-15 °C až -25 °C BOX 4	1,5	Uveďte na pokojovou teplotu. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**
Capture Elution Buffer 2	2°C až 8°C BOX 5	4	Uveďte na pokojovou teplotu.

1. Pro každý pool, v němž má být proveden záchyt, si připravte eluční master mix:

Reagencie	Objem na jeden pool (µl)
Capture Elution Buffer 1	28,5
2N NaOH (čerstvý)	1,5

POZNÁMKA: Roztok NaOH snadno absorbuje CO_2 z ovzduší, čímž mění pH a chování reagencie. Dbejte, aby byla zkumavka s 2N NaOH těsně uzavřená, když se nepoužívá.

2. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
3. Vezměte potřebné 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky, PCR zkumavky/stripy a uzávěry.

POZNÁMKA: Tento proces trvá přibližně **1** hodinu.

4. Pro každou hybridizační reakci přidejte 250 µl Capture Beads do čerstvé 1,5ml zkumavky.
5. **Přeneste** 100 µl každé hybridizační reakce do příslušné zkumavky obsahující Capture Beads.
6. Zkumavku při vysoké rychlosti 10 sekund 3x vortexujte. Nepoužívejte centrifugu nebo pulzní odstředění.
7. Zkumavku 15 minut inkubujte v Hybexu při 58 °C.
8. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
9. Zkumavku okamžitě umístěte na 1 minutu na magnet, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu.
10. Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.
11. Třikrát promyjte zahřátým Capture Wash Bufferem níže popsaným způsobem:

POZNÁMKA: Pokud se pufr Capture Wash Buffer nepoužívá, nechte jej uložený v Hybexu tak, aby si udržel teplotu 58 °C. Vytahujte jej pouze bezprostředně před přidáním do reakce v kroku 12b a 14. Při provádění kroků zahřátého promytí postupujte rychle, aby se minimalizovala doba, po kterou je pool/pufr při pokojové teplotě.

a) Vyjměte zkumavku z magnetu.
b) Přidejte 200 µl ohřátého pufru Capture Wash Buffer (58 °C).
c) Zkumavku při vysoké rychlosti 10 sekund 3x vortexujte. Nepoužívejte centrifugu nebo pulzní odstředění.
d) Zkumavku 5 minut inkubujte v Hybexu při 58 °C.
e) Zkumavku pulzně odstřeďte a okamžitě umístěte na 1 minutu na 1,5ml magnet, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu.
f) Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.
g) Kroky a) až f) opakujte ještě dvakrát tak, aby proběhla celkem 3 promytí.

12. Vyjměte zkumavku z magnetu.

13. Přidejte 200 µl ohřátého pufru Capture Wash Buffer (58 °C).
14. Zkumavku při vysoké rychlosti 10 sekund 3x vortexujte. Nepoužívejte centrifugu nebo pulzní odstředění.
15. **Přeneste** celý obsah (promývací roztok a kuličky) do nové 1,5ml zkumavky.

POZNÁMKA: Tento krok přenosu je zásadní pro odstranění inhibitorů PCR, které mohou mít dopad na pozdější výkon testu.

16. Zkumavku 5 minut inkubujte v Hybexu při 58 °C.
17. Zkumavku okamžitě pulzně odstřeďte a poté umístěte zkumavku na magnet na 1 minutu, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu.
18. Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.
19. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte a okamžitě ji umístěte na 1 minutu na magnet, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu.
20. Pipetou P20 odsajte a odstraňte případný zbývající supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.
21. Vortexem promíchejte výše připravený eluční master mix a pak sejměte reakční zkumavku z magnetu a přidejte do každé zkumavky 23 µl elučního master mixu.
22. Zkumavku při vysoké rychlosti 10 sekund 3x vortexujte.
23. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 2 minut.
24. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
25. Umístěte zkumavku na 1 minutu na magnet, aby se kuličky mohly shromáždit podél magnetu.
26. **Přeneste** 21 µl supernatantu do nové PCR zkumavky/stripu.
27. Přidejte 4 µl pufru Capture Elution Buffer 2.
28. 6 až 8krát promíchejte pipetou. Konečný objem je 25 µl.

POZNÁMKA: Bod bezpečného zastavení. Knihovny lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 24 hodin.

5.5 PCR po obohacení

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
PCR Primers	-15 °C až -25 °C BOX 4	5	Rozmrazte na ledu. Promíchejte obrácením, poté krátce odstřeďte.
PCR Mix (nebo PCR Mix-2 pro 96 testů)	-15 °C až -25 °C BOX 4	20	Rozmrazte na pokojovou teplotu a poté umístěte na led.

2. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
3. Vezměte požadované PCR zkumavky obsahující zachycené knihovny z kroku 5.4 Záchyt.

POZNÁMKA: Tento proces trvá přibližně 5 minut na přípravě, **1:40** hod. v termocykleru.

4. Přidejte 5 µl primerů PCR Primers k zachyceným knihovnám v PCR zkumavce.
5. Přidejte do zkumavky 20 µl PCR Mixu.
6. 10krát promíchejte pipetou.
7. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
8. Vložte zkumavku/strip do termocykleru a spusťte program Post-Enrichment PCR s víkem zahřátým na 105 °C a reakčním objemem 50 µl:

Č.	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Denaturace	98°C	30 sekund	1
2	Denaturace	98°C	1 minuta	17
3	Nasedání	60°C	30 sekund	
4	Extenze	72°C	3 minuty	
5	Závěrečná extenze	72°C	5 minut	1
6	Závěrečné ustálení	10°C	Ustálení teploty	1

POZNÁMKA: Bod bezpečného zastavení. Knihovny lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 týdne.
POZNÁMKA: Pokud se okamžitě pokračuje čištěním, dbejte, aby byly Purification Beads před použitím uvedeny na pokojovou teplotu.

