



Kullanma Talimatları

IFU095

Sürüm Numarası: 6.0

Yayınlanma Tarihi: Temmuz 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,
Avustralya



CareDx AB,
Franzégatan 5,
SE-112 51
Stockholm, İsveç

EC **REP**

Qarad BV,
Cipalstraat 3,
2440 Geel,
Belçika



CareDx Pty Ltd

İçindekiler

1. Genel Bakış.....	3
1.1 İlke.....	3
1.2 Kullanım Amacı.....	4
1.3 AlloSeq Tx Hedeflenmiş Gen İçeriği.....	4
1.4 AlloSeq Tx Kit İçeriği ve Saklama ile İlgili Gereklilikler.....	4
1.5 Kısıtlamalar ve kontrendikasyonlar	6
1.6 Örnek Gereklilikleri	6
1.7 Etkileşim Maddeleri	6
1.8 Performans Özellikleri	7
1.9 Doğruluk.....	8
1.10 Özgüllük.....	8
1.11 Yeniden üretilebilirlik ve Tekrar edilebilirlik.....	9
1.12 Tespit Sınırı	9
1.13 Varsayımlar	9
1.14 Güvenlik	9
2. Kütüphane Hazırlama (Early Pooling İş Akışı).....	13
2.0 Protokole Giriş.....	13
2.1 Örnek Hazırlama.....	13
2.2 Kütüphane Hazırlama	13
2.3 Boyut Seçimi ve Saflaştırma	16
2.4 Qubit Miktar Belirleme (İsteğe Bağlı)	18
2.5 TapeStation Görselleştirme (İsteğe Bağlı)	19
3. Hibrit Yakalama (Early Pooling İş Akışı).....	20
3.0 Protokole Giriş.....	20
3.1 Prob Hibridizasyonu	20
3.2 Yakalama	21
3.3 Zenginleştirme Sonrası PCR.....	23
3.4 Zenginleştirme Sonrası PCR Saflaştırma	24
3.5 Qubit Miktar Belirleme.....	25
3.6 TapeStation Görselleştirme (İsteğe Bağlı)	25
4. Kütüphane Hazırlama (Asıl iş akışı)	26
4.0 Protokole Giriş.....	26
4.1 Örnek Hazırlama.....	27
4.2 Kütüphane Hazırlama	27
4.3 Boyut Seçimi ve Saflaştırma	30
4.4 Qubit Miktar Belirleme (İsteğe Bağlı)	31
4.5 TapeStation Görselleştirme (İsteğe Bağlı)	32
5. Hibrit Yakalama (Asıl iş akışı).....	33
5.0 Protokole Giriş.....	33
5.1 Örnek Havuzlama	33
5.2 Kütüphane Havuzu Konsantrasyonu (İsteğe Bağlı).....	34
5.3 Prob Hibridizasyonu	35
5.4 Yakalama	36
5.5 Zenginleştirme Sonrası PCR.....	37
5.6 Zenginleştirme Sonrası PCR Saflaştırma	38
5.7 Qubit Miktar Belirleme.....	39
5.8 TapeStation Görselleştirme (İsteğe Bağlı)	40
6. Dizileme	41
6.0 Protokole Giriş.....	41

6.1 PhiX Hazırlama.....	42
6.2 MiSeq için Seyreltin ve Denatüre Edin	43
6.3 MiSeq için Seyreltin ve Denatüre Edin	44
6.4 iSeq için Seyreltin	45
7. Dizi Analizi	45
8. Sorun Giderme Kılavuzu.....	46
9. Destekleyici Bilgiler	47
Lisans	47
Gerekli Olan Ancak Temin Edilmeyen Sarf Malzemeleri ve Ekipmanlar.....	47
10. İletişim Bilgileri	49
11. Referanslar	50

1. Genel Bakış

1.1 İlke

AlloSeq Tx, nakil hastaları ve potansiyel donörler arasındaki genetik uyumun belirlenmesine yardımcı olmak üzere tasarlanmış olan hedefli gen dizileme ürünleri için ürün ailesi adıdır. AlloSeq Tx, tam genom kitaplığı hazırlamak amacıyla, ilgilenilen genleri zenginleştirmek üzere hibrit yakalama teknolojisinden yararlanır. Geleneksel uzun aralıklı PCR tekniklerine karşın hibrit yakalama teknolojisinin kullanılması, iş akışı değişikliklerine gerek olmadan değişken gen/dizi içeriğine ilişkin esneklik sağlar ve iş akışıyla ilgili avantajlar sunar.

AlloSeq Tx kitlerinde aşağıdakiler vardır:

- Tam genom kütüphaneleri hazırlamaya yönelik reaktifler,
- Dizi hedefleri yakalamayı tamamlayıcı, biyotinlenmiş probler ve
- Yakalanan hedefleri dizileme için zenginleştirmeye yönelik reaktifler.

Dizileme işlemi, Illumina dizileme cihazında yapılır (MiSeq, MiniSeq veya iSeq) ve elde edilen dizi verileri fastq dosyalarına çıkarılır, bunlar genotiplemeye yardımcı olmak üzere AlloSeq Assign® yazılımına aktarılır.

Bu *Kullanma Talimatları* belgesinde, CareDx AlloSeq Tx ürün ailesinin kullanımına ilişkin prosedür açıklanmaktadır. Her bir spesifik AlloSeq Tx ürünü tarafından hedeflenen gen içeriği, aşağıda *Hedeflenmiş Gen İçeriği* tablosunda listelenmektedir.

Laboratuvar örneği işlemeye ve kayıt tutmaya yardımcı olmak için, her bir prosesin Excel çalışma kitapları da temin edilir. Çalışma kitapları, reaktif hacmi hesaplamalarında ve dizileme için örnek sayfalarının oluşturulmasında yardımcı olur. Destekleyici çalışma kitapları şunlardır:

IFU095-1_AlloSeq Tx Kütüphane Hazırlama Çalışma Kitabı CE IVD
IFU095-2_AlloSeq Tx Hibrit Yakalama Çalışma Kitabı CE IVD
IFU095-3_AlloSeq Tx Dizileme Çalışma Kitabı CE IVD
IFU095-5_AlloSeq Tx Erken Havuzlama Çalışma Kitabı CE IVD

Bu belgede iki iş akışı seçeneği özetlenmektedir. Asıl iş akışı ve Erken Havuzlama iş akışı. Erken Havuzlama iş akışında, sonraki tüm adımlar için tek bir tüp içine indekslendikten hemen sonra numuneler havuza alınır. Erken Havuzlama iş akışı, plaka bazlı boyut seçimini, saflaştırmayı ve >12 örnek/çalışma işleme alınırken isteğe bağlı konsantrasyon adımını ortadan kaldırır. Bu iş akışı, kullanıcının tek bir çalışma vardiyasında dizilemeye kadar örnekler almasına olanak tanır. Bu iş akışı, otomasyon kullanmayan ve Asıl iş akışına kıyasla manuel süresi daha az olan, sarf malzemesi daha az kullanılan ve pipetleme adımları %46 daha az olan bir protokolü tercih eden laboratuvarlara çok uygundur. *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Çalışma Kitabı CE IVD*, Early Pooling çalışma kitabıyla birlikte kullanılmalıdır.

Asıl iş akışının plaka bazlı biçimi, bu prosedürü otomatik hale getirmeyi tercih eden laboratuvarlara çok uygundur. Asıl İş Akışıyla birlikte, *IFU095-1_AlloSeq Tx Kütüphane Hazırlama Çalışma Kitabı CE IVD*, *IFU095-2_AlloSeq Tx Hibrit Yakalama Çalışma Kitabı IVD* ve *IFU095-3_AlloSeq Tx Dizileme Çalışma Kitabı CE IVD* kullanılmalıdır.

Kit, kurallarla düzenlenmiş laboratuvarlarda eğitimli personel tarafından kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Ürünler kullanılırken gerekli özen ve dikkat gösterilmelidir. Tüm kullanıcıların, prosedüre başlamadan önce bütün Kullanma Talimatlarını, özellikle *Güvenlik* bölümünü okumasını öneririz. AlloSeq Assign yazılımının kullanımıyla ilgili prosedürler, AlloSeq Assign Yazılımı Kullanma Talimatlarında bulunabilir.

1.2 Kullanım Amacı

AlloSeq Tx, nakil hastaları ve potansiyel donörler arasındaki genetik uyumun belirlenmesine yardımcı olmak üzere tasarlanmış olan hedefli gen dizileme ürünleri için ürün ailesi adıdır; buna 17 lokusa kadar hedeflenen zenginleştirmeye yönelik problemler dahildir.

AlloSeq Tx 17 tiplene kitleri, organ veya kök hücre naklinin genetik eşleşmesine yardımcı olmak üzere, HLA-A, B, C, E, F, G, H, DRB1/3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, MICA ve MICB'nin DNA tipleneğine yönelik kalitatif testlerdir.

AlloSeq Tx 9 tiplene kitleri, organ veya kök hücre naklinin genetik eşleşmesine yardımcı olmak üzere, HLA-A, B, C, DRB1/3/4/5, DQB1 ve DPB1'in DNA tipleneğine yönelik kalitatif testlerdir.

Ürün, Illumina MiSeq, MiniSeq ve iSeq dizileme cihazlarının yanında, AlloSeq Assign yorumlama yazılımıyla kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Cihaz, nakil için eşleşen donörler ve alıcılara yönelik doku (HLA) tipleneği gerçekleştirilen, kurallarla uygun şekilde düzenlenmiş laboratuvarlarda, uygun eğitim almış, popülasyonlarındaki HLA tipleri frekansına ilişkin bilgilere sahip personel tarafından kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

AlloSeq Tx ürünleri yalnızca profesyonel kullanım içindir ve klinik kararlar alınırken yegane araç olarak kullanılmamalıdır. AlloSeq Tx kitleri, hastalığın tanısı için kullanılmaz.

1.3 AlloSeq Tx Hedeflenmiş Gen İçeriği

Ürün Adı	Ürün Kodu	Hedeflenmiş Genler	Kit Boyutu	Dizileme Kapasitesi
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(24)-IVD	HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA ve MICB	24 kütüphane hazırlama 4 zenginleştirme (zenginleştirme başına 6-24 arasında örnek)	MiSeq Micro Flowcell'de ≤24 örnek MiSeq Nano Flowcell'de ≤6 örnek iSeq'da ≤24 örnek MiniSeq MidOutput Flowcell'de ≤24 örnek
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 ve MICB	96 kütüphane hazırlama 8 zenginleştirme (zenginleştirme başına 12-96 arasında örnek)	MiSeq v2 Standard Flowcell'de ≤96 örnek MiSeq Micro Flowcell'de ≤24 örnek MiSeq Nano Flowcell'de ≤6 örnek iSeq'da ≤48 örnek MiniSeq MidOutput Flowcell'de ≤24 örnek
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 ve -DPB1	96 kütüphane hazırlama 8 zenginleştirme (zenginleştirme başına 12-96 arasında örnek)	MiSeq Standard Flowcell'de ≤96 örnek MiSeq Micro Flowcell'de ≤24 örnek MiSeq Nano Flowcell'de ≤6 örnek iSeq'da ≤48 örnek MiniSeq MidOutput Flowcell'de ≤24 örnek
AlloSeq Tx 9	ASTX9.1(96)-B-IVD			

1.4 AlloSeq Tx Kit İçeriği ve Saklama ile İlgili Gereklilikler

Aşağıdaki sıcaklık spesifikasyonlarında saklandığında kit bileşenleri, dış kit kaplarında belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir ve 12 adede kadar dondurma-çözdürme döngüsünü tolere edebilir. Kullanıldıktan sonra kitler/bileşenler hemen saklama koşullarına döndürülmelidir.

Bu zaman çerçevesinin ötesine uzatılmaları için, hızlandırılmış stabilite çalışmaları hala devam etmektedir. Onay amaçlı gerçek zamanlı testler devam etmekle birlikte, bu kitlerin son kullanma tarihlerinden sonra KULLANILMAMALARI önemle tavsiye edilir.

Reaktif Kutusu 1/5, -15 ila -25°C’de saklayın

Reaktif	Miktar (24 test)	Tüp boyutu/türü (24 test)	Miktar (96 test)	Tüp boyutu/türü (96 test)
Tagmentation Beads	1	0,5 ml	1	1,5 ml
Tagmentasyon Tamponu	1	0,5 ml	1	1,5 ml
PCR Mix-1	Yok	Yok	1	5 ml

Reaktif Kutusu 2/5, 15 ila 30°C’de saklayın

Reaktif	Miktar (24 test)	Tüp boyutu/türü (24 test)	Miktar (96 test)	Tüp boyutu/türü (96 test)
Stop Buffer	1	1,5 ml	2	2 ml
Tagmentasyon Yıkama Tamponu	2	5 ml	1	50 ml

Reaktif Kutusu 3/5, -15 ila -25°C’de saklayın

Reaktif	Miktar (24 test)	Tüp boyutu/türü (24 test)	Miktar (96 test)	Tüp boyutu/türü (96 test)
AlloSeq Tx İndeks Primerleri	1 grup (10 adet)	FluidX tüp	1 plaka	96 kuyucuklu plaka

Reaktif Kutusu 4/5, -15 ila -25°C’de saklayın

Reaktif	Miktar (24 test)	Tüp boyutu/türü (24 test)	Miktar (96 test)	Tüp boyutu/türü (96 test)
Ürüne Özel AlloSeq Tx Probları	1	0,5 ml	1	0,5 ml
PCR Karışımı	1	1,5 ml	Yok	Yok
PCR Mix-2	Yok	Yok	1	0,5 ml
PCR Primerler	1	0,5 ml	1	0,5 ml
Hibridizasyon Tamponu 1	1	1,5 ml, Konik	1	1,5 ml, Konik
Capture Wash Buffer	4	1,5 ml, Sarı Konik	8	1,5 ml, Sarı Konik
Capture Elution Buffer 1	1	0,5 ml	1	0,5 ml
2N NaOH	1	0,5 ml	2	0,5 ml

Reaktif Kutusu 5/5, 2-8°C’de saklayın

Reaktif	Miktar (24 test)	Tüp boyutu/türü (24 test)	Miktar (96 test)	Tüp boyutu/türü (96 test)
Safleştirme Boncukları	1	5 ml	Yok	Yok
Purification Beads-1	Yok	Yok	3	5 ml
Purification Beads-2	Yok	Yok	1	0,5 ml
Yeniden Süspansiyon Tamponu	2	1,5 ml	2	5 ml
Yakalama Boncukları	1	1,5 ml	1	5 ml
Hibridizasyon Tamponu 2	1	0,5 ml	1	0,5 ml
Yakalama Elüsyon Tamponu 2	1	0,5 ml	1	0,5 ml

1.5 Kısıtlamalar ve kontrendikasyonlar

- Bu kitlerin, laboratuvarında uygulanmadan önce, genotipi diğer moleküler bazlı prosedürlerle belirlenmiş örnekler kullanılarak, kullanıcı tarafından valide edilmesi önemle tavsiye edilir.
- kullanıcının, ürün etiketlerinde sağlanan bütün talimatlara uyması önemle tavsiye edilir. Açıklanan prosedürde değişiklik yapılması önerilmez, desteklenmez ve değişiklikler tiplene hatalarına neden olabilir.
- Her kütüphane hazırlama çalışmasına pozitif kontrol (insan DNA'sı) ve negatif/şablon yok kontrolü (DNA yerine steril su kullanılarak) dahil edilmesi önerilir. Pozitif kontrol, miktarı belirlenebilir bir kütüphane olmalıdır (Qubit veya kapsam dizileme ölçümleriyle ölçülür) ve elde edilen dizi, örneğin beklenen genotipine uygun olmalıdır. Her bir deney için negatif şablon kontrolünde miktarı belirlenebilir kütüphane olmamalıdır (Qubit ile ölçülür veya Assign'da Düşük Kapsam olarak raporlanır). Şablon yok kontrolü için, miktarı belirlenebilir kütüphane oluşturulursa, çalışma tekrarlanmalıdır.
- AlloSeq Tx analizi, 500 bp ortalama insert boyutu olan DNA fragmanlarını diziler, yani 500 bp'den fazla aralıklı polimorfizmler evrelenemez ve bu, heterozigot belirsizliklere yol açabilir.

1.6 Örnek Gereklilikleri

Yüksek molekül ağırlıklı insan genomik DNA'sı (Tris/EDTA tamponuna süspansiyon edilmiş ve OD_{260/280} > 1,8), ACD ya da EDTA antikoagüle tam kan numunelerinden ekstrakte edilir. Heparin içeren tam kan numuneleri KULLANMAYIN. Bu yöntem, bukkal sürüntü DNA'sında da kullanılabilir.

Önemli: Bu belgede, bukkal sürüntü DNA'sına yapılan tüm referanslar yalnızca Araştırma Kullanımı içindir. **Bukkal sürüntü DNA'sı, tanı amaçlı kullanım için bu yöntemle valide edilmemiştir.**

1.7 Etkileşim Maddeleri

CareDx Pty Ltd, testi etkileyebilecek tüm olası etkileşim maddelerini belirlemiştir. Aşağıdaki tabloya bakın.

İnhibitör	Potansiyel kaynak	Risk	Yorumlar
EDTA	Tampon, kan alım tüpleri	Çok düşük	DNA'yı <1mM EDTA olan TE veya Tris-HCl pH8 içinde yeniden süspansiyon edin. Ticari Kan DNA hazırlama kitleri kullanın ve/veya EDTA kan alım tüpleri kullanmaktan kaçının.
Alkoller	Etanol, izopropanol, izoamil alkol	Düşük	DNA peletleri veya boncuklarının havayla kurduğundan emin olun ve etanol damlacıkları için görsel inceleme yapın (%1 etanol = 100ul PCR reaksiyon içinde 1,25 ul %80 etanol). AlloSeq Tx protokolünde, etanol taşınması nedeniyle inhibisyonu düşük bir risk, ancak diğer faktörlere göre biraz yüksek bir risk haline getiren, birden fazla %80 etanol yıkama adımı vardır.
Fazla tuzlar	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Çok düşük	DNA peletleri veya boncuklarının %80 etanol ile iyice yıkanmasını sağlayın. Başlangıç genomik DNA için OD 260/230 değerinin yaklaşık 2 olduğundan emin olun
Kaotropik tuzlar	Guanidinyum Cl; MgCL ₂ ; üre	Çok düşük	DNA peletleri veya boncuklarının %80 etanol ile iyice yıkanmasını sağlayın. Başlangıç genomik DNA için OD 260/230 değerinin yaklaşık 2 olduğundan emin olun
Fenol:kloroform	Organik taşıma	Çok düşük	Yaygın kullanılan ticari Trizol DNA ekstraksiyon prosedürünün bir bileşeni. DNA peletleri veya boncuklarının %80 etanol ile iyice yıkanmasını sağlayın. Başlangıç genomik DNA için OD 260/230 değerinin yaklaşık 2 olduğundan emin olun

İnhibitör	Potansiyel kaynak	Risk	Yorumlar
Proteinler	BSA, PEG, kan albümini	Çok düşük	Ticari Kan DNA hazırlama kitleri kullanın. Başlangıç genomik DNA için OD 260/280 değerinin >1,8 olduğundan emin olun
Heme, hemoglobin, immüoglobulinler	Kan	Çok düşük	Fazla hemoliz sergileyen kan örneklerini kullanmayın. Ticari Kan DNA hazırlama kitleri kullanın. Başlangıç genomik DNA için OD 260/280 değerinin >1,8 olduğundan emin olun
Deterjanlar/DDT	Na deoksikolat, sarkosil, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, N-oktil glukozit	Çok düşük	DNA peletleri veya boncuklarının %80 etanol ile iyice yıkanmasını sağlayın. Başlangıç genomik DNA için OD 260/230 değerinin yaklaşık 2 olduğundan emin olun
Proteazlar	Proteinaz K, örnek işleme	Çok düşük	Ticari Kan veya tükürük DNA hazırlama kitleri kullanın. Her zaman eldiven giyin
Nükleazlar	Örnek işleme, restriktif enzimler, mikrokokal nükleaz	Çok düşük	Ticari Kan DNA hazırlama kitleri kullanın. Her zaman eldiven giyin
Egzogen DNA/RNA	Taşınma, kontaminasyon	Çok düşük	Ayrılmış ön PCR alanında genomik DNA hazırlayın
Taşıyıcılar	RNA, heparin, glikojen	Çok düşük	Ticari Kan DNA hazırlama kitleri kullanın ve/veya heparin kan alım tüpleri kullanmaktan kaçının.
Fazla metal iyonları	PCR tamponundan Mg ²⁺ , Fe iyonları	Çok düşük	DNA peletleri veya boncuklarının %80 etanol ile iyice yıkanmasını sağlayın. Başlangıç genomik DNA için OD 260/230 değerinin yaklaşık 2 olduğundan emin olun
Antiviral ilaçlar (ör. asiklovir)	Kan	Çok düşük	Ticari Kan DNA hazırlama kitleri kullanın. Başlangıç genomik DNA için OD 260/280 değerinin >1,8 olduğundan emin olun
Eldiven pudrası	Pudralı eldivenler	Çok düşük	Pudrasız eldivenler kullanın
UV ışıklı PCR tüpleri	PCR tüplerinin UV işlemesi	Çok düşük	Plastik eşyalara UV işlemesi uygulamayın
Biyotin	Streptavidinle etkileşime giren farmasötik maddelerden	Çok düşük	Protokol içinde, örnek toplama ve hibrit yakalama adımı arasında çok sayıda saflaştırma yıkaması vardır ve biyotin moleküllerinin giderilmesini sağlayacaklardır. Hibrit yakalama analizi olduğunda, biyotin varlığı (yukarıda özetlendiği gibi, olası değildir), hatalı bir sonuca yol açmaz. Zenginleştirmeye dair daha düşük etkinliğe yol açabilir ve bu, düşük zenginleştirme verimi olarak saptanır veya sonuç vermez.

1.8 Performans Özellikleri

Analiz performansı, dahili CareDx kontrol örnekleri, Uluslararası Histokompatibilite Çalıştayları (IHW) HLA Referans Standartları ve Uluslararası HLA DNA Değişimi, Kaliforniya Üniversitesi, Los Angeles'tan (UCLA) alınan örnekleri içerecek şekilde, bilinen genotipleri olan DNA örnekleri paneli kullanılarak değerlendirilmiştir. Kütüphane hazırlama, zenginleştirme ve dizileme performansı, tanımlı kabul kriterlerine kıyasla değerlendirilmiştir.

1.9 Doğruluk

AlloSeq Tx ürünüyle birlikte AlloSeq Assign yazılımı, HLA tiplemesi için ASHI standardına (Amerikan Histokompatibilite ve İmmünogenetik Birliği); EFL standardına (Avrupa İmmünogenetik Federasyonu) uygun olacak şekilde tasarlanmıştır.

Doğrulama ve validasyon çalışmalarında, alternatif bir yöntemle tiplene yapılan örneklerle genotipleme uyumunu değerlendirmek amacıyla AlloSeq Tx ürünüyle birlikte AlloSeq Assign kullanılmıştır. Dahili kontrol örneklerine, Dizi bazlı tiplene (SBT) kullanılarak tiplene uygulanmıştır. IHW ve UCLA'nın uluslararası kabul görmüş depolarından alınan örnekler, doğrulama çalışmaları kapsamında kullanılmıştır ve SBT, SSP ve SSO'yu içeren çeşitli yöntemler kullanılarak bunlara tiplene uygulanmıştır. Bunlar, en geçerli HLA allellerini ve belirli seyrek allelleri belirten, karakterize edilmiş DNA örnekleridir.

Doğrulama ve Validasyon çalışmalarından elde edilen sonucun özeti:

ÖLÇÜM	PANEL	PANEL BÜYÜKLÜĞÜ (n)	SONUÇ
Genotipleme Uyumu	Dahili	190	%100
Genotipleme Uyumu	UCLA	24	%98,12
Genotipleme Uyumu	IHW	48	%98,06
Genotipleme Uyumu	Beta Test Bölgeleri	124	%99,54
Toplam/Genel Uyum			%99,49

Doğrulama/validasyon çalışmalarında gözlenen tüm uyumsuzluk örneklerinde, uyumsuzluğun, önceki tiplene yöntemi veya teknolojisindeki kısıtlamalardan ortaya çıktığına inanılmaktadır.

1.10 Özgüllük

AlloSeq Tx analizleri bağlamında özgüllük, hedef lokuslar dışındaki lokuslara eşlenen dizi okuması yüzdesini (analizin yakaladığı DNA fragmanlarını belirtir) açıklar. Genomik DNA ve oligonükleotit dizi reaktifleri arasındaki bir hibridizasyon biçimine dayanan, PCR veya hibrit yakalama analizleri olmalarına bakılmaksızın bütün HLA tiplene analizlerinde, özgüllük “eksikliği” unsuru olacaktır. Bu, insan genomundaki pek çok genin, çoklu gen ailelerinin parçası olmasının bir sonucudur. HLA genleri farklı değildir. HLA-A, -B ve -C, HLA sınıf 1 gen ailesinin parçasıdır. Ancak iyi bilinen genlere ek olarak, HLA psödogenleri ile gen fragmanları ve hibrit yakalama analizlerinin yapısında olan özgüllük özellikleriyle yakalanması muhtemel açıklanmamış olası işlevsel genler vardır. Bu genlerin tam sayısı bilinmemektedir ancak farklı kişilerden genomlar arasında değişiklik göstermektedir.

AlloSeq Tx için özgüllük, “hedef dışı okumalar” ile yakalanır. AlloSeq Tx analizinin hedefi, aşağıdakilerin geçerli olduğu bir özgüllük seviyesine ulaşmaktır;

1. Spesifik olmayan okumaların, doğru genotiplene yapılması için çok az sayıda olan hedef okumalara yol AÇMADIĞI,
2. Spesifik olmayan okumaların, hedef lokusların konsensüs dizisine katkı YAPMADIĞI,
3. Yüksek özgüllüğün, hassasiyeti riske attığı ve bazı allel bölgelerinin yakalanmadığı.

AlloSeq Assign, spesifik olmayan / veya hedef dışı okumaları belirleyebilir ve bunları, yakalanan toplam okuma sayısına görece olarak sunabilir. Bu veriler, analiz performansı için kalite kontrol ölçümü olarak kullanılır. Çok yüksek veya çok düşük özgüllük, hatalı hibridizasyon sıcaklıklarını, sürelerini, reaktifte ve probda kalite sorunlarını işaret edebilir.

Doğrulama verilerinde, %12'ye kadar düşük özgüllüğün, analiz üzerinde etkisi olmadığı ortaya konmuştur, bununla birlikte tipik özgüllük değerleri %64 ile 92 arasında yer almaktadır. Tam özgüllük muhtemel değildir ve potansiyel kalite sorunlarının göstergesi olacaktır. Prob tasarım stratejisinde, eksik allel potansiyelinin muhtemel olmaması sağlanmakla birlikte, özgüllük - özgüllük paradigmasının doğru olması muhtemeldir. Yani; bir miktar düşük özgüllük derecesi, tam hassasiyet sağlayacaktır ve yeni allelleri de içerecek şekilde alleller başarılı biçimde dizilenecektir.

1.11 Yeniden üretilebilirlik ve Tekrar edilebilirlik

AlloSeq Tx ürünüyle birlikte, AlloSeq Assign yazılımının, lotlar arası doğrulama çalışmasında ve laboratuvarlar, kullanıcılar ve cihazlar arasında eşdeğer sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır; bu durum, dört harici merkezdeki doğrulamada ve validasyonda kanıtlanmıştır. AlloSeq Tx ürününün, tekrarlı çalışmalarda aynı örnek için eşdeğer sonuçlar verdiği doğrulanmıştır.

1.12 Tespit Sınırı

Yüksek molekül ağırlıklı insan genomik DNA'sının önerilen miktarı 100-1000 ng'dir. Dahili testlerde, DNA girişi 50 ng kadar düşük örneklerin de kullanılabileceği ortaya konmuştur. Yetersiz kalitedeki veya kesilmiş DNA'dan da doğru genotipler elde edilmiştir.