5.6 Přečištění PCR po obohacení

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
Purification Beads (Purification Beads-2 pro 96 souprav testů)	2 °C až 8 °C BOX 5	27	Uveďte na pokojovou teplotu, nejméně 30 minut.
Sterilní voda	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	80	Příprava není nutná.
100% etanol	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	320	Níže popsaným způsobem připravte 80% etanol.
Resuspension Buffer	2°C až 8°C BOX 5	32	Uveďte na pokojovou teplotu. **Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.**

2. Připravte čerstvý 80% ethanol (2 promytí na vzorek) za použití 480 µl 100% ethanolu a 120 µl sterilní vody (dodávka obsahuje nadbytečné množství).
3. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
4. Vezměte potřebné 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

POZNÁMKA: Proces trvá přibližně **30** minut.

5. Pro každou purifikační reakci přidejte 27 µl důkladně vortexovaných kuliček Purification Beads do čerstvé 1,5ml zkumavky.
6. **Přeneste** 45 µl každé PCR reakce po obohacení do příslušné zkumavky obsahující Purification Beads.
7. Každou zkumavku 3× vortexujte při vysoké rychlosti po dobu 10 sekund.
8. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
9. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
10. Zkumavku umístěte na magnet na 1 minutu, nebo dokud se všechny kuličky neshromáždí na magnetu.
11. Pipetou odsajte a odstraňte supernatant a kuličky nechte ve zkumavce podél magnetu.
12. Zkumavku nechte na magnetu a dvakrát ji promyjte 80% etanolem:
    a) Přidejte do každé zkumavky 200 µl 80% etanolu.
    b) Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30 sekund.
    c) Pipetou odsajte a odstraňte veškerý supernatant.
    d) Kroky a) až c) opakujte tak, aby proběhla celkem 2 promytí.
13. Pipetou P20 odstraňte veškerý zbylý supernatant.
14. Zkumavku vysušte vzduchem na dobu 5 minut při pokojové teplotě tak, aby se odpařil zbytkový alkohol.

15. Sejměte zkumavku z magnetu a přidejte do každé zkumavky 32 µl Resuspension Bufferu pro eluci cílových fragmentů.
16. Každou zkumavku při vysoké rychlosti 10 sekund 3x vortexujte.
17. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
18. Zkumavku rychle pulzně odstřeďte.
19. Umístěte zkumavku na 1 minutu na magnet, aby se kuličky mohly ve zkumavce shromáždit podél magnetu.
20. **Přeneste** 30 µl supernatantu do nové 1,5ml zkumavky pro skladování.

POZNÁMKA: Bod bezpečného zastavení. Knihovny lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 měsíce.

5.7 Kvantifikace Qubit

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
Pufr Qubit BR	-25°C až 30°C Zajistí uživatel.	199	Příprava není nutná.
Barvivo Qubit BR	-25°C až 30°C Zajistí uživatel.	1	Příprava není nutná.
BR Standard #1	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	10	Uveďte na pokojovou teplotu.
BR Standard #2	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	10	Uveďte na pokojovou teplotu.

2. Vezměte požadované zkumavky Qubit a 1,5ml nebo 5ml zkumavku pro přípravu pracovního roztoku v závislosti na požadovaném objemu.
3. Připravte dvě zkušební zkumavky pro standardy a jednu pro každý pool.
4. Připravte 200 µl pracovního roztoku Qubit pomocí 199 µl pufru Qubit a 1 µl barviva Qubit na každý kvantifikovaný vzorek/standard.
5. Vortexujte pracovní roztok na 2–3 sekundy a následně jej pulzně odstřeďte.
6. Alikvotně odměřte do každé zkumavky Standardu **190 µl** pracovního roztoku.
7. Alikvotně odměřte do každé zkumavky s poolem **198 µl** pracovního roztoku.
8. Alikvotně odměřte do každé zkumavky s příslušným standardem **10 µl** roztoku Standardu.
9. Alikvotně odměřte **2 µl** každého poolu do příslušné zkumavky.
10. Vortexujte všechny zkumavky na 2–3 sekundy a následně je pulzně odstřeďte.
11. Zkumavky inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
12. Vložte zkumavky do fluorometru Qubit a odečtěte hodnoty (další informace naleznete v protokolu výrobce fluorometru Qubit).
13. Pro výpočet průměrné koncentrace zaznamenejte hodnoty Qubit do tabulky v pracovním sešitu.

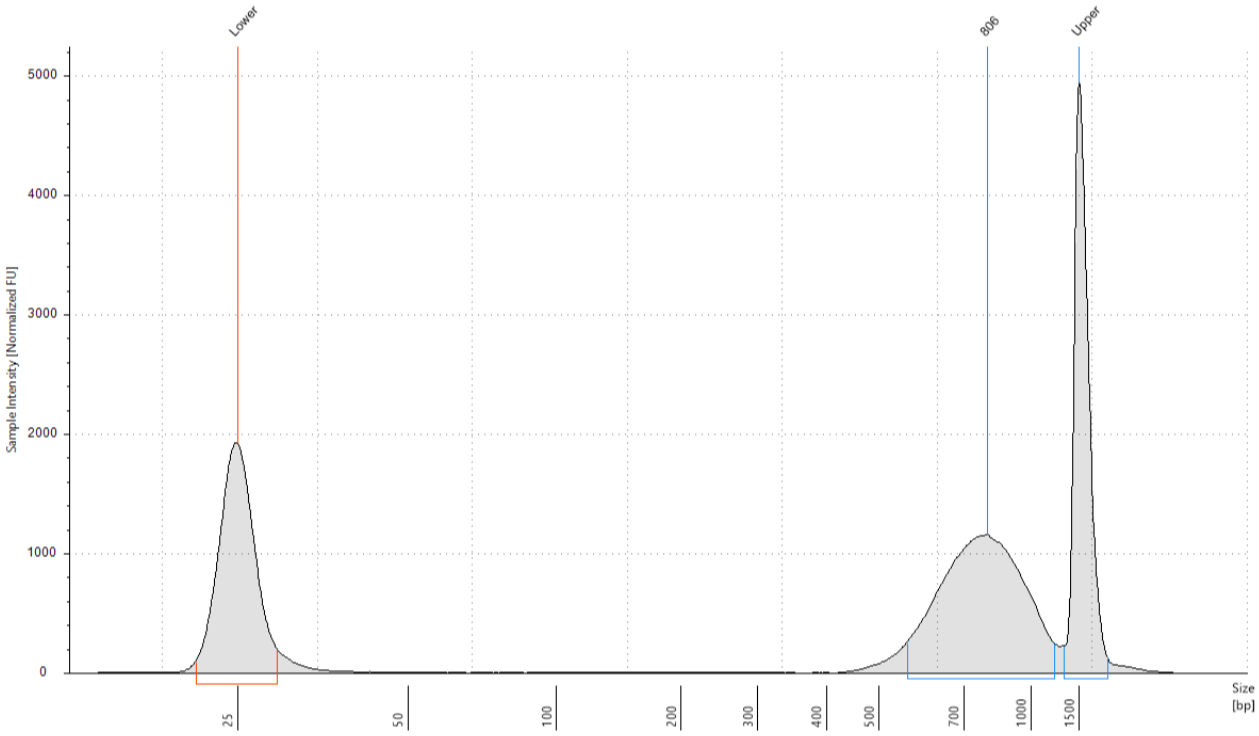
5.8 Vizualizace TapeStation (volitelně)