1.13 Varsayımlar

- Cihazların düzgün kalibre edilmiş olması, bakımlarının düzgün yapılması ve gereken şekilde bir bakım planının izlenmesi.
- Standart Çalışma Prosedürlerinin (SÇP'ler) yürürlükte olması ve denetlenmesi.
- Kit, eğitimli ve yetkili laboratuvar personeli tarafından kullanılır.
- Reaktifler, belirtilen son kullanma tarihlerinden önce kullanılır.
- Farklı kit serilerinden reaktifler birlikte KULLANILMAZ. Kullanılmaları halinde kitin performansı etkilenebilir
- Yalnızca, temin edilmeyip gerekli oldukları bu belge içinde belirtilmiş reaktifler kullanılır.
- DNA numunelerinin çapraz kontaminasyonunu veya örneklerin birbirleriyle karışmasını önlemek için dikkatli olunur.
- Dökülme yaşanmaması için, kullanımın bütün aşamalarında dikkatli olunur.
- Bu belgeyle birlikte, üretici tarafından temin edilen çalışma kitapları kullanılır

1.14 Güvenlik

Bu prosedürü uygularken, genel laboratuvar güvenliği uygulamalarını ve temiz oda kontaminasyon önleme uygulamalarını izleyin. CareDx Pty Ltd risk yönetimi prosesiyle, tüm riskler azaltılarak kabul edilir bir sınıra getirilmiştir. Tehlikeli kullanım senaryolarının önüne geçilmesi için, temin edilen çalışma kitaplarıyla birlikte Kullanma Talimatları izlenmelidir. Bu kit içerisinde tehlikeli maddeler vardır. Lütfen Güvenlik Bilgi Formlarına bakın ve kullanım ve elden çıkarmayla ilgili gerekli tüm önlemleri alın.

KİT BİLEŞENİ	SEMBOL/RESİMLİ YAZI	GÜVENLİK UYARISI
TAGMENTASYON TAMPONU N,N-Dimetilformamid içerir	 	Uyarı kelimesi: Tehlike Tehlike ifadeleri H319 – Ciddi göz tahrişine neden olur H332 – Yutulması halinde zararlıdır H350 – Kansere neden olabilir H360 – Fertiliteye veya doğmamış bebeğe zarar verebilir Önlem ifadeleri – AB (S28, 1272/2008) P201 – Kullanmadan önce özel talimatlar alın P202 – Tüm güvenlik önlemlerini okuyup anlayana kadar kullanmayın P261 – Toz/duman/gaz/buğu/buhar/sprey maddelerini solumayın P270 – Bu ürünü kullanırken bir şey yemeyin, içmeyin ya da tütün mamulü kullanmayın P280 – Koruyucu eldivenler/koruyucu giysiler/göz koruması/yüz koruması giyin/takın P264 – Kullandıktan sonra yüzünüzü, ellerinizi ve açığındaki cildinizi iyice yıkayın

KİT BİLEŞENİ	SEMBOL/RESİMLİ YAZI	GÜVENLİK UYARISI
		P272 – Kontamine olmuş iş giysilerinin çalışma alanı dışına çıkarılmasına izin verilmemelidir P308 + P313 – Maruz KALIRSANIZ veya endişe DUYUYORSANIZ: Tıbbi yardım/destek alın P304 + P340 – SOLUNARAK VÜCUDA ALINIRSA: Kişiyi temiz havaya çıkarın ve rahat nefes alabileceği bir pozisyonda hareketsiz halde tutun P313 – Tıbbi yardım/destek alın P305 + P351 + P338 – GÖZLERE KAÇARSA: Birkaç dakika boyunca dikkatli bir şekilde suyla yıkayın. Varsa ve kolay çıkarılıyorsa, kontakt lensleri çıkarın. Yıkamaya devam edin P337 + P313 – Göz tahrişi devam ederse: Tıbbi yardım/destek alın P405 – Kilitli şekilde saklayın P501 – İçeriği/kabı, onaylı bir atık bertarafı tesisine götürün
PCR KARIŞIMI Karışım Tetrametilamonyum klorür içerir		Uyarı kelimesi Tehlike Tehlike ifadeleri H302 – Yutulması halinde zararlıdır H371 – Organlarda hasara neden olabilir H412 – Su yaşamı için zararlı olup etkileri uzun sürelidir Önlem ifadeleri – AB (§28, 1272/2008) P260 – Toz/duman/gaz/buğu/buhar/sprey maddelerini solumayın P270 – Bu ürünü kullanırken bir şey yemeyin, içmeyin ya da tütün mamulü kullanmayın P280 – Koruyucu eldivenler/koruyucu giysiler/göz koruması/yüz koruması giyin/takın P264 – Kullandıktan sonra yüzünüzü, ellerinizi ve açıktaki cildinizi iyice yıkayın P272 – Kontamine olmuş iş giysilerinin çalışma alanı dışına çıkarılmasına izin verilmemelidir P273 – Çevreye salınmamasını sağlayın P308 + P313 – Maruz KALIRSANIZ veya endişe DUYUYORSANIZ: Tıbbi yardım/destek alın P301 + P312 – YUTARSANIZ: İyi hissetmiyorsanız ZEHİR DANIŞMA MERKEZİ'ni veya bir doktoru arayın P330 – Ağzınızı çalkalayın P405 – Kilitli şekilde saklayın P501 – İçeriği/kabı, onaylı bir atık bertarafı tesisine götürün
2N NaOH Sodyum hidroksit içerir		Uyarı kelimesi Tehlike Tehlike ifadeleri H314 – Ciddi cilt yanıklarına ve göz hasarına neden olur H318 – Ciddi göz hasarına neden olur Önlem ifadeleri – AB (§28, 1272/2008) P260 – toz/duman/gaz/buğu/buhar/sprey maddelerini solumayın P264 – Kullandıktan sonra yüzünüzü, ellerinizi ve açıktaki cildinizi iyice yıkayın P280 – Koruyucu eldivenler/koruyucu giysiler/göz koruması/yüz koruması giyin/takın P301 + P330 + P331 – YUTULMASI HALİNDE: ağızı çalkalayın. Zorla kusturmaya ÇALIŞMAYIN P303 + P361 + P353 – CİLT ÜZERİNE GELDİĞİNDE (ya da saçlar): Tüm kontamine olmuş giysileri hemen çıkarın. Cildi suyla yıkayın/duş alın P363 – Yeniden kullanmadan önce, kontamine olmuş giysileri yıkayın P310 – Hemen ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ veya doktoru arayın P304 + P340 – SOLUNARAK VÜCUDA ALINIRSA: Kişiyi temiz havaya çıkarın ve rahat nefes alabileceği bir pozisyonda hareketsiz halde tutun

KİT BİLEŞENİ	SEMBOL/RESİMLİ YAZI	GÜVENLİK UYARISI
		P305 + P351 + P338 – GÖZLERE KAÇARSA: Birkaç dakika boyunca dikkatli bir şekilde suyla yıkayın. Varsa ve kolay çıkarılıyorsa, kontakt lensleri çıkarın. Yıkamaya devam edin P405 – Kilitli şekilde saklayın P501 – İçeriği/kabı, geçerli olan yerel, bölgesel, ulusal ve uluslararası düzenlemelere uygun şekilde elden çıkarın
CAPTURE BEADS Formamid içerir		Uyarı kelimesi Tehlike Tehlike ifadeleri H351 – Kansere neden olma şüphesi H360 – Fertiliteye veya doğmamış bebeğe zarar verebilir H373 – Uzun süreli veya tekrarlı maruziyet olduğunda organlarda hasara neden olabilir Önlem ifadeleri – AB (§28, 1272/2008) P201 – Kullanmadan önce özel talimatlar alın P202 – Tüm güvenlik önlemlerini okuyup anlayana kadar kullanmayın P260 – Toz/duman/gaz/buğu/buhar/sprey maddelerini solumayın P270 – Bu ürünü kullanırken bir şey yemeyin, içmeyin ya da tütün mamulü kullanmayın P280 – Koruyucu eldivenler/koruyucu giysiler/göz koruması/yüz koruması giyin/takın P264 – Kullandıktan sonra yüzünüzü, ellerinizi ve açığındaki cildinizi iyice yıkayın P272 – Kontamine olmuş iş giysilerinin çalışma alanı dışına çıkarılmasına izin verilmemelidir P308 + P313 – Maruz KALIRSANIZ veya endişe DUYUYORSANIZ: Tıbbi yardım/destek alın P405 – Kilitli şekilde saklayın P501 – İçeriği/kabı, onaylı bir atık bertarafı tesisine götürün
HYBRIDISATION BUFFER 1 Formamid içerir		Uyarı kelimesi Tehlike Tehlike ifadeleri H351 – Kansere neden olma şüphesi H360 – Fertiliteye veya doğmamış bebeğe zarar verebilir Önlem ifadeleri – AB (§28, 1272/2008) P201 – Kullanmadan önce özel talimatlar alın P202 – Tüm güvenlik önlemlerini okuyup anlayana kadar kullanmayın P261 – Toz/duman/gaz/buğu/buhar/sprey maddelerini solumayın P270 – Bu ürünü kullanırken bir şey yemeyin, içmeyin ya da tütün mamulü kullanmayın P280 – Koruyucu eldivenler/koruyucu giysiler/göz koruması/yüz koruması giyin/takın P264 – Kullandıktan sonra yüzünüzü, ellerinizi ve açığındaki cildinizi iyice yıkayın P272 – Kontamine olmuş iş giysilerinin çalışma alanı dışına çıkarılmasına izin verilmemelidir P308 + P313 – Maruz KALIRSANIZ veya endişe DUYUYORSANIZ: Tıbbi yardım/destek alın P405 – Kilitli şekilde saklayın P501 – İçeriği/kabı, onaylı bir atık bertarafı tesisine götürün

KİT BİLEŞENİ	SEMBOL/RESİMLİ YAZI	GÜVENLİK UYARISI
STOP BUFFER Sodyum Dodesil Sülfat içerir		Uyarı kelimesi Uyarı Tehlike ifadeleri H319 – Ciddi göz tahrişine neden olur Önlem ifadeleri – AB (528, 1272/2008) P264 – Kullandıktan sonra yüzünüzü, ellerinizi ve açığındaki cildinizi iyice yıkayın P280 – Koruyucu eldivenler/koruyucu giysiler/göz koruması/yüz koruması giyin/takın P305 + P351 + P338 – GÖZLERE KAÇARSA: Birkaç dakika boyunca dikkatli bir şekilde suyla yıkayın. Varsa ve kolay çıkarılıyorsa, kontakt lensleri çıkarın Yıkamaya devam edin P337 + P313 – Göz tahrişi devam ederse: Tıbbi yardım/destek alın

NOT: ‘Purification Beads’ bileşeni, EC 1272/2008 (CLP/GHS), EC Yönetmelikleri 1999/45EC ile 67/548/EEC ya da US-OSHA (HCS 29 CFR 1910.1200) ve UN GHS uyarınca tehlikeli bir konsantrasyon olarak kabul edilmeyen Sodyum Azit (<%0,1) içerir.

AlloSeq Tx kitinde yer alan tüm tehlikeli maddelerle ilgili daha ayrıntılı bilgi almak için lütfen <http://www.caredx.com> adresindeki TEC478_AlloSeq Tx Güvenlik Bilgi Formuna bakın.

2. Kütüphane Hazırlama (Early Pooling İş Akışı)

2.0 Protokole Giriş

- Belirtilen parametreleri kullanarak, aşağıdaki AlloSeq Tx protokolünü gösterilen sırayla izleyin.
- Devam etmeden önce kit bileşenlerini onaylayın ve gerekli sarf malzemeleri ile ekipmanlara sahip olduğunuzdan emin olun.
- Kullanım kolaylığı sağlamak adına, Kütüphane Hazırlama protokol adımları *IFU095-5_AlloSeq Tx Erken Havuzlama Çalışma Kitabı CE IVD* içinde de ayrıntılı olarak verilmektedir. Bölüm 2'deki çalışma kitabı referansları, bu çalışma kitabıyla ilişkilidir.

2.1 Örnek Hazırlama

1. Çalışma kitabına bir deney kimliği, açıklama, kullanıcı ve tarih girin.
2. Çalışma kitabındaki açılır menüden, deney için kullanılacak AlloSeq prob grubunu seçin.
3. Çalışma kitabındaki açılır menüden, kullanılacak dizileme cihazı türünü seçin. Dizileme tipi seçildiğinde, dizileme yönergeleri çalışma kitabında gösterilecektir.
4. İstenen yapılandırmaya göre, çalışma kitabındaki plaka düzeninin sarı renkli bölümüne, test edilecek örneklerin kimliğini girin.

NOT: Yalnızca alfasayısal karakterler girilebilir. Yinelenen örnek kimlikleri, kullanıcıdan düzeltme istemek üzere kırmızı renkli olarak işaretlenir. Bir çalışmada yalnızca benzersiz numune kimlikleri olması, dizileme yazılımında bir zorunluluktur. Bir örnek içermesi amaçlanmayan kuyucuklar için bilgi girmeyin.

5. Plaka Düzeni altında turuncu renkli açılır listeden istediğiniz indeks grubunu seçin.
6. Gerekirse ve tüplü indeks biçimi kullanılıyorsa, i7 indeks düzeni değiştirilebilir, gerekli sütun için açılır seçeneklerden, kullanılacak olan alternatif i7 indeksini seçin. Yinelenen i7 indeksleri seçilirse, kullanıcıdan düzeltme istemek üzere hücreler kırmızı renkli olarak işaretlenir.
7. Gerekirse ve tüplü indeks biçimi kullanılıyorsa, i5 indeks düzeni değiştirilebilir, gerekli satır için açılır seçeneklerden, kullanılacak olan alternatif i5 indeksini seçin. Yinelenen i5 indeksleri seçilirse, kullanıcıdan düzeltme istemek üzere hücreler kırmızı renkli olarak işaretlenir.
8. Yukarıdaki işlemlerin hepsi tamamlandıktan sonra, 1.2 SampleSheet sekmesine tıklayın ve inceleyin. Bilgi gereken yerleri işaretlemek üzere kırmızı renkli metin kullanılır. Kırmızı renkli metin yoksa, SampleSheet sekmesi CSV (Virgülle ayrılan) (*.csv) olarak kaydedilebilir. Dosyayı 'SampleSheet.csv' olarak kaydedin. csv biçiminde kaydetme yapıldığında yalnızca aktif sekme kaydedilir. Kaydedilen SampleSheet.csv dosyasını excel'de açın ve [Data] tablosunda boş satır varsa silin, yani 22 ila 117 arasındaki, örnek bilgileri içermeyen herhangi bir satırı silin. Bunu yaptıktan sonra dosyayı kaydedin. Ardından örnek sayfası, bir Illumina dizileme cihazında dizileme için içe aktarılmaya hazır olur.