POZNÁMKA: Po validaci ze strany uživatele mohou být používány alternativní systémy pro vizualizaci fragmentů, jako např. Fragment Analyzer, Bioanalyzer apod.

1. Vezměte požadované reagencie (objem je uveden v tabulce níže) a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Objem na jeden pool (µl)	Požadovaná příprava
D1000 Ladder	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	1	Uveďte na pokojovou teplotu.
D1000 Sample Buffer	2°C až 8°C Zajistí uživatel.	3	Uveďte na pokojovou teplotu.

2. Vezměte požadovanou D1000 ScreenTape, stripy pro optické zkumavky TapeStation a uzávěry.
3. Přeneste 1 µl každého poolu do nové zkumavky.
4. Do referenční zkumavky přidejte 1 µl D1000 Ladder.
5. Přidejte 3 µl pufru vzorku D1000 do každé zkumavky s poolem a do referenční zkumavky.
6. Uzavřete všechny zkumavky víčky.
7. Všechny zkumavky důkladně promíchejte pomocí vortexu IKA při 2000 ot/min po dobu 1 minuty.
8. Krátce odstřeďte tak, aby se všechny vzorky nacházely na dně jamek.
9. Odklopte víčka a vložte zkumavky se vzorky do přístroje 2200 TapeStation.
10. Na ovládacím softwaru přístroje 2200 TapeStation vyberte požadované zkumavky a spusťte (další informace najdete v uživatelské příručce TapeStation).
11. Po dokončení běhu zobrazte výsledky spuštěním TapeStation Analysis Software (další informace najdete v uživatelské příručce TapeStation).
12. Výsledky zaneste do tabulky v sešitu.



Obrázek 5.8.1: Reprezentativní obrázek trasování finálního poolu obohacených knihoven v TapeStation

6. Sekvenování

6.0 Úvod k protokolu

Knihovny AlloSeq Tx jsou validovány pro sekvenování, které se provádí na sekvenátorech Illumina včetně: MiSeq, MiniSeq nebo iSeq, u nichž mají výsledná data sekvence výstupní podobu formátu souboru fastq. Počet vzorků přidaných do každého obohaceného poolu určí potřebnou průtokovou buňku sekvenátoru, jak je uvedeno v části *1.3 Cílový genetický obsah AlloSeq Tx* tohoto návodu k použití.

- Postupujte podle níže uvedeného protokolu AlloSeq Tx v uvedeném pořadí podle zadaných parametrů.
- Než budete pokračovat, zkontrolujte obsah sady a ujistěte se, zda máte potřebný spotřební materiál a vybavení.
- Pro snadnější použití jsou kroky protokolu pro sekvenování podrobně popsány také v části *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD (*pracovní postup Early Pooling) a *IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD* (původní pracovní postup). Odkazy na pracovní sešit v kapitole 6 se týkají těchto sešitů.
- Jak je uvedeno v návodu níže, sekvenátory je třeba zakládat podle protokolu přístroje.
- Pokud používáte přístroj MiSeq, pro optimální výkon se doporučuje provést promytí templátové linie bělidlem (chlornanem sodným) podle pokynů v uživatelské příručce MiSeq.

POZNÁMKA: Soubor ve formátu .csv pro import seznamu vzorků ze sekvenování na přístroji Illumina lze vytvořit a uložit podle popisu v *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD* (sešit „1.0 Sample_Prep“), z „1.2 SampleSheet“ *(*pracovní postup Early Pooling) nebo v *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD* (sešit „1.0 Sample_Prep“), z „1.2 SampleSheet“ (původní pracovní postup).

6.1 Příprava PhiX

1. Vezměte požadované reagencie a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Požadovaná příprava
10nM PhiX	-15 °C až -25 °C Zajistí uživatel.	Rozmrazte a následně uchovávejte na ledu.
2N NaOH	-15 °C až -25 °C BOX 4	Uveďte na pokojovou teplotu.
Sterilní voda	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	Příprava není nutná.
Resuspension Buffer	2°C až 8°C BOX 5	Uveďte na pokojovou teplotu.
HT1 (se sekvenační cartridgí)	-15 °C až -25 °C Zajistí uživatel.	Rozmrazte a následně uchovávejte na ledu.

2. Připravte 0,2 NaOH pracovní roztok pomocí 45 µl sterilní vody a 5 µl 2N NaOH.

POZNÁMKA: Roztok NaOH snadno absorbuje CO_2 z ovzduší, čímž mění pH a chování reagencie. Dbejte, aby byla zkumavka s 2N NaOH těsně uzavřená, když se nepoužívá.

3. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
4. Vezměte potřebné 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

6.1.1 Zřeďte a denaturujte PhiX pro běhy v MiSeq a MiniSeq

1. Do nové zkumavky přidejte 3 µl Resuspension Bufferu.
2. Přidejte do zkumavky 2 µL 10nM PhiX.

3. Přidejte do zkumavky 5 µl pracovního roztoku 0,2N NaOH (ve výše uvedeném ředění).
4. Zkumavku vortexujte a pulzně odstřeďte.
5. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
6. Přidejte 990 µl předchlazeného HT1 do zkumavky obsahující denaturovaný PhiX.
7. **Obrácením promíchejte** (NIKOLI ve vortexu) a následně zkumavku pulzně odstřeďte.

POZNÁMKA: Z tohoto vznikne 1 ml 20pM PhiX, který je připraven k použití při bězích na MiSeq. U běhů MiniSeq proveďte další ředění nastavené na 5 pM podle popisu níže. Denaturovaný PhiX lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 měsíce.

6.1.2 Pro běhy na MiniSeq dále zřeďte PhiX na 5 pM

1. Pro výpočet odpovídajícího ředění PhiX zadejte požadovaný objem ředění do sešitu.
2. Zřeďte PhiX na 5 pM smícháním objemu reagencie (viz sešit) v mikrocentrifugační zkumavce.
3. **Obrácením promíchejte** (NIKOLI ve vortexu) a následně zkumavku pulzně odstřeďte.

POZNÁMKA: Denaturovaný PhiX lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 měsíce.

6.1.3 Pro běhy iSeq zřeďte PhiX na 20 pM (bez denaturace)

1. Pro výpočet odpovídajícího ředění PhiX zadejte požadovaný objem ředění do sešitu.
2. Zřeďte PhiX na 20 pM smícháním objemu reagencie (viz sešit) v mikrocentrifugační zkumavce.
3. **Obrácením promíchejte** (NIKOLI ve vortexu) a následně zkumavku pulzně odstřeďte.

POZNÁMKA: Denaturovaný PhiX lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 měsíce.

6.2 Zřeďte a denaturujte pro MiSeq

1. Vezměte požadované reagencie a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Požadovaná příprava
Obohacený pool vzorků AlloSeq Tx	-15 °C až -25 °C Připraveno uživatelem	Rozmrazte a následně uchovávejte na ledu.
2N NaOH	-15 °C až -25 °C BOX 4	Uveďte na pokojovou teplotu.
Sterilní voda	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	Příprava není nutná.
HT1 (s cartridgí MiSeq)	-15 °C až -25 °C Zajistí uživatel.	Rozmrazte a následně uchovávejte na ledu.
Resuspension Buffer	2°C až 8°C BOX 5	Uveďte na pokojovou teplotu.
20 pM PhiX (dříve zředěno)	-15 °C až -25 °C Zajistí uživatel.	Rozmrazte a následně uchovávejte na ledu.

2. Připravte 0,2N NaOH pracovní roztok pomocí 45 µl sterilní vody a 5 µl 2N NaOH.

POZNÁMKA: Roztok NaOH snadno absorbuje CO_2 z ovzduší, čímž mění pH a chování reagencie. Dbejte, aby byla zkumavka s 2N NaOH těsně uzavřená, když se nepoužívá.

3. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
4. Vezměte potřebné 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.

5. Pro výpočet odpovídajícího ředění knihovny zadejte do sešitu koncentraci obohaceného poolu vzorků, velikost fragmentů (předpokládejte cca 800 bp) a požadovaný celkový objem (doporučeno 30 µl) při 4 nM.
6. Zřeďte pool vzorků na 4 nM smícháním reagencií (viz sešit) v mikrocentrifugační zkumavce.
7. Před dalším použitím zředěný pool vzorků vortexujte a pulzně odstřeďte.
8. Do nové zkumavky přidejte 5 µl obohaceného poolu vzorků o koncentraci 4 nM.
9. Přidejte do zkumavky 5 µl pracovního roztoku 0,2N NaOH (ve výše uvedeném ředění).
10. Zkumavku vortexujte a pulzně odstřeďte.
11. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
12. Přidejte 990 µl předchlazeného HT1 do zkumavky obsahující obohacený pool vzorků.
13. **Obrácením promíchejte** (NIKOLI ve vortexu) a následně zkumavku pulzně odstřeďte.

POZNÁMKA: Vznikne 1 ml 20 pM poolu vzorků. Pooly lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 měsíce.

14. Pro výpočet příslušného ředění pro knihovnu zadejte do sešitu počet poolů, které mají být spojeny pro sekvenování, plnicí koncentraci (doporučeno 12pM), požadované % nárůstu PhiX (doporučeno minimálně 1 %) a plnicí objem (minimálně 600 µl).
15. Zřeďte pool vzorků na plnicí koncentraci smícháním reagencií (viz sešit) v mikrocentrifugační zkumavce.
16. **Obrácením promíchejte** (NIKOLI ve vortexu) a následně zkumavku pulzně odstřeďte.
17. Odložte na led, dokud nebude připravena k naplnění do reakční cartridge MiSeq k sekvenování.

POZNÁMKA: Pooly lze před sekvenováním skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 48 hodin.

18. Zakládejte do MiSeq podle protokolu přístroje.

6.3 Zřeďte a denaturujte pro MiniSeq

1. Vezměte požadované reagencie a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Požadovaná příprava
Obohacený pool vzorků AlloSeq Tx	-15 °C až -25 °C Připraveno uživatelem	Rozmrazte a následně uchovávejte na ledu.
2N NaOH	-15 °C až -25 °C BOX 4	Uveďte na pokojovou teplotu.
Sterilní voda	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	Příprava není nutná.
HT1 (se sekvenační cartridgí)	-15 °C až -25 °C Zajistí uživatel.	Rozmrazte a následně uchovávejte na ledu.
Resuspension Buffer	2°C až 8°C BOX 5	Uveďte na pokojovou teplotu.
200 mM Tris-HCl, pH 7,0	15°C až 30°C Zajistí uživatel.	Příprava není nutná.
5 pM PhiX (dříve zředěno)	-15 °C až -25 °C Zajistí uživatel.	Rozmrazte a následně uchovávejte na ledu.