2.2 Kütüphane Hazırlama

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Örnek Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Tagmentasyon Tamponu	-15°C ila -25°C KUTU 1	10	Oda sıcaklığına getirin.

Reaktif	Saklama Koşulları	Örnek Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Steril Su	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	30	Hazırlık gerekli değildir.
Tagmentasyon Boncukları	-15°C ila -25°C KUTU 1	10	En az 30 dk. boyunca oda sıcaklığına getirin.
Durdurma Tamponu	15°C ila 30°C KUTU 2	10	Hazırlık gerekli değildir.
Tagmentasyon Yıkama Tamponu	15°C ila 30°C KUTU 2	300	Hazırlık gerekli değildir.
PCR Mix (veya 96'lı kit için PCR Mix-1)	-15°C ila -25°C KUTU 4 (veya PCR Mix-1 için Kutu 1)	20	Çözdürün ve buz üzerinde tutun. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.
İndeksler: 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 ila -25°C KUTU 3	10 toplam	Çözdürün ve buz üzerinde tutun.

- Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
- Gerekli olan 96 Kuyucuklu Yarı Çevrili Plakayı, Microseal B'yi ve 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerini alın.

NOT: İndeksleme PCR'sine kadar güvenli durma noktası yoktur. İşlem yaklaşık **1:50** saat sürer (50 dk. PCR termal döngü dahil).

- Her bir DNA örneği için, 10-100 ng/µl örneğin 10 µl'lik kısmını bir PCR plakasının ilgili kuyucuğu içine, 1.0 Sample_Prep sayfasındaki plaka düzenine uygun şekilde alıktalayın.
- Örnek başına 40 µl Tagmentasyon Ana Karışımını; 10 µl Tagmentasyon Tamponu, 20 µl Steril Su ve 10 µl Tagmentasyon Boncukları kullanarak hazırlayın.
- Yukarıdaki ana karışımı, vorteksleyerek karıştırın ve ardından puls spin uygulayın.
- 40 µl Tagmentasyon Ana Karışımını, bir DNA örneği olan her bir kuyucuğun içine pipetleyin.
- Plakayı Microseal B filmle sızdırmaz şekilde kapatın.
- Kuyucuğun dibindeki tüm reaktifleri toplamak için, plakayı 10 saniye boyunca 100 x g değerinde santrifüjleyin.
- Plaka çalkalayıcı kullanarak 1 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın.
- Plakayı görsel olarak inceleyin:
 - Boncuklar kuyucuk içinde eşit dağıtılmamışsa, adım 10'daki çalkalama işlemini tekrarlayın.

b) Materyal kuyucuğun dibinde değilse veya Microseal B film üzerine sıçradıysa, puls spin uygulayın ve adım 10'daki çalkalama işlemini tekrarlayın.

12. Plakayı termal döngü cihazı içine koyun ve 105°C'ye ısıtılmış kapağı ve 50 µl reaksiyon hacmini kullanarak Tagmentasyon programını yürütün:

Sıcaklık	Süre
55°C	5 dakika
10°C	2 dakika

13. Program sona erdiğinde, plakayı termal döngü cihazından hemen çıkarın ve 2 dakika boyunca oda sıcaklığında bırakın.
14. Microseal B filmi çıkarın.
15. Her reaksiyon kuyucuğuna 10 µl Stop Buffer ekleyin.
16. Plakayı Microseal B filmle sızdırmaz şekilde yeniden kapatın.
17. Plaka çalkalayıcı kullanarak 1 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın.
18. Plakayı oda sıcaklığında ilaveten 5 dakika inkübe edin.
19. İnkübasyon esnasında PCR Karışımını ve İndeksleri çözdürmek üzere dondurucudan çıkarın ve ardından buz/soğuk rak üzerine koyun.
20. Plakayı görsel olarak inceleyin, materyal kuyucuğun dibinde değilse ya da Microseal B filmin üzerine sıçradıysa, plakaya puls spin uygulayın.
21. Aşağıda açıklandığı gibi, Tagmentasyon Yıkama Tamponu ile üç kez yıkayın.
- a) Microseal B'yi çıkarın ve plakayı Magnetic Stand-96 üzerine 30 dakika koyup, boncukların kuyucuklar içinde mıknaşın yanına toplanmasına izin verin,
- b) Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları kuyucuk içinde mıknaş boyunca bırakın,
- c) Her bir kuyucuğa 100 µl Tagmentasyon Yıkama Tamponunu yavaşça ekleyin,
- d) Plakayı yeni Microseal B filmle sızdırmaz şekilde yeniden kapatın, filmin düzgün iliştiirildiğinden emin olun,
- e) Plaka çalkalayıcı kullanarak oda sıcaklığında 2 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın,
- f) **DİKKAT:** Örnekler sızdırmazlık elemanı üzerine sıçradıysa, sızdırmazlık elemanını çıkarmadan önce 100 x g'de 10 sn santrifüjleyin,
- g) a) ile f) arası adımları toplam 3 yıkama için iki kere daha tekrarlayın.

NOT: Üçüncü yıkamanın üst fazını atmadan önce, PCR ana karışımını aşağıda açıklandığı gibi hazırlayın.

22. 40 µL PCR ana karışımını, 20 µl Steril Su ve 20 µl PCR Karışımı kullanarak hazırlayın. (veya 96'lı test kiti kullanıyorsanız PCR Mix-1).

NOT: PCR Karışımı, protokolde sonraki adımlar için kullanılır. Bu flakonu atmayın.

23. Microseal B'yi çıkarın ve plakayı Magnetic Stand-96 üzerine 30 dakika koyup, boncukların kuyucuklar içinde mıknaşın yanına toplanmasına izin verin.
24. 100 µl'ye ayarlanmış bir pipet kullanarak, üst fazı Tagmentasyon Yıkamasından aspire edin ve atın.
25. Plakayı manyetik standdan çıkarın.
26. Her bir kuyucuğua 40 µl PCR ana karışımı ekleyin.
27. Plakayı Microseal B filmle sızdırmaz şekilde kapatın.
28. Plaka çalkalayıcı kullanarak oda sıcaklığında 2 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın.
29. Tüm boncukların PCR ana karışımı içinde süspanse edilmesini sağlamak için, plakayı 100 x g'da 10 saniye santrifüjleyin.

İndeks tüpleri için (T),

30. (T) Tüm hacmin, tüpün dibinde olmasını sağlamak için, indeks tüplerini vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
31. (T) Örnek plakasından Microseal B filmi çıkarın.
32. (T) 1.0 Sample_Prep sayfasındaki plaka düzenine göre, her bir kuyucuğa 5 µl i7 indeks ekleyin.
33. (T) 1.0 Sample_Prep sayfasındaki plaka düzenine göre, her bir kuyucuğa 5 µl i5 indeks ekleyin.

Adım 34'e devam edin.

İndeks plakası için (P),

30. (P) Plaka çalkalayıcı kullanarak, indeks plakasını 1 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın.

31. (P) Tüm hacmin, kuyucuğun dibinde olmasını sağlamak için, indeks plakasını 10 saniye boyunca 100 x g değerinde santrifüjleyin.

32. (P) Örnek plakasından Microseal B filmi çıkarın.

33. (P) **Plakanın doğru yönünü ve doğru indeks grubunu onaylayın. Sızdırmazlık elemanını soyamayın.** İndeks plakasının sızdırmazlık elemanını bir uçla delin. Yeni bir uçla, 1.0 Sample_Prep sayfasındaki plaka düzenine göre, her bir örnek kuyusuna indeks plakasındaki birleştirilmiş indekslerin 10 µl'lik kısmını aktarın.

Adım 34'e devam edin.

34. yeni Microseal B filmle sızdırmaz şekilde kapatın.

35. Plaka çalkalayıcı kullanarak oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın.

36. Kuyucuğun dibindeki tüm reaktifleri toplamak için, plakayı 10 saniye boyunca 100 x g değerinde santrifüjleyin. Görsel olarak inceleyerek, boncukların çözelti içinde hala eşit şekilde dağıtıldığından emin olun. Boncuklar eşit şekilde dağıtılmamışsa, adım 35'teki çalkalama işlemini tekrarlayın.

37. Plakayı termal döngü cihazı içine koyun ve 105°C'ye ısıtılmış kapağı ve 50 µl reaksiyon hacmini kullanarak indekisleme PCR programını yürütün:

#	Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	Boşluk doldurma	72°C	3 dakika	1
2	İlk denatürasyon	98°C	3 dakika	1
3	Denatürasyon	98°C	20 saniye	9
4	Bağlanma	60°C	30 saniye	
5	Uzatma	72°C	3 dakika	
6	Son uzatma	72°C	3 dakika	1
7	Son bekletme	10°C	Bekletme	1

NOT: Güvenli durma noktası. Kütüphaneler -15°C ila -25°C'de 1 haftaya kadar saklanabilir.

NOT: Boyut seçimine ve saflaştırmaya hemen geçiliyorsa, kullanım öncesinde Saflaştırma Boncuklarının oda sıcaklığına getirildiğinden emin olun.

2.3 Boyut Seçimi ve Saflaştırma

1. Optimum verim ve boyut seçimi için, örnek, boncuk ve üst faz hacmi, çalışma boyutuna göre değiştirilir. Aşağıdaki tabloda, çalışma başına belirtilen örnek aralığı için test edilen hacimler özetlenmektedir.

Hesaplamalar için Reaktif Hacimleri	6 - 24 Örnek/Havuz	25 - 48 Örnek/Havuz	49 - 96 Örnek/Havuz
Havuzlanacak örnek sayısı (aralıklar için maks. listelenir)	24	48	96
Örnek başına havuzlanacak kütüphane hacmi (µl)	10	5	2.5
Örnek başına seyreltilen boncuk hacmi (µl)	50	25	12.5
Örnek başına üst faz aktarım hacmi (µl)	55	27.5	13.75
Örnek başına düzenli boncuk hacmi, adım 8 (µl)	4.4	2.2	1.1

2. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Örnek Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Purification Beads (96'lı test kiti için Purification Beads – 1)	2°C ila 8°C KUTU 5	24.7	En az 30 dk. boyunca oda sıcaklığına getirin. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.
Steril Su	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Değişken	Hazırlık gerekli değildir.
%100 Etanol	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	1920	Aşağıda açıklandığı gibi %80 etanol hazırlayın.
Yeniden Süspansiyon Tamponu	2°C ila 8°C KUTU 5	Değişken	Oda sıcaklığına getirin. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.

3. IFU095-5_AlloSeq Tx Erken Havuzlama Çalışma Kitabı CE IVD ile hesaplanan hacimler kullanarak, Saflaştırma Boncukları ve Steril Su ile seyreltilmiş Saflaştırma Boncukları hazırlayın. Kullanılmadan önce, Saflaştırma Boncuklarının iyice vortekslenmesini sağlayın.
4. 1920 µl %100 Etanol 480 µl Steril Su kullanarak, 2 yıkama için yeterli olacak şekilde, havuz başına 2400 µl taze %80 Etanol hazırlayın.

NOT: Deney başına havuz sayısı, çalışma kitabında adım 3'te sarı hücre içinde 1 değerine önceden ayarlanır. Bu, gerekirse manuel olarak geçersiz kılınabilir. Bu hücrede değişiklik yapıldığında, bu protokolün/çalışma kitabının sonraki adımları için havuz sayısı güncellenir. Bu deneyde, havuz başına aynı sayıda örnekle, 1'den fazla havuzlama gerçekleştirilirse, Saflaştırma Boncuklarının hacmi uygun şekilde artırılmalıdır (yani, iki havuz için iki katına çıkarılmalıdır) ver aşağıdaki talimatlar her havuz için bütünüyle uygulanmalıdır.

Farklı sayıda örnekle birden fazla havuz gerekiyorsa, çalışma kitabındaki bu sekme kopyalanmalı ve sarı renkli hücreler güncellenerek örnek sayısı yansıtılmalıdır, böylelikle, gerekli olan/aktarılan reaktif hacimleri doğru şekilde ayarlanır. Sekmeyi yinelemek için, sekmelerin herhangi birine sağ tıklayın ve 'Taşı ya da Kopyala' ögesini seçin, listeden '3.0 SS_Purification' ögesini seçin, 'Kopya Oluştur' kutusunu işaretleyin ve 'Tamam' ögesine tıklayın.

5. Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
6. 1,5 ml tüpler alın (**İsteğe bağlı:** Tercih edilirse 2 ml tüpler kullanılabilir, aşağıda adım 20a'da etanol yıkama 1200 µl iken 1500 µl'ye artırılır).

NOT: İşlem yaklaşık 1 saat sürer.

7. Seyreltilmiş Purification Beads'in uygun hacmini (yukarıdaki hesaplamalar tablosuna veya çalışma kitabına bakın) 1,5 ml tüp içine alıktalayın.
8. İndeksleme PCR'sinden Tagmentation Beads'i ve üst fazı pipetle karıştırın **veya** indeksleme PCR plakasını 1800 dev./dk.'da 1 dakika çalkalayın ve ardından her bir örnekten uygun hacmi (yukarıdaki hesaplamalar tablosuna veya çalışma kitabına bakın) seyreltilmiş Purification Beads içeren tüpe ekleyin.
9. Her bir tüpü, görsel incelemede örnek homojen görünene kadar 10 saniye boyunca yüksek hızda vorteksleyin.
10. 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin. Bu inkübasyon esnasında, boncuklara en büyük fragmanlar bağlanır.
11. Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
12. Tüpe 2,5 dakika boyunca mıknatıs üzerine koyun, boncukların mıknatısın yanında toplanmasına izin verin. Üst faz bulanık kalırsa, temizlenene kadar mıknatıs üzerinde kalır.