2. Připravte 0,1N NaOH pracovní roztok pomocí 95 µl sterilní vody a 5 µl 2N NaOH.

POZNÁMKA: Roztok NaOH snadno absorbuje CO_2 z ovzduší, čímž mění pH a chování reagencie. Dbejte, aby byla zkumavka s 2N NaOH těsně uzavřená, když se nepoužívá.

3. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
4. Vezměte potřebné 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
5. Pro výpočet odpovídajícího ředění knihovny zadejte do sešitu koncentraci obohaceného poolu vzorků, velikost fragmentů (předpokládejte cca 800 bp) a požadovaný celkový objem (doporučeno 100 µl) při 1 nM.

6. Zřeďte pool vzorků na 1 nM smícháním reagencií (viz sešit) v mikrocentrifugační zkumavce.
7. Před dalším použitím zředěný pool vzorků vortexujte a pulzně odstřeďte.
8. Do nové zkumavky přidejte 5 µl obohaceného poolu vzorků o koncentraci 1 nM.
9. Přidejte do zkumavky 5 µl pracovního roztoku 0,1N NaOH (ve výše uvedeném ředění).
10. Zkumavku vortexujte a pulzně odstřeďte.
11. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
12. Přidejte 5 µL 200 mM Tris-HCl při pH 7,0.
13. Zkumavku vortexujte a pulzně odstřeďte.
14. Přidejte 985 µl předchlazeného HT1 do zkumavky obsahující obohacený pool vzorků.
15. **Obrácením promíchejte** (NIKOLI ve vortexu) a následně zkumavku pulzně odstřeďte.

POZNÁMKA: Vznikne 1 ml 5 pM poolu vzorků. Pooly lze skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 1 měsíce.

16. Pro výpočet příslušného ředění pro knihovnu zadejte do sešitu počet poolů, které mají být spojeny pro sekvenování, plnicí koncentraci (doporučeno 1,6 pM), požadované % nárůstu PhiX (doporučeno minimálně 1 %) a plnicí objem (minimálně 500 µl).
17. Zřeďte pool vzorků na plnicí koncentraci smícháním reagencií (viz sešit) v mikrocentrifugační zkumavce.
18. **Obrácením promíchejte** (NIKOLI ve vortexu) a následně zkumavku pulzně odstřeďte.
19. Odložte na led, dokud nebude připravena k naplnění do reakční cartridge MiniSeq k sekvenování.

POZNÁMKA: Pooly lze před sekvenováním skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 48 hodin.

20. Zakládejte do MiniSeq podle protokolu přístroje.

6.4 Zřeďte pro iSeq

1. Vezměte požadované reagencie a připravte podle tabulky:

Reagencie	Skladovací podmínky	Požadovaná příprava
Obohacený pool vzorků AlloSeq Tx	-15 °C až -25 °C Připraveno uživatelem	Rozmrazte a následně uchovávejte na ledu.
Resuspension Buffer	2°C až 8°C BOX 5	Uveďte na pokojovou teplotu.
20 pM PhiX (dříve zředěno)	-15 °C až -25 °C Zajistí uživatel.	Rozmrazte a následně uchovávejte na ledu.

2. Všechny reagencie před použitím vortexujte a pulzně odstřeďte.
3. Vezměte potřebné 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky.
4. Pro výpočet odpovídajícího ředění knihovny zadejte do sešitu koncentraci obohaceného poolu vzorků, velikost fragmentů (předpokládejte cca 800 bp) a požadovaný celkový objem (doporučeno 100 µl) při 1 nM.
5. Zřeďte pool vzorků na 1 nM smícháním reagencií (viz sešit) v mikrocentrifugační zkumavce.
6. Před dalším použitím zředěný pool vzorků vortexujte a pulzně odstřeďte.
7. Pro výpočet příslušného ředění pro knihovnu zadejte do sešitu počet poolů, které mají být spojeny pro sekvenování, plnicí koncentraci (doporučeno 200 pM), požadované % nárůstu PhiX (doporučeno minimálně 1 %) a plnicí objem (minimálně 100 µl).
8. Zřeďte pool vzorků na plnicí koncentraci smícháním reagencií (viz sešit) v mikrocentrifugační zkumavce.
9. **Obrácením promíchejte** (NIKOLI ve vortexu) a následně zkumavku pulzně odstřeďte.
10. Odložte na led, dokud nebude připravena k naplnění do reakční cartridge iSeq k sekvenování.

POZNÁMKA: Pooly lze před sekvenováním skladovat v teplotách -15 °C až -25 °C po dobu až 48 hodin.

11. Do cartridge iSeq vložte 20 µl naředěného vzorku podle protokolu přístroje.

7. Sekvenční analýza

Výsledné soubory fastq se analyzují softwarem AlloSeq Assign. Postupy pro použití softwaru AlloSeq Assign najdete v dokumentu *IFU094_AlloSeq Assign IFU CE IVD*.