13. Üst fazdan uygun hacmi (yukarıdaki hesaplamalar tablosuna veya çalışma kitabına bakın) yeni bir tüpe **aktarın**.
14. Purification Beads'in (seyreltilmemiş) uygun hacmini (yukarıdaki hesaplamalar tablosuna veya çalışma kitabına bakın) üst fazı içeren tüpe ekleyin.
15. Her tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca vorteksleyin.
16. 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin. Bu inkübasyon esnasında, hedeflenen boyuttaki fragmanlar boncuklara bağlanır.
17. Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
18. Tüpü 2,5 dakika boyunca mıknatıs üzerine koyun, boncukların mıknatısın yanında toplanmasına izin verin. Üst faz bulanık kalırsa, temizlenene kadar mıknatıs üzerinde kalır.
19. Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde mıknatıs boyunca bırakın.
20. Tüpü mıknatıs üzerinde bırakarak, %80 etanol ile iki kez yıkayın:
 - a) Her tüpe 1200 µl %80 etanol ekleyin,
 - b) 30 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin,
 - c) Pipet kullanarak, tüm üst fazı aspire edin ve atın,
 - d) a) ile c) arası adımları toplam 2 yıkama için tekrarlayın.
21. Kalan üst fazın hepsini P20 pipetle giderin.
22. Kalan etanolün buharlaşmasını sağlamak için, tüpü oda sıcaklığında 5 dakika boyunca havayla kurutun.
23. Tüpü mıknatıstan çıkarın ve hedef fragmanları ayırtırmak için her tüpe 37 µl Resuspension Buffer Tamponu ekleyin.
24. Her tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca vorteksleyin.
25. 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
26. Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
27. Tüpü 30 saniye boyunca mıknatıs üzerine koyun, boncukların tüp içinde mıknatısın yanına toplanmasına izin verin.
28. 35 µl üst fazı, saklamak üzere yeni bir 1,5 ml tüpe **aktarın**. Bu havuz, Hibridizasyona kadar devam edebilir.

NOT: Güvenli durma noktası. Kütüphaneler -15°C ila -25°C'de 1 aya kadar saklanabilir.

2.4 Qubit Miktar Belirleme (İsteğe Bağlı)

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Qubit BR tamponu	-25°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	199	Hazırlık gerekli değildir.
Qubit BR boya	-25°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	1	Hazırlık gerekli değildir.
BR Standart 1	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	10	Oda sıcaklığına getirin.
BR Standart 2	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	10	Oda sıcaklığına getirin.

2. Gerekli Qubit tüplerini ve gerekli hacme göre 1,5 ml ya da 5 ml tüpü, çalışma çözeltisinin hazırlanması için alın.
3. Standartlar için iki ve her örnek için bir analiz tüpü hazırlayın.
4. Miktarı belirlenecek havuz/standart başına 1 µl Qubit boya ve 199 µl Qubit buffer kullanarak, 200 µl Qubit çalışma çözeltisini hazırlayın.
5. Çalışma çözeltisini 2-3 saniye vorteksleyin ve ardından puls spin uygulayın.
6. Çalışma çözeltisinin **190 µl**'lik kısmını her bir Standart tüpünün içine alıktalayın.
7. Çalışma çözeltisinin **198 µl**'lik kısmını havuz tüplerinin her birinin içine alıktalayın.
8. Standart çözeltisinin **10 µl**'lik kısmını ilgili her bir Standart tüpünün içine alıktalayın.
9. Her bir havuzun **2 µl**'lik kısmını ilgili tüpün içine alıktalayın.
10. Bütün tüpleri 2-3 saniye vorteksleyin ve ardından puls spin uygulayın.
11. Tüpleri oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.
12. Tüpleri Qubit Florometre içine koyun ve okumalar yapın (daha fazla bilgi almak için Qubit üreticisinin protokolüne bakın).
13. Havuz başına ortalamaı hesaplamak için, Qubit okumalarını çalışma kitabındaki tabloya kaydedin.

NOT: Beklenen kütüphane verimi yaklaşık 30-100 ng/µl'dir ancak DNA kalitesi ile girdisine göre farklılık gösterebilir. 10 ng/µl veya üstü verimin, makul zenginleştirme sonuçları vereceği beklenir.

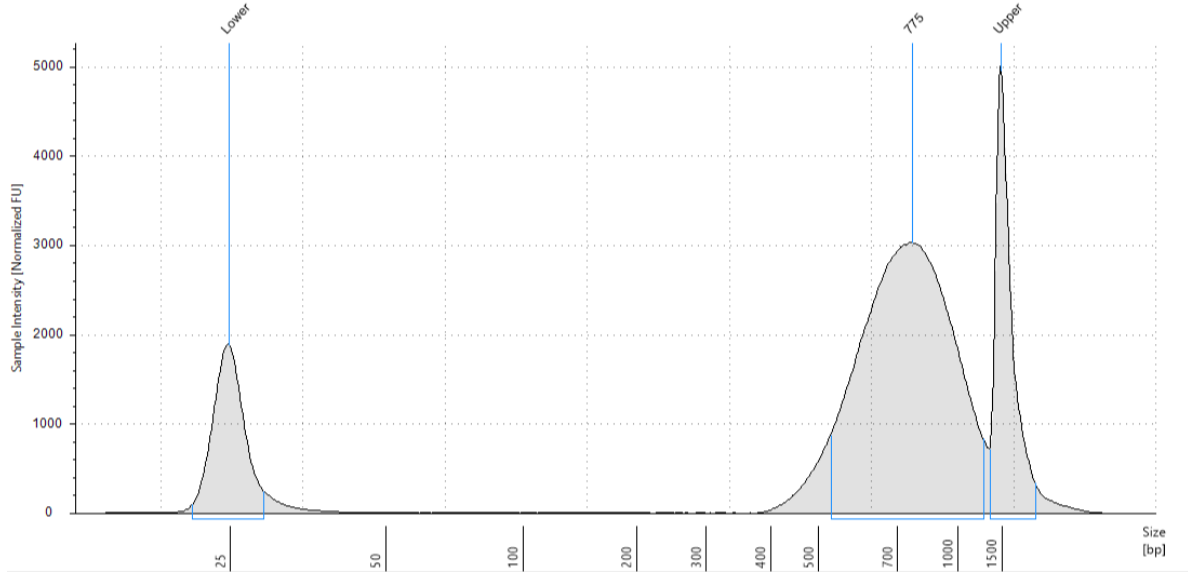
2.5 TapeStation Görselleştirme (İsteğe Bağlı)

NOT: Kullanıcı validasyonunun ardından, Fragment Analyzer (Fragman Analizörü), Biyoanalizör gibi, alternatif fragman görselleştirme sistemleri kullanılabilir.

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Örnek Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
D1000 Merdiven	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	1	Oda sıcaklığına getirin.
D1000 Örnek Tamponu	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	3	Oda sıcaklığına getirin.

2. Gerekli D1000 ScreenTape, TapeStation optik tüp striplerini ve kapakları alın.
3. Her bir örneğin 1 µl'lik kısmını yeni bir tüpe aktarın.
4. Bir referans tüp içine 1 µl D1000 Ladder ekleyin.
5. Her bir örnek tüpüne ve referans tüpe 3 µl D1000 örnek tamponu ekleyin.
6. Bütün tüpleri kapaklarla sızdırmaz şekilde kapatın.
7. 1 dakika boyunca 2000 dev./dk.'da IKA vorteks kullanarak bütün tüpleri iyice vorteksleyin.
8. Bütün örneklerin tüplerin dibinde olmasını sağlamak için, kısa süreli olarak santrifüjleyin.
9. Örnek tüplerinin kapağını çıkarın ve tüpleri 2200 TapeStation cihazı içine yükleyin.
10. 2200 TapeStation Controller Yazılımında gerekli tüpleri seçin ve örnekleri çalıştırın (daha fazla bilgi almak için TapeStation kullanım kılavuzuna bakın).
11. Çalışma tamamlandığında, sonuçları görüntülemek için TapeStation Analysis Yazılımını başlatın (daha fazla bilgi almak için TapeStation kullanım kılavuzuna bakın).
12. Sonuçları çalışma kitabına kaydedin.



Şekil 2.5.1: Kütüphaneler için TapeStation izinin temsili resmi.

3. Hibrit Yakalama (Early Pooling İş Akışı)

3.0 Protokole Giriş

- Belirtilen parametreleri kullanarak, aşağıdaki AlloSeq Tx protokolünü gösterilen sırayla izleyin.
- Devam etmeden önce kit bileşenlerini onaylayın ve gerekli sarf malzemeleri ile ekipmanlara sahip olduğunuzdan emin olun.
- Kullanım kolaylığı sağlamak açısından, Hibrit Yakalama protokol adımları *IFU095-5_AlloSeq Tx Erken Havuzlama Çalışma Kitabı CE IVD* içinde de ayrıntılı olarak verilmektedir. Bölüm 3'deki çalışma kitabı referansları, bu çalışma kitabıyla ilişkilidir.

3.1 Prob Hibridizasyonu

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
AlloSeq Tx Prob Paneli	-15°C ila -25°C KUTU 4	10	Oda sıcaklığına getirin.
Hibridizasyon Tamponu 1	-15°C ila -25°C KUTU 4	50	15 dakika boyunca 58°C'de Hybex içine koyun. Vorteksleyin ve görsel olarak inceleyin, çökelti kalırsa ilaveten 15 dakika boyunca 58°C'de inkübe edin.
Hibridizasyon Tamponu 2	2°C ila 8°C KUTU 5	10	Oda sıcaklığına getirin.

2. Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
3. Gerekli PCR tüplerini/striplerini ve kapakları alın.

NOT: Yakalama protokolünden sonrasına kadar güvenli durma noktası yoktur. Örnek havuzları, hibridizasyon termal döngü reaksiyonunun 62°C’de bekletme adımından, boncuk yakalama ve ısıtmalı yıkama adımlarına doğrudan devam etmelidir.

NOT: İşlemin ayarlanması yaklaşık 20 dakika sürer ve termal döngü cihazı içinde en az 1,5 saat, en fazla 18 saat geçirilir (gece boyunca ya da 18 saate kadar bırakılan reaksiyonlar, reaksiyonun son bekletme işleminde 62°C sıcaklıkta bekletilmelidir).

4. Her bir hibridizasyon reaksiyonu için, aşağıdaki reaktifleri, listelenen sırada, bir PCR tüpü/stribi içinde birleştirin.

Reaktif	Havuz Başına Hacim (µl)
Örnek Kütüphaneleri Havuzu	30
AlloSeq Tx Prob Paneli	10
Hibridizasyon Tamponu 1	50
Hibridizasyon Tamponu 2	10
Toplam	100

5. 70 µl’ye ayarlanmış bir pipetle, her bir hibridizasyon reaksiyon kuyucuğunu 10 kez pipetle karıştırın, kapatın ve ardından puls spin uygulayın.
6. Çözelti bulanık kalırsa, 6-8 kez daha pipetle karıştırın, kapatın ve ardından puls spin uygulayın
7. Tüpü/stribi termal döngü cihazı içine koyun ve **100°C**’ye ısıtılmış kapağı ve 100 µl reaksiyon hacmini kullanarak Hibridizasyon programını yürütün:

#	Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	Denatürasyon	98°C	5 dakika	1
2	Rampa Aşağı	98°C-62°C, 2°C/döngü azaltarak	1 dakika	1
3	2°C/döngü azaltarak, ilave 18 döngü için (toplam 19 döngü) adım 2’ye gidin.			
4	Hibridizasyon	62°C	60 dakika	1
5	Son Bekletme	62°C	Bekletin (adım 4 dahil, 62°C’de 18 saati aşmayın)	1

8. Yakalama ile devam etmeye hazır olana kadar, tüpü/stribi termal döngü cihazı içinde bırakın. Yakalama boncuklarının oda sıcaklığına ulaştığından ve Yakalama Yıkama Tamponu ile Hybex’in 58°C’ye ısıtıldığından emin olun.

3.2 Yakalama

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Yakalama Boncukları	2°C ila 8°C KUTU 5	250	En az 30 dk. boyunca oda sıcaklığına getirin.
Yakalama Yıkama Tamponu	-15°C ila -25°C KUTU 4	800	Kullanmadan önce 58°C'ye ısıtın.
Yakalama Elüsyon Tamponu 1	-15°C ila -25°C KUTU 4	28.5	Oda sıcaklığına getirin.
2N NaOH	-15°C ila -25°C KUTU 4	1.5	Oda sıcaklığına getirin. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.
Yakalama Elüsyon Tamponu 2	2°C ila 8°C KUTU 5	4	Oda sıcaklığına getirin.

2. Yakalanacak havuz başına aşağıdaki reaktiflerin elüsyon ana karışımını hazırlayın:

Reaktif	Havuz Başına Hacim (µl)
Yakalama Elüsyon Tamponu 1	28.5
2N NaOH (taze)	1.5

NOT: NaOH çözeltisi havadan CO₂'yi kolaylıkla emerek, reaktifin pH değerini ve performansını değiştirir. Kullanılmadığında 2N NaOH tüpünün sızdırmaz şekilde kapatıldığından emin olun.

- Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
- Gerekli olan 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerini, PCR tüplerini/striplerini ve kapakları alın.

NOT: Bu işlem yaklaşık 1 saat sürer.

- Her bir hibridizasyon reaksiyonu için, yeni bir 1,5 ml tüpe 250 µl Yakalama Boncuğu ekleyin.
- Her bir hibridizasyon reaksiyonunun 100 µl'lik kısmını, Yakalama Boncukları olan ilgili tüpe **aktarın**.
- Tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca vorteksleyin. Santrifüjlemeyin veya puls spin uygulamayın.
- Tüpü Hybex içinde 58°C'de 15 dakika inkübe edin.
- Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
- Tüpü 30 saniye boyunca mıknatıs üzerine hemen koyun, boncukların mıknatısın yanında toplanmasına izin verin.
- Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde mıknatıs boyunca bırakın.
- Aşağıda açıklandığı gibi, ısıtılmış Yakalama Yıkama Tamponu ile üç kez yıkayın.

NOT: Kullanılmadığında Capture Wash Buffer'ı 58°C sıcaklığı korumak için Hybex içinde tutun. Yalnızca, adım 12b ve 14'de reaksiyona eklemekten hemen önce Hybex'ten çıkarın. Isıtılmış yıkama adımlarını uygularken, örnek havuzunun/tamponunun oda sıcaklığındaki süresini en düşük düzeye indirmek için hızlı çalışın.

- Tüpü mıknatıstan çıkarın.
 - 200 µl ısıtılmış Yakalama Yıkama Tamponu (58°C) ekleyin,
 - Tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca vorteksleyin. Santrifüjlemeyin veya puls spin uygulamayın.
 - Tüpü Hybex içinde 58°C'de 5 dakika inkübe edin.
 - Puls spin uygulayın ve ardından tüpü 30 saniye boyunca mıknatıs üzerine hemen koyun, boncukların mıknatısın yanında toplanmasına izin verin.
 - Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde mıknatıs boyunca bırakın.
 - a) ile f) arası adımları toplam 3 yıkama için iki kere daha tekrarlayın.
- Tüpü mıknatıstan çıkarın.
 - 200 µl ısıtılmış Yakalama Yıkama Tamponu (58°C) ekleyin.
 - Tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca vorteksleyin. Santrifüjlemeyin veya puls spin uygulamayın.
 - Bütün içeriği (yıkama çözeltisi ve boncuklar) yeni 1,5 ml tüpe **aktarın**.

NOT: Bu aktarım adımı, aşağı akış performansını etkileyebilecek PCR inhibitörlerinin giderilmesi için kritik önemdedir.

17. Tüpü Hybex içinde 58°C'de 5 dakika inkübe edin.
18. Hemen puls spin uygulayın ve ardından tüpü 30 saniye boyunca mıknatıs üzerine koyun, boncukların mıknatısın yanında toplanmasına izin verin.
19. Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde mıknatıs boyunca bırakın.
20. Tüpe hızlıca puls spin uygulayın ve ardından tüpü 30 saniye boyunca mıknatıs üzerine hemen koyun, boncukların mıknatısın yanında toplanmasına izin verin.
21. P20 pipet kullanarak, kalan üst faz varsa aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde mıknatıs boyunca bırakın.
22. Yukarıda hazırlanan elüsyon ana karışımını vorteksleyin ve ardından reaksiyon tüpünü mıknatıstan çıkarın ve her tüpe 23 µl elüsyon ana karışımı ekleyin.
23. Tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca vorteksleyin.
24. 2 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
25. Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
26. Tüpü 30 saniye boyunca mıknatıs üzerine koyun, boncukların mıknatısın yanında toplanmasına izin verin.
27. 21 µl üst fazı, yeni bir PCR tüpüne/stribine **aktarın**.
28. 4 µl Yakalama Elüsyon Tamponu 2 ekleyin.
29. 6-8 kez pipetle karıştırın. Son hacim 25 µl'dir.

NOT: Güvenli durma noktası. Kütüphaneler -15°C ila -25°C'de 24 saate kadar saklanabilir.

3.3 Zenginleştirme Sonrası PCR

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
PCR Primerler	-15°C ila -25°C KUTU 4	5	Buz üzerinde çözündürün. Ters çevirerek karıştırın, ardından kısa süreli santrifüjleyin.
PCR Mix (veya 96'lı kit için PCR Mix-2)	-15°C ila -25°C KUTU 4	20	Oda sıcaklığında çözündürün ve ardından buz üzerine koyun.

2. Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
3. Adım 3.2 Yakalama'dan yakalama kütüphanelerini içeren, gerekli olan PCR tüplerini alın.

NOT: Bu işlemde, ayar yaklaşık 5 dakika sürer, termal döngü cihazında **1:40** saat geçirilir.

4. 5 µl PCR Primerlerini, PCR tüpündeki yakalanan kütüphanelere ekleyin.
5. Tüpe 20 µl PCR Karışımı ekleyin.
6. 10 kez pipetle karıştırın.
7. Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
8. Tüpü/stribi termal döngü cihazı içine koyun ve 105°C'ye ısıtılmış kapağı ve 50 µl reaksiyon hacmini kullanarak zenginleştirme sonrası PCR programını yürütün:

#	Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	Denatürasyon	98°C	30 saniye	1
2	Denatürasyon	98°C	1 dakika	17
3	Bağlanma	60°C	30 saniye	
4	Uzatma	72°C	3 dakika	
5	Son uzatma	72°C	5 dakika	1
6	Son bekletme	10°C	Bekletme	1

NOT: Güvenli durma noktası. Kütüphaneler -15°C ila -25°C'de 1 haftaya kadar saklanabilir.

NOT: Saflaştırmaya hemen geçiliyorsa, kullanım öncesinde Saflaştırma Boncuklarının oda sıcaklığına getirildiğinden emin olun.

3.4 Zenginleştirme Sonrası PCR Saflaştırma

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Saflaştırma Boncukları (96'lı kit için Purification Beads-2)	2°C ila 8°C KUTU 5	27	En az 30 dk. boyunca oda sıcaklığına getirin.
Steril Su	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	80	Hazırlık gerekli değildir.
%100 Etanol	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	320	Aşağıda açıklandığı gibi %80 etanol hazırlayın.
Yeniden Süspansiyon Tamponu	2°C ila 8°C KUTU 5	32	Oda sıcaklığına getirin. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.

- 480 µl %100 Etanol ve 120 µl Steril Su (fazla hacim dahildir) kullanarak yeni %80 etanol (havuz başına 2 yıkama) hazırlayın.
- Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
- Gerekli 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünü alın.

NOT: İşlem yaklaşık 30 dakika sürer.

- Her bir saflaştırma reaksiyonu için, yeni bir 1,5 ml tüpe, iyice vortekslenmiş Saflaştırma Boncuklarının 27 µl'lik kısmını ekleyin.
- Her bir zenginleştirme sonrası PCR reaksiyonunun 45 µl'lik kısmını, Purification Beads olan ilgili tüpe **aktarın**.
- Her tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca vorteksleyin.
- Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
- 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
- Tüpü 30 saniye boyunca mıknatıs üzerine koyun, boncukların mıknatısın yanında toplanmasına izin verin.
- Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde mıknatıs boyunca bırakın.
- Tüpü mıknatıs üzerinde bırakarak, %80 etanol ile iki kez yıkayın:
 - Her tüpe 200 µl %80 etanol ekleyin,
 - 30 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin,
 - Pipet kullanarak, tüm üst fazı aspire edin ve atın,
 - a) ile c) arası adımları toplam 2 yıkama için tekrarlayın.
- Kalan üst fazın hepsini P20 pipetle giderin.
- Kalan etanolün buharlaşmasını sağlamak için, tüpü oda sıcaklığında 5 dakika boyunca havayla kurutun.
- Tüpü mıknatıstan çıkarın ve hedef fragmanları ayırtırmak için her tüpe 32 µl Yeniden Süspansiyon Tamponu ekleyin.
- Her tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca vorteksleyin.
- 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
- Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.

19. Tüpü 30 saniye boyunca mıknatıs üzerine koyun, boncukların tüp içinde mıknatısın yanına toplanmasına izin verin.
20. 30 µl üst fazı, saklamak üzere yeni bir 1,5 ml tüpe **aktarın**.

NOT: Güvenli durma noktası. Kütüphaneler -15°C ila -25°C'de 1 aya kadar saklanabilir.

3.5 Qubit Miktar Belirleme

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Qubit BR tamponu	-25°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	199	Hazırlık gerekli değildir.
Qubit BR boya	-25°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	1	Hazırlık gerekli değildir.
BR Standart 1	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	10	Oda sıcaklığına getirin.
BR Standart 2	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	10	Oda sıcaklığına getirin.

2. Gerekli Qubit tüplerini ve gerekli hacme göre 1,5 ml ya da 5 ml tüpü, çalışma çözeltisinin hazırlanması için alın.
3. Standartlar için iki ve her örnek için bir analiz tüpü hazırlayın.
4. Miktarı belirlenecek havuz/standart başına 1 µl Qubit boya ve 199 µl Qubit buffer kullanarak, 200 µl Qubit çalışma çözeltisini hazırlayın.
5. Çalışma çözeltisini 2-3 saniye vorteksleyin ve ardından puls spin uygulayın.
6. Çalışma çözeltisinin **190 µl**'lik kısmını her bir Standart tüpünün içine alıktalayın.
7. Çalışma çözeltisinin **198 µl**'lik kısmını Havuz tüplerinin her birinin içine alıktalayın.
8. Standart çözeltisinin **10 µl**'lik kısmını ilgili her bir Standart tüpünün içine alıktalayın.
9. Her bir havuzun **2 µl**'lik kısmını ilgili tüpün içine alıktalayın.
10. Bütün tüpleri 2-3 saniye vorteksleyin ve ardından puls spin uygulayın.
11. Tüpleri oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.
12. Tüpleri Qubit Florometre içine koyun ve okumalar yapın (daha fazla bilgi almak için Qubit üreticisinin protokolüne bakın).
13. Ortalama konsantrasyonu hesaplamak için, Qubit okumalarını çalışma kitabındaki tabloya kaydedin.

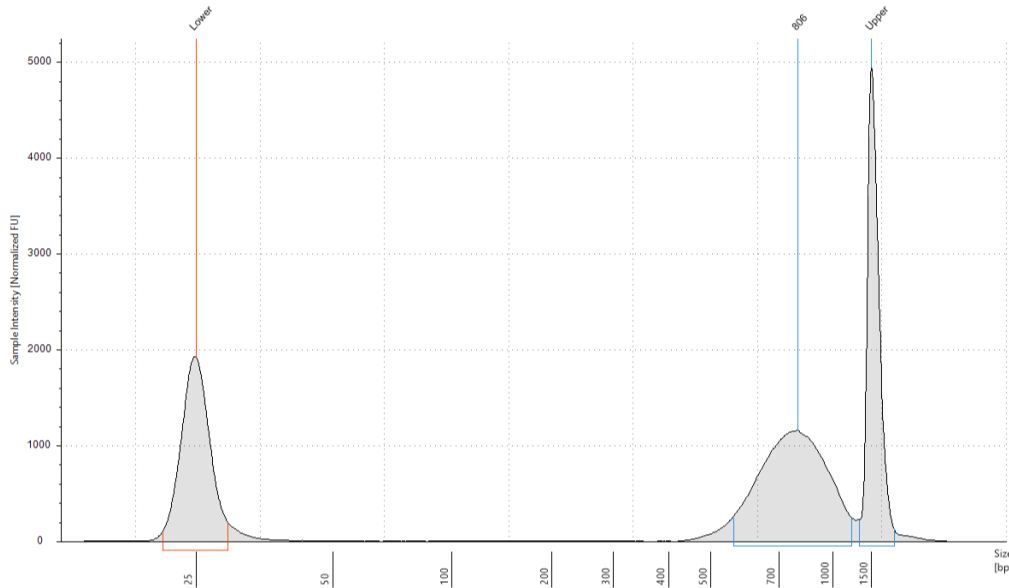
3.6 TapeStation Görselleştirme (İsteğe Bağlı)

NOT: Kullanıcı validasyonunun ardından, Fragment Analyzer (Fragman Analizörü), Biyoanalizör gibi, alternatif fragman görselleştirme sistemleri kullanılabilir.

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
D1000 Merdiven	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	1	Oda sıcaklığına getirin.
D1000 Örnek Tamponu	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	3	Oda sıcaklığına getirin.

2. Gerekli D1000 ScreenTape, TapeStation optik tüp striplerini ve kapakları alın.
3. Her bir havuzun 1 µl'lik kısmını yeni bir tüpe aktarın.
4. Bir referans tüp içine 1 µl D1000 Ladder ekleyin.
5. Her bir örnek havuzuna ve referans tüpe 3 µl D1000 sample buffer ekleyin.
6. Bütün tüpleri kapaklarla sızdırmaz şekilde kapatın.
7. 1 dakika boyunca 2000 dev./dk.'da IKA plaka vorteksleyici kullanarak bütün tüpleri iyice vorteksleyin.
8. Bütün örneklerin tüplerin dibinde olmasını sağlamak için, kısa süreli olarak santrifüjleyin.
9. Örnek tüplerinin kapağını çıkarın ve tüpleri 2200 TapeStation cihazı içine yükleyin.
10. 2200 TapeStation Controller Yazılımında gerekli tüpleri seçin ve örnekleri çalıştırın (daha fazla bilgi almak için TapeStation kullanım kılavuzuna bakın).
11. Çalışma tamamlandığında, sonuçları görüntülemek için TapeStation Analysis Yazılımını başlatın (daha fazla bilgi almak için TapeStation kullanım kılavuzuna bakın).
12. Sonuçları çalışma kitabındaki tabloya kaydedin.



Şekil 3.6.1: Son zenginleştirilmiş kütüphane havuzu için TapeStation izinin temsili resmi.

4. Kütüphane Hazırlama (Asıl iş akışı)

4.0 Protokole Giriş

- Belirtilen parametreleri kullanarak, aşağıdaki AlloSeq Tx protokolünü gösterilen sırayla izleyin.
- Devam etmeden önce kit bileşenlerini onaylayın ve gerekli sarf malzemeleri ile ekipmanlara sahip olduğunuzdan emin olun.
- Kullanım kolaylığı sağlamak açısından, Kütüphane Hazırlama protokol adımları *IFU095-1_AlloSeq Tx Kütüphane Hazırlama Çalışma Kitabı CE IVD* içinde de ayrıntılı olarak verilmektedir. Bölüm 4'deki çalışma kitabı referansları, bu çalışma kitabıyla ilişkilidir.

4.1 Örnek Hazırlama

1. Çalışma kitabına bir deney kimliği, açıklama, kullanıcı ve tarih girin.
2. Çalışma kitabındaki açılır menüden, deney için kullanılacak AlloSeq prob grubunu seçin.
3. Çalışma kitabındaki açılır menüden, kullanılacak dizileme cihazı türünü seçin.
4. İstenen yapılandırmaya göre, çalışma kitabındaki plaka düzeninin sarı renkli bölümüne, test edilecek örneklerin kimliğini girin.

NOT: Yalnızca alfasayısal karakterler girilebilir. Yinelenen örnek kimlikleri, kullanıcıdan düzeltme istemek üzere kırmızı renkli olarak işaretlenir. Bir çalışmada yalnızca benzersiz numune kimlikleri olması, dizileme yazılımında bir zorunluluktur. Bir örnek içermesi amaçlanmayan kuyucuklar için bilgi girmeyin.

5. Çalışma kitabında, Plaka Düzeni altında turuncu renkli açılır listeden istediğiniz indeks grubunu seçin.
6. Gerekirse ve tüplü indeks biçimi kullanılıyorsa, i7 indeks düzeni değiştirilebilir, gerekli sütun için açılır seçeneklerden, kullanılacak olan alternatif i7 indeksini seçin. Yinelenen i7 indeksleri seçilirse, kullanıcıdan düzeltme istemek üzere hücreler kırmızı renkli olarak işaretlenir.
7. Gerekirse ve tüplü indeks biçimi kullanılıyorsa, i5 indeks düzeni değiştirilebilir, gerekli satır için açılır seçeneklerden, kullanılacak olan alternatif i5 indeksini seçin. Yinelenen i5 indeksleri seçilirse, kullanıcıdan düzeltme istemek üzere hücreler kırmızı renkli olarak işaretlenir.
8. Yukarıdaki işlemlerin hepsi tamamlandıktan sonra, 1.2 SampleSheet sekmesine tıklayın ve inceleyin. Bilgi gereken yerleri işaretlemek üzere kırmızı renkli metin kullanılır. Kırmızı renkli metin yoksa, SampleSheet sekmesi CSV (Virgülle ayrılan) (*.csv) olarak kaydedilebilir. Dosyayı 'SampleSheet.csv' olarak kaydedin. csv biçiminde kaydetme yapıldığında yalnızca aktif sekme kaydedilir. Kaydedilen SampleSheet.csv dosyasını excel'de açın ve [Data] tablosunda boş satır varsa silin, yani 22 ila 117 arasındaki, örnek bilgileri içermeyen herhangi bir satırı silin. Bunu yaptıktan sonra dosyayı kaydedin. Ardından örnek sayfası, bir Illumina dizileme cihazında dizileme için içe aktarılmaya hazır olur.