8. Řešení problémů

PROBLÉM	MOŽNÁ PŘÍČINA	Řešení
Nízká nebo nulová výtěžnost přípravy knihovny (podle detekce pomocí Qubit)	Špatná kvalita nebo nízká koncentrace vstupní DNA	Posuďte kvalitu DNA gelovou elektroforézou. Intaktní DNA by měla mít cca 3 kb s drobnými nebo žádnými známkami rozmazání na gelu. Znovu odeberte DNA a postup pokud možno opakujte.
	Byl použit nesprávný typ primárního vzorku.	Nepoužívejte vzorky plné krve s obsahem heparinu. Pokud možno znovu extrahujte DNA z plné krve konzervované pomocí ACD nebo EDTA a postup opakujte.
	Ztráta knihoven během záchytu	Nahlédněte do protokolu. Dbejte, aby byly správně dodrženy purifikační kroky, v nichž se supernatant ponechává, a kroky, v nichž se supernatant odstraňuje. Zkontrolujte, zda je správná koncentrace etanolu. Použitím pouze vody nebo obsahu s nadměrným obsahem vody může dojít k předčasné eluci DNA.
	Nedojde k eluci knihoven ze záchytných kuliček.	Nahlédněte do protokolu. Dbejte na správné pořadí elučních pufrů. Dbejte na správné odstranění reagencií/pufrů před opětovnou suspenzí a elucí. Během kroků sušení dbejte, aby nedošlo k přesušení DNA nebo pelet DNA navázaných na kuličky. Delší sušení DNA pelet může bránit resuspenzi a snižuje následnou výtěžnost.
	Nepřidání kritických reagencií (tj. beads, indexový primer, PCR master mix apod.), resp. jejich přidání v nesprávném pořadí.	Nahlédněte do protokolu. Dbejte, aby reagencie byly přidávány ve správném pořadí a ve správném objemu. Zkontrolujte, zda není zbytkový objem reagencií nadměrný. Je-li to uvedeno, postup opakujte.
	Nesprávné podmínky inkubace nebo cyklování	Zkontrolujte podmínky termocykleru: Program Tagmentation Program Indexing PCR
Nízká nebo nulová výtěžnost z obohacení (podle detekce pomocí Qubit)	Ztráta knihoven během záchytu	Znovu si projděte protokol a dbejte, aby byly správně dodrženy kroky, které vyžadují uchování supernatantu, a kroky s odstraněním supernatantu. Zkontrolujte, zda mají zředěné Purification Beads správnou koncentraci a zda se po výběru velikosti používají neředěné Purification Beads (nikoli zbytky zředěných kuliček).
	Knihovny nebyly elucí vymyty ze záchytných kuliček.	Dbejte na správné pořadí elučních pufrů. Dbejte na správné odstranění reagencií/pufrů před opětovnou suspenzí a elucí. Během kroků sušení dbejte, aby nedošlo k přesušení DNA nebo pelet DNA navázaných na kuličky. Delší sušení DNA pelet může snížit možnost opětovné suspenze roztoku a následnou výtěžnost.

PROBLÉM	MOŽNÁ PŘÍČINA	Řešení
	Nesprávné podmínky inkubace nebo cyklování	Zkontrolujte podmínky termocykleru: Program Hybridisation Program Post-Enrichment PCR
Nesprávná velikost fragmentů po přípravě knihovny nebo obohacení (zjištěna analýzou fragmentů)	Nesprávný poměr vzorku k Purification Beads.	Opakujte protokol. Dbejte, aby se během kroků výběru velikosti a purifikace v rámci protokolu používala správná koncentrace kuliček.
Neúspěšné sekvenování		Zkontrolujte, zda byl dodržen protokol. Nahlédněte do příslušného návodu k používanému modelu sekvenátoru.
Nízké pokrytí cílových lokusů v softwaru Assign navzdory vysoké výtěžnosti obohacení.	Byly zachyceny nespecifické fragmenty z důvodu nižší teploty během kroků záchytu a promývání s ohřevem.	Dbejte, aby byl Hybex používaný při krocích promývání s ohřevem zkalibrovaný a udržovaný. V průběhu kroků promývání s ohřevem pracujte rychle tak, aby nedošlo k výraznému poklesu teploty poolu.

9. Podpůrné informace

Protokol popsaný v tomto návodu předpokládá, že jste se seznámili s obsahem této části a opatřili si veškerý potřebný spotřební materiál a vybavení.

Licence

Soupravy AlloSeq Tx obsahují reagencie Nextera Flex for Enrichment, které vyrábí společnost Illumina Inc. pro distribuci společností CareDx Pty Ltd.

Potřebný spotřební materiál a vybavení, které nejsou součástí dodávky

Níže uvedený spotřební materiál a vybavení jsou potřebné k provedení testu, avšak netvoří součást soupravy AlloSeq Tx Kit.

Protokol byl optimalizován a validován pomocí uvedených položek. Při použití alternativního spotřebního materiálu a vybavení není srovnatelný výkon zaručen.

Spotřební materiál	Dodavatel/katalogové číslo
PCR-grade voda	Sigma-Aldrich, W3500
Absolutní etanol pro molekulární biologii	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
Qubit™ dsDNA BR Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Q32850 nebo Q32853
Qubit™ Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific, Q32856
D1000 ScreenTape (volitelně)	Agilent Technologies, 5067-5584
D1000 Reagents (volitelně)	Agilent Technologies, 5067-5585
96jamkové destičky na vzorky (volitelně)	Agilent Technologies, 5067-5150
Fóliový uzávěr 96jamkové destičky (volitelně)	Agilent Technologies, 5067-5154
Stripy optických zkumavek (8x strip) (volitelně)	Agilent Technologies, 401428
Uzávěry stripů optických zkumavek (8x strip) (volitelně)	Agilent Technologies, 401425
Jedna z těchto souprav sekvenačních reagencií:	
• MiSeq V2 Standard (300 cyklů)	• Illumina, MS-102-2002
• MiSeq V2 Micro (300 cyklů)	• Illumina, MS-103-1002
• MiSeq V2 Nano (300 cyklů)	• Illumina, MS-103-1001
• MiniSeq Mid Output Kit (300 cyklů)	• Illumina, FC-420-1004
• iSeq 100 i1 Reagent v2 (300 cyklů)	• Illumina, 20031371