4.2 Kütüphane Hazırlama

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Örnek Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Tagmentasyon Tamponu	-15°C ila -25°C KUTU 1	10	Oda sıcaklığına getirin.
Steril Su	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	30	Hazırlık gerekli değildir.
Tagmentasyon Boncukları	-15°C ila -25°C KUTU 1	10	En az 30 dk. boyunca oda sıcaklığına getirin.
Durdurma Tamponu	15°C ila 30°C KUTU 2	10	Hazırlık gerekli değildir.
Tagmentasyon Yıkama Tamponu	15°C ila 30°C KUTU 2	300	Hazırlık gerekli değildir.

Reaktif	Saklama Koşulları	Örnek Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
PCR Mix (veya 96'lı kit için PCR Mix-1)	-15°C ila -25°C BOX 4 (veya 96'lı kit için BOX 1)	20	Çözdürün ve buz üzerinde tutun. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.
İndeksler: 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 ila -25°C KUTU 3	10 toplam	Çözdürün ve buz üzerinde tutun.

- Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
- Gerekli olan 96 Kuyucuklu Yarı Çevrili Plakayı, Microseal B'yi ve 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerini alın.

NOT: İndeksleme PCR'sine kadar güvenli durma noktası yoktur. İşlem yaklaşık **1:50** saat sürer (50 dk. PCR termal döngü dahil).

- Her bir DNA örneği için, 10-100 ng/µl örneğin 10 µl'lik kısmını bir PCR plakasının ilgili kuyucuğu içine, 1.0 Sample_Prep sayfasındaki plaka düzenine uygun şekilde alıktalayın.
- Örnek başına 40 µl Tagmentasyon Ana Karışımını; 10 µl Tagmentasyon Tamponu, 20 µl Steril Su ve 10 µl Tagmentasyon Boncukları kullanarak hazırlayın.
- Yukarıdaki ana karışımı, vorteksleyerek karıştırın ve ardından puls spin uygulayın.
- 40 µl Tagmentasyon Ana Karışımını, bir DNA örneği olan her bir kuyucuğun içine pipetleyin.
- Plakayı Microseal B filmle sızdırmaz şekilde kapatın.
- Kuyucuğun dibindeki tüm reaktifleri toplamak için, plakayı 10 saniye boyunca 100 x g değerinde santrifüjleyin.
- Plaka çalkalayıcı kullanarak 1 dakika boyunca 1600 dev./dk. değerinde karıştırın.
- Plakayı görsel olarak inceleyin:
 - Boncuklar kuyucuk içinde eşit dağıtılmamışsa, adım 10'daki çalkalama işlemini tekrarlayın.
 - Materyal kuyucuğun dibinde değilse veya Microseal B film üzerine sıçradıysa, puls spin uygulayın ve adım 10'daki çalkalama işlemini tekrarlayın.
- Plakayı termal döngü cihazı içine koyun ve 105°C'ye ısıtılmış kapağı ve 50 µl reaksiyon hacmini kullanarak Tagmentasyon programını yürütün:

Sıcaklık	Süre
55°C	5 dakika
10°C	2 dakika

- Program sona erdiğinde, plakayı termal döngü cihazından hemen çıkarın ve 2 dakika boyunca oda sıcaklığında bırakın.
- Microseal B filmi çıkarın.
- Her reaksiyon kuyucuğuna 10 µl Stop Buffer ekleyin.
- Plakayı Microseal B filmle sızdırmaz şekilde yeniden kapatın.

17. Plaka çalkalayıcı kullanarak 1 dakika boyunca 1600 dev./dk. değerinde karıştırın.
18. Plakayı oda sıcaklığında ilaveten 5 dakika inkübe edin.
19. İnkübasyon esnasında PCR Karışımını ve İndeksleri çözündürmek üzere dondurucudan çıkarın ve ardından buz/soğuk rak üzerine koyun.
20. Plakayı görsel olarak inceleyin, materyal kuyucuğun dibinde değilse ya da Microseal B filmin üzerine sıçradıysa, plakaya puls spin uygulayın.
21. Aşağıda açıklandığı gibi, Tagmentasyon Yıkama Tamponu ile üç kez yıkayın.
 - a) Microseal B'yi çıkarın ve plakayı Magnetic Stand-96 üzerine 1 dakika koyup, boncukların kuyucuklar içinde mıknaş boyunca toplanmasına izin verin,
 - b) Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları kuyucuk içinde mıknaş boyunca bırakın,
 - c) Her bir kuyucuğa 100 µl Tagmentasyon Yıkama Tamponunu yavaşça ekleyin,
 - d) Plakayı yeni Microseal B filmle sızdırmaz şekilde yeniden kapatın, filmin düzgün iliştiirildiğinden emin olun,
 - e) Plaka çalkalayıcı kullanarak oda sıcaklığında 2 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın,
 - f) **DİKKAT:** Örnekler sızdırmazlık elemanı üzerine sıçradıysa, sızdırmazlık elemanını çıkarmadan önce 100 x g'de 10 saniye santrifüjleyin,
 - g) a) ile f) arası adımları toplam 3 yıkama için iki kere daha tekrarlayın.

NOT: Üçüncü yıkamanın üst fazını atmadan önce, PCR ana karışımını aşağıda açıklandığı gibi hazırlayın.

22. 40 µL PCR ana karışımını, 20 µl Steril Su ve 20 µl PCR Mix (veya 96'lı test kiti kullanıyorsanız PCR Mix-1) kullanarak hazırlayın.

NOT: PCR Karışımı, protokolde sonraki adımlar için kullanılır. Bu flakonu atmayın.

23. Microseal B'yi çıkarın ve plakayı Magnetic Stand-96 üzerine 1 dakika koyup, boncukların kuyucuklar içinde mıknaş boyunca toplanmasına izin verin.
24. 100 µl'ye ayarlanmış bir pipet kullanarak, üst fazı Tagmentasyon Yıkamasından aspire edin ve atın.
25. Plakayı manyetik standdan çıkarın.
26. Her bir kuyucuğua 40 µl PCR ana karışımı ekleyin.
27. Plakayı Microseal B filmle sızdırmaz şekilde kapatın.
28. Plaka çalkalayıcı kullanarak oda sıcaklığında 2 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın.
29. Tüm boncukların PCR ana karışımı içinde süspanse edilmesini sağlamak için, plakayı 100 x g'da 10 saniye santrifüjleyin.

İndeks tüpleri için (T),

30. (T) Tüm hacmin, tüpün dibinde olmasını sağlamak için, indeks tüplerini vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
31. (T) Örnek plakasından Microseal B filmi çıkarın.
32. (T) 1.0 Sample_Prep sayfasındaki plaka düzenine göre, her bir kuyucuğa 5 µl i7 indeks ekleyin.
33. (T) 1.0 Sample_Prep sayfasındaki plaka düzenine göre, her bir kuyucuğa 5 µl i5 indeks ekleyin.

Adım 34'e devam edin.

İndeks plakası için (P),

30. (P) Plaka çalkalayıcı kullanarak, indeks plakasını 1 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın.
31. (P) Tüm hacmin, kuyucuğun dibinde olmasını sağlamak için, indeks plakasını 10 saniye boyunca 100 x g değerinde santrifüjleyin.
32. (P) Örnek plakasından Microseal B filmi çıkarın.
33. (P) **Plakanın doğru yönünü ve doğru indeks grubunu onaylayın. Sızdırmazlık elemanını soymayın.** İndeks plakasının sızdırmazlık elemanını bir uçla delin. Yeni bir uçla, 1.0 Sample_Prep sayfasındaki plaka düzenine göre, her bir örnek kuyusuna indeks plakasındaki birleştirilmiş indekslerin 10 µl'lik kısmını aktarın.

Adım 34'e devam edin.

34. yeni Microseal B filmle sızdırmaz şekilde kapatın.
35. Plaka çalkalayıcı kullanarak oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın.
36. Kuyucuğun dibindeki tüm reaktifleri toplamak için, plakayı 10 saniye boyunca 100 x g değerinde santrifüjleyin. Görsel olarak inceleyerek, boncukların çözelti içinde hala eşit şekilde dağıtıldığından emin olun. Boncuklar eşit şekilde dağıtılmamışsa, adım 35'teki çalkalama işlemini tekrarlayın.
37. Plakayı termal döngü cihazı içine koyun ve 105°C'ye ısıtılmış kapağı ve 50 µl reaksiyon hacmini kullanarak indeksleme PCR programını yürütün:

#	Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	Boşluk doldurma	72°C	3 dakika	1
2	İlk denatürasyon	98°C	3 dakika	1
3	Denatürasyon	98°C	20 saniye	9
4	Bağlanma	60°C	30 saniye	
5	Uzatma	72°C	3 dakika	
6	Son uzatma	72°C	3 dakika	1
7	Son bekletme	10°C	Bekletme	1

NOT: Güvenli durma noktası. Kütüphaneler -15°C ila -25°C'de 1 haftaya kadar saklanabilir.

NOT: Boyut seçimine ve saflaştırmaya hemen geçiliyorsa, kullanım öncesinde Saflaştırma Boncuklarının oda sıcaklığına getirildiğinden emin olun.

4.3 Boyut Seçimi ve Saflaştırma

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Örnek Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Purification Beads (96'lı test kiti için Purification Beads – 1)	2°C ila 8°C KUTU 5	110.8	En az 30 dk. boyunca oda sıcaklığına getirin. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.
Steril Su	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	215	Hazırlık gerekli değildir.
%100 Etanol	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	320	Aşağıda açıklandığı gibi %80 etanol hazırlayın.
Yeniden Süspansiyon Tamponu	2°C ila 8°C KUTU 5	17	Oda sıcaklığına getirin. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.

2. Seyreltilmiş Saflaştırma Boncuklarını, örnek başına 90 µl Saflaştırma Boncukları ve 135 µl Steril Su kullanarak hazırlayın. Kullanılmadan önce, Saflaştırma Boncuklarının iyice vortekslenmesini sağlayın.
3. 480 µl %100 Etanol 120 µl Steril Su kullanarak, 2 yıkama için yeterli olacak şekilde örnek başına 600 µl yeni %80 Etanol hazırlayın (fazla hacim dahildir).
4. Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
5. Gerekli MIDI plakasını, Microseal B'yi ve PCR plakalarını alın.

NOT: İşlem yaklaşık 1 saat sürer.

6. Seyreltilmiş Saflaştırma Boncuklarının 225 µl'lik kısmını bir MIDI plakasının ilgili kuyucukları içine, alikotlayın (1.0 Sample_Prep sayfasındaki plaka düzenine uygun şekilde).
7. İndeksleme PCR'sinden Tagmentation Beads'i ve üst fazı pipetle karıştırın **veya** indeksleme PCR plakasını 1800 dev./dk.'da 1 dakika çalkalayın ve ardından her bir karışımın 45 µl'lik kısmını, seyreltilmiş Purification Beads içeren ilgili MIDI plakası kuyucuğuna ekleyin.
8. MIDI plakasını Microseal B filmle sızdırmaz şekilde kapatın.
9. Plaka çalkalayıcı kullanarak 2 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın.
10. Plakayı oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin. Bu inkübasyon esnasında, boncuklara en büyük fragmanlar bağlanır.
11. Plakayı 1 dakika boyunca 280 x g'da santrifüjleyin.
12. Microseal B'yi çıkarın ve plakayı Magnetic Stand-96 üzerine 5 dakika koyup, boncukların kuyucuklar içinde mıknatıs boyunca toplanmasına izin verin.
13. **260 µl üst fazı yeni MIDI plakasına veya aynı plakadaki temiz kuyucuklara aktarın.**
14. İyice vortekslenmiş Purification Beads'in (seyreltilmemiş) 20,8 µl lik kısmını her bir örneğe ekleyin. Microseal B filmle sızdırmaz şekilde kapatın.
15. Plaka çalkalayıcı kullanarak 1 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın.
16. Plakayı oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin. Bu inkübasyon esnasında, hedeflenen boyuttaki fragmanlar boncuklara bağlanır.
17. Microseal B'yi çıkarın ve plakayı Magnetic Stand-96 üzerine 5 dakika koyup, boncukların kuyucuklar içinde mıknatıs boyunca toplanmasına izin verin.
18. Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları kuyucuk içinde mıknatıs boyunca bırakın,
19. Plakayı mıknatıs üzerinde bırakarak, %80 etanol ile iki kez yıkayın:
 - a) Her örneğe 200 µl %80 etanol ekleyin,
 - b) 30 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin,
 - c) Pipet kullanarak, tüm üst fazı aspire edin ve atın,
 - d) a) ile c) arası adımları toplam 2 yıkama için tekrarlayın.
20. Kalan üst fazın hepsini P20 pipetle giderin.
21. Kalan etanolün buharlaşmasını sağlamak için, plakayı oda sıcaklığında 5 dakika boyunca havayla kurutun.
22. Hedef fragmanları elde etmek için, her kuyucuğa 17 µl Yeniden Süspansiyon Tamponu ekleyin.
23. Microseal B filmle sızdırmaz şekilde kapatın.
24. Plaka çalkalayıcı kullanarak 2 dakika boyunca 1800 dev./dk. değerinde karıştırın.
25. Plakayı oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin.
26. Plakayı 30 saniye boyunca 280 x g değerinde santrifüjleyin.
27. Microseal B'yi çıkarın ve plakayı Magnetic Stand-96 üzerine 5 dakika koyup, boncukların kuyucuklar içinde mıknatıs boyunca toplanmasına izin verin.
28. 15 µl üst fazı, saklamak üzere yeni bir PCR plakasına **aktarın**.