Spotřební materiál	Dodavatel/katalogové číslo
PhiX Control v3	Illumina, FC-110-3001
20µl bariérové pipetovací špičky	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
200µl bariérové pipetovací špičky	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
1000µl bariérové pipetovací špičky	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
1,5ml mikrocentrifugační zkumavky	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
5ml zkumavky	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
15ml kónické centrifugační zkumavky	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
25ml nádobky na reagencie	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
0,2ml PCR stripy na 8 zkumavek s uzávěry	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
96jamkové PCR destičky	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
Adhezivní fólie Microseal 'B'	Bio-Rad, MSB1001
Abgene™ 96 Well 0,8ml Polypropylene Deepwell Storage Plate (MIDI destička, pouze původní pracovní postup)	Thermo Fisher, AB0859 nebo AB0765
Chlornan sodný (NaClO) k promytí po sekvenování (volitelně)	Sigma, 239305

Vybavení	Dodavatel/katalogové číslo
20µl pipeta	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
200µl pipeta	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
1000µl pipeta	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
20µl vícekanálové pipety	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
200µl vícekanálové pipety	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
Mikrocentrifuga	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
Mikrodestičková centrifuga	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
Třepačka vortex	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
Válec na těsnicí fólii	Obecný dodavatel laboratorních potřeb
Upevňovací indexové destičky	Illumina, FC-130-1005
Jeden z těchto magnetických stojanů: • DynaMag™-2 Magnet • MagJET Separation Rack, 2 x 1,5 ml tube	 Thermo Fisher, 12321D Thermo Fisher, MR01
Magnetic Stand-96	Thermo Fisher, AM10027
BioShake iQ, nebo BioShake XP	BioShake iQ, 1808-0506 BioShake XP, 1808-0505
Agilent 2200 TapeStation System (volitelně)	Agilent Technologies
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher
Jeden z těchto 96jamkových termocyklerů: • Veriti™ 96-Well Thermal Cycler • Eppendorf Thermo Cycler	 Thermo Fisher, 4375786 Eppendorf, 6325000560
Hybex System	SciGene, 1057-30-2
Hybex 1,5 ml tube block. (32 x 1,5ml zkumavek).	SciGene, 1057-34-0
Jeden z těchto sekvenátorů: • Illumina MiSeq • Illumina MiniSeq • Illumina iSeq	 Illumina, SY-410-1003 Illumina, SY-420-1001 Illumina, 20021532

10. Kontaktní informace

Výrobce:

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

Distributoři:

Asie a Pacifik (APAC)
CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Austrálie, 6160.
Tel.: +61-8-9336-4212
E-mail: orders-aus@caredx.com
Web: http://www.caredx.com

Evropa, Blízký východ a Afrika (EMEA)
CareDx AB,
Franzéngatan 5, SE-112 51 Stockholm, Švédsko.
Tel.: +46-8-508 939 00
Fax: +46-8-717 88 18
E-mail: orders-se@caredx.com
Web: http://www.caredx.com/

Severní a Jižní Amerika
CareDx Lab Solutions Inc.,
901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
Tel.: 1-877-OLERUP1
Fax: 610-344-7989
E-mail: orders-us@caredx.com
Web: http://www.caredx.com

Technická podpora a nahlašování závažných událostí:
E-mail: techsupport-global@caredx.com

Každou závažnou událost, ke které dojde v souvislosti s tímto přístrojem, je třeba nahlásit výrobci a příslušnému orgánu členského státu, ve kterém má uživatel a/nebo pacient sídlo

Další informace najdete na webových stránkách CareDx (https://www.caredx.com/contact-us/).

Související produkty:
IVD s označením CE:
AlloSeq Assign

11. Odkazy

1. Illumina Technical Note. **Nextera XT library prep: tips and troubleshooting** (06/29/18)
2. Illumina Technical Note. **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 (viz rovněž v publikaci uvedené citace)
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 (viz rovněž v publikaci uvedené citace)
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.

Historie dokumentu

Verze	Datum	Úprava	Schválil
1.0	19. února 2020	První verze AlloSeq Tx IFU CE. Vydal E. Naughton dne 19. února 2020	L. Westwood
1,1	28. dubna 2020	Byla doplněna sekce omezení: Test AlloSeq Tx sekvenuje fragmenty DNA o průměrné velikosti 700 bp, což znamená, že polymorfismy větší než 700 bp od sebe nelze fázovat, což může vést k heterozygotním nejednoznačnostem. Vydal E. Naughton 29. dubna 2020	L. Westwood
1.2	8. května 2020	Aktualizace Interferujících látek Znovu vydal E. Naughton dne 8. května 2020	L. Westwood
1.3	13. května 2020	Do tabulky Interferující látky byl doplněn biotin. Byly doplněny podrobnější informace o kontrolním vzorku v oddílu 1.9. Znovu vydal E. Naughton dne 14. května 2020	L. Westwood
1.4	20. května 2020	Aktualizace 1.4 Obsah soupravy AlloSeq Tx a požadavky na skladování s těmito opravami: 2× zkumavky na Tagmentation Wash Buffer, 2× zkumavky na Capture Wash Buffer. Znovu vydal E. Naughton dne 20. května 2020	L. Westwood
1,5	5. června 2020	Byly provedeny tyto změny: – Oprava H714 v tabulce reagencií v oddílu 2.2, – Oprava odkazu pro Hybridní záchyt v oddílu 3.0, – Doplnění odkazu na PhiX ve Spotřebním materiálu – Doplnění odkazu na pracovní sešity v bodu 3.1.5 a 3.2.5. Znovu vydal E. Naughton dne 5. června 2020	L. Westwood
1.6	20. října 2020	Byla přidána poznámka o používání NaOH. Znovu vydal E. Naughton dne 20. října 2020	H. Hogan
2.0	26. března 2021	V oddílu 8.0 byl aktualizován distributor z Vídně na Stockholm podle CR 2020-097. Reagencie iSeq v1 byla aktualizována jako výběhová a v oddílu 7.0 byla nahrazena v2 podle CR 2020-077. V oddílu 1.4 byl počet cyklů zmrazení a rozmrazení opraven z 25 na 12. Znovu vydal S. Antony dne 9. dubna 2021	S. Carnachan
3.0	6. května 2021	Byly aktualizovány následující informace: • Oddíl 1: Přesun oddílu týkajícího se podpůrných materiálů do oddílu 9; přidání pracovního sešitu IFU095-5. Přidáno vysvětlení týkající se rozdílu mezi původním pracovním postupem a pracovním postupem Early Pooling. Přidán cílový genetický obsah ASTX17.1(24)-B-IVD. Aktualizováno formátování tabulky obsahu sady Tx. Přidán odkaz na bukální stěr (RUO). Oprava meze detekce tak, aby odrážela DNA, nikoli koncentraci DNA. Přidány věty o nebezpečnosti H318 pro 2N NaOH, H351 a H373 pro Capture Beads, H351 pro Hybridisation Buffer 1; do tabulky přidány bezpečnostní informace o zastavovacím pufru Stop Buffer. • Oddíl 2 – přidán oddíl Příprava knihovny (pracovní postup Early Pooling) • Oddíl 3 – přidán oddíl Hybridní záchyt (pracovní postup Early Pooling) • Oddíl 4.1 – aktualizován popis přípravy vzorků, aby byl v souladu s pracovním sešitem • Oddíl 4.2 – v tabulce přidány indexy sady B, aktualizován odhad času z 2:45 hodin na 1:50 hodin, změněn krok odstředění z 280 x g po dobu 30 sekund na 100 x g po dobu 10 sekund, krok 9, 21f, změněn krok odstředění z 280 x g po dobu 1 minuty na 100 x g po dobu 10 sekund, krok 29, změněn krok odstředění z 280 x g po dobu 10 sekund na 100 x g po dobu 10 sekund, krok 36, u kroku 36 přidána poznámka „opakovat třepání podle kroku 35“ • Oddíly 4.4/5.7 - přidáno upřesnění širokého rozsahu (BR) ve všech tabulkách s reagenciemi Qubit	S. Carnachan

Verze	Datum	Úprava	Schválil
		• Oddíl 5.3 - do tabulky hybridizačních programů byla přidána vysvětlující poznámka „Ustálit (nepřekračujte 18 hodin při 62 °C, včetně kroku č. 4)“ • Oddíl 5.8 - opraveny odkazy na destičku/uzávěr TapeStation pro zkumavku/víčka • Oddíl 6.0 - odstraněna tabulka. Tato tabulka je uvedena v oddíle 1.1 • Oddíl 6.2 - požadovaný celkový objem MiSeq změněn ze 100 µl na 30 µl, aby byl v souladu se sešitem • Oddíl 6.4 - poznámka pro upřesnění, že do iSeq se vkládá pouze 20 µl ze zředěného poolu 100 µl • Oddíl 9 - přidána poznámka „Pouze původní pracovní postup“ na MIDI destičce, přidán chlornan sodný (NaOCl) k promytí po sekvenování • Oddíl 9 - Změněny názvy reagencií MiSeq tak, aby byly v souladu s objednacími údaji pro Illumina. Přidána souprava MiSeq Reagent Kit v3 (600 cyklů) pro AlloSeq Tx 8, přidány objednací informace pro zkumavky Qubit a zkumavky/víčka/destičky/fólie TapeStation Všeobecně: Na titulní stranu přidáno ASTX17.1(24)-B-IVD. Přidán text: „**Po použití uložte zpět do skladu pro další kroky.“** Doporučení pro reagencie, které je třeba uchovat pro další kroky, oprava drobných chyb ve formátování, gramatice, interpunkci a pravopisu v celém dokumentu. V návaznosti na zpětnou vazbu od terénního týmu byly přidány doplňující pokyny k důkladnému vortexování při všech případech použití kuliček Purification Bead. Opraveny všechny případy výskytu slova „hybex“ na „Hybex“ a slova „QuiBit“ na „Quibit“, opraven výraz „pulzní odstředění“. Aktualizovány oddíly 2.2 a 4.2 v tabulce pro Stop Buffer a provedena oprava formulace „Je nutná příprava“ na „Není nutná příprava“. Doplněna informace „importováno“ a symbol podle ISO 15223-1-2021 a IVDR. Znovu vydal L. Langley dne 13. října 2021	
4.0	28. ledna 2022	Opravena gramatika. Opraveny informace o omezeních týkajících se kvantifikace omezení. Opravena výkonová charakteristika, aby odpovídala příbalovým informacím. Provedeny změny na základě ZD-2445. Na základě souhrnného hodnocení byl aktualizován oddíl 2.3, kroky 8, 12 a 18 a oddíl 4.3, krok 7, a to přidáním podrobnějších informací o míchání kuliček Tagmentation Beads a Purification Beads. Aktualizován obsah boxu, aby odpovídal aktualizované konfiguraci soupravy CR2020-096 (SCN 2021-08-13).	K. Hunter
5.0	31. března 2022	Tx 17 (96) Sety A a B přidány do kódů produktů, Cílového genetického obsahu a Obsahu soupravy. V celém návodu k použití byly doplněny podrobné pokyny pro použití indexu s předem připravenými destičkami, zejména v oddílech 2.2 a 4.2. Vydal E. Naughton dne 27. dubna 2022	K. Hunter
6.0	13. června 2022	Tx 9 (96) Sety A a B přidány do kódů produktů, Cílového genetického obsahu a zamýšleného použití. Z loga AlloSeq Tx odstraněna zkratka ™. Opravena hodnota OD v Interferujících látkách. Sladění formulací v pracovním sešitě a návodu k použití. Oddíl 5.2, bod 12 ; změna objemu ethanolu z 200 µl na 800 µl. Oddíl 10: Přidány požadavky na zprávy o vigilanci	K. Hunter