NOT: Güvenli durma noktası. Kütüphaneler -15°C ila -25°C'de 1 aya kadar saklanabilir.

4.4 Qubit Miktar Belirleme (İsteğe Bağlı)

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Örnek Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Qubit BR tamponu	-25°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	199	Hazırlık gerekli değildir.
Qubit BR boya	-25°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	1	Hazırlık gerekli değildir.
BR Standart 1	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	10	Oda sıcaklığına getirin.
BR Standart 2	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	10	Oda sıcaklığına getirin.

- Gerekli Qubit tüplerini ve gerekli hacme göre 1,5 ml ya da 5 ml tüpü, çalışma çözeltisinin hazırlanması için alın.
- Standartlar için iki ve her bir örnek için bir analiz tüpünü ayarlayın.
- Miktarı belirlenecek örnek/standart başına 1 µl Qubit boya ve 199 µl Qubit tampon kullanarak, 200 µl Qubit çalışma çözeltisini hazırlayın.
- Çalışma çözeltisini 2-3 saniye vorteksleyin ve ardından puls spin uygulayın.
- Çalışma çözeltisinin **190 µl**'lik kısmını her bir Standart tüpünün içine alıktalayın.
- Çalışma çözeltisinin **198 µl**'lik kısmını her bir Örnek tüpünün içine alıktalayın.
- Standart çözeltisinin **10 µl**'lik kısmını ilgili her bir Standart tüpünün içine alıktalayın.
- Her bir örneğin **2 µl**'lik kısmını ilgili tüpün içine alıktalayın.
- Bütün tüpleri 2-3 saniye vorteksleyin ve ardından puls spin uygulayın.
- Tüpleri oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.
- Tüpleri Qubit Florometre içine koyun ve okumalar yapın (daha fazla bilgi almak için Qubit protokolüne bakın).
- Örnek başına ortalamayı hesaplamak için, Qubit okumalarını çalışma kitabındaki tabloya kaydedin.

NOT: Beklenen kütüphane verimi yaklaşık 30 ng/µl'dir ancak DNA kalitesi ile girdisine göre farklılık gösterebilir. 10 ng/µl veya üstü verimin, makul zenginleştirme sonuçları vereceği beklenir.

4.5 TapeStation Görselleştirme (İsteğe Bağlı)

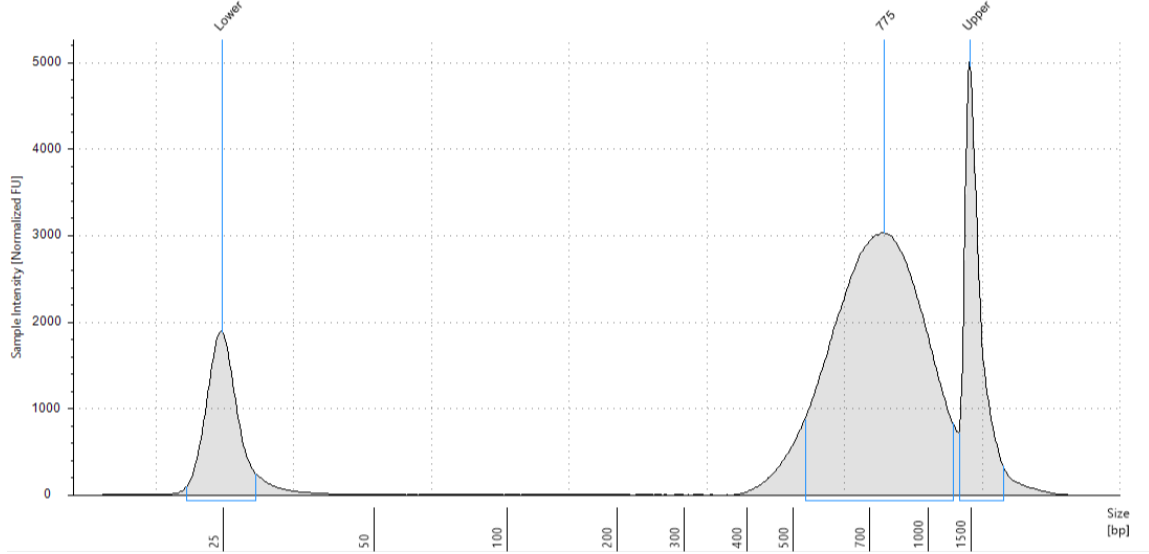
NOT: Kullanıcı validasyonunun ardından, Fragment Analyzer (Fragman Analizörü), Biyoanalizör gibi, alternatif fragman görselleştirme sistemleri kullanılabilir.

- Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Örnek Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
D1000 Merdiven	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	1	Oda sıcaklığına getirin.
D1000 Örnek Tamponu	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	3	Oda sıcaklığına getirin.

- Gerekli olan D1000 ScreenTape, 96 kuyucuklu Örnek Plakasını (ince duvarlı) veya Folyodaki sızdırmazlık elemanını alın.
- Her örneğin 1 µl'lik kısmını, 96 kuyucuklu yeni bir PCR plakasına aktarın.
- Bir referans kuyucuk içine 1 µl D1000 Ladder ekleyin.
- Her bir örnek kuyucuğuna ve referans kuyucuğa 3 µl D1000 örnek tamponu ekleyin.
- Plakayı folyo sızdırmazlık elemanı ile kapatın.
- İKA plaka vorteksleyici kullanarak 2000 dev./dk. değerinde 1 dakika boyunca vorteksleyin.

8. Bütün örneklerin kuyucukların dibinde olmasını sağlamak için, kısa süreli olarak santrifüjleyin.
9. Örnek plakasını 2200 TapeStation cihazı içine yükleyin.
10. 2200 TapeStation Controller Yazılımında gerekli kuyucukları seçin ve örnekleri çalıştırın (daha fazla bilgi almak için TapeStation kullanım kılavuzuna bakın).
11. Çalışma tamamlandığında, sonuçları görüntülemek için TapeStation Analysis Yazılımını başlatın (daha fazla bilgi almak için TapeStation kullanım kılavuzuna bakın).
12. Sonuçları çalışma kitabına kaydedin.



Şekil 4.5.1: Kütüphaneler için TapeStation izinin temsili resmi.

5. Hibrit Yakalama (Asıl iş akışı)

5.0 Protokole Giriş

- Belirtilen parametreleri kullanarak, aşağıdaki AlloSeq Tx protokolünü gösterilen sırayla izleyin.
- Devam etmeden önce kit bileşenlerini onaylayın ve gerekli sarf malzemeleri ile ekipmanlara sahip olduğunuzdan emin olun.
- Kullanım kolaylığı sağlamak açısından, Hibrit Yakalama protokol adımları *IFU095-2_AlloSeq Tx Hibrit Yakalama Çalışma Kitabı CE IVD* içinde de ayrıntılı olarak verilmektedir. Bölüm 5'deki çalışma kitabı referansları, bu çalışma kitabıyla ilişkilidir.

5.1 Örnek Havuzlama

1. Çalışma kitabında ilgili sarı renkli alana bir deney kimliği girin.
2. Çalışma kitabında ilgili sarı renkli alana, işlenecek havuz sayısını girin.
3. *IFU095-1_AlloSeq Tx Kütüphane Hazırlama Çalışma Kitabı CE IVD* içinde 1.1 Doğrusal Görünüm sekmesinden ilgili örnek bilgilerini kopyalayın ve "Değerler ve Numara Biçimi" özel yapıştırma seçeneğini kullanarak *IFU095-2_AlloSeq Tx Hibrit Yakalama Çalışma Kitabı CE IVD* içindeki Kütüphane Havuz Listesi içine yapıştırın.
4. 12 adet veya daha az örnek havuzlanıyorsa, zenginleştirilecek her kütüphanenin 2,5 µl'lik kısmını bir PCR tüpüne/stribine ekleyin ve aşağıdaki tabloya göre, uygun hacimde Resuspension Buffer ekleyerek toplam 30 µl elde edin.
5. 12 adetten fazla örnek havuzlanıyorsa, zenginleştirilecek her bir kütüphanenin 2,5 µl'lik kısmını 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne ekleyin ve konsantrasyon adımına geçin (*IFU095-2_AlloSeq Tx Hibrit Yakalama Çalışma Kitabı CE IVD*, 1.1).
6. Birden fazla havuz işleme alınıyorsa, bu sekmeyi kopyalayın ve her havuzu benzersiz şekilde tanımlayarak yukarıdaki adım 1-5'i tekrar edin.

NOT: Bukkal hücre DNA hazırlıklarından olanlar da dahil olmak üzere daha düşük verimli kütüphaneler, daha yüksek kütüphane girdi hacmi (30 µl birleşik toplam kütüphane girdi hacmini aşmayacak şekilde) kullanılmasından fayda görebilir. Mümkün olduğunda, düşük verimli (bukkal) kütüphanelerin, yüksek verimli (genomik) bukkal kütüphanelerden ayrı bir zenginleştirme havuzunda işlenmesi önerilir. Spesifik tavsiyeleri almak için, yerel teknik temsilcinizle irtibat kurun.

5.2 Kütüphane Havuzu Konsantrasyonu (İsteğe Bağlı)

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Purification Beads (96'lı test kiti için Purification Beads-1)	2°C ila 8°C KUTU 5	58,5-108	En az 30 dk. boyunca oda sıcaklığına getirin. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.
Steril Su	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	480	Hazırlık gerekli değildir.
%100 Etanol	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	1.920	Aşağıda açıklandığı gibi %80 etanol hazırlayın.
Yeniden Süspansiyon Tamponu	2°C ila 8°C KUTU 5	32	Oda sıcaklığına getirin. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.

- 1920 µl %100 Etanol ve 480 µl Steril Su (fazla hacim dahildir) kullanarak yeni %80 etanol (örnek başına 2 yıkama) hazırlayın.
- Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
- Gerekli 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünü alın.

NOT: İşlem yaklaşık 30 dakika sürer.

- 1.0 Örnek Havuzlama çalışma kitabındaki talimatlara uygun şekilde, örnek kütüphanelerini 1,5 ml tüp içinde birleştirin.
- İyice vortekslenmiş Purification Beads'in uygun hacmini (1,8x birleştirilmiş örnek hacmi veya çalışma kitabındaki hesaplamalara bakın) birleştirilmiş kütüphaneleri içeren 1,5 ml tüpe ekleyin.
- Her tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca 3 kez vorteksleyin.
- Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
- 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
- Tüpü 1 dakika boyunca (96 örnekli kütüphaneler için 2,5 dakikaya kadar) mıknatıs üzerine koyun, boncukların mıknatısın yanında toplanmasına izin verin. Üst faz bulanık kalırsa, temizlenene kadar mıknatıs üzerinde kalır.
- Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde mıknatıs boyunca bırakın.
- Tüpü mıknatıs üzerinde bırakarak, %80 etanol ile iki kez yıkayın:
 - Her tüpe 800 µl %80 etanol ekleyin,
 - 30 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin,
 - Pipet kullanarak, tüm üst fazı aspire edin ve atın,
 - a) ile c) arası adımları toplam 2 yıkama için tekrarlayın.
- Kalan üst fazın hepsini P20 pipetle giderin.
- Kalan etanolün buharlaşmasını sağlamak için, tüpü oda sıcaklığında 5 dakika boyunca havayla kurutun.
- Kütüphaneleri ayırtmak için, tüpe 32 µl Yeniden Süspansiyon Tamponu ekleyin.
- Her tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca 3 kez vorteksleyin.

17. 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
18. Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
19. Tüpleri 1 dakika boyunca mıknatıs üzerine koyun, boncukların tüpler içinde mıknatısın yanında toplanmasına izin verin.
20. 30 µl üst fazı, hibridizasyon için yeni bir PCR plakasına **aktarın**.

NOT: Güvenli durma noktası. Kütüphaneler -15°C ila -25°C'de 1 haftaya kadar saklanabilir.

5.3 Prob Hibridizasyonu

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
AlloSeq Tx Prob Paneli	-15°C ila -25°C KUTU 4	10	Oda sıcaklığına getirin.
Hibridizasyon Tamponu 1	-15°C ila -25°C KUTU 4	50	15 dakika boyunca 50°C'de Hybex içine koyun. Vorteksleyin ve görsel olarak inceleyin, çökelti kalırsa ilaveten 15 dakika boyunca 50°C'de inkübe edin.
Hibridizasyon Tamponu 2	2°C ila 8°C KUTU 5	10	Oda sıcaklığına getirin.

2. Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
3. Gerekli PCR tüplerini/striplerini ve kapakları alın.

NOT: Yakalama protokolünden sonrasına kadar güvenli durma noktası yoktur. Örnek havuzları, hibridizasyon termal döngü reaksiyonunun 62°C'de bekletme adımından, boncuk yakalama ve ısıtmalı yıkama adımlarına doğrudan devam etmelidir.

NOT: İşlemin ayarlanması yaklaşık 20 dakika sürer ve termal döngü cihazı içinde en az 2 saat, en fazla 18 saat geçirilir (gece boyunca ya da 18 saate kadar bırakılan reaksiyonlar, reaksiyonun son bekletme işleminde 62°C sıcaklıkta bekletilmelidir).

4. Her bir hibridizasyon reaksiyonu için, aşağıdaki reaktifleri, listelenen sırada, bir PCR tüpü/stripi içinde birleştirin.

Reaktif	Havuz Başına Hacim (µl)
Örnek Kütüphaneleri Havuzu	30
AlloSeq Tx Prob Paneli	10
Hibridizasyon Tamponu 1	50
Hibridizasyon Tamponu 2	10
Toplam	100

5. 70 µl'ye ayarlanmış bir pipetle, her bir hibridizasyon reaksiyon kuyucuğunu 10 kez pipetle karıştırın, sıdırmaz şekilde kapatın ve ardından puls spin uygulayın.
6. Çözelti bulanık kalırsa, 6-8 kez daha pipetle karıştırın.

7. Tüpü/stribi termal döngü cihazı içine koyun ve **100°C**'ye ısıtılmış kapağı ve 100 µl reaksiyon hacmini kullanarak Hibridizasyon programını yürütün:

#	Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	Denatürasyon	98°C	5 dakika	1
2	Rampa Aşağı	98°C-62°C, 2°C/döngü azaltarak	1 dakika	1
3	2°C/döngü azaltarak, ilave 18 döngü için (toplam 19 döngü) adım 2'ye gidin.			
4	Hibridizasyon	62°C	90 dakika	1
5	Son Bekletme	62°C	Bekletin (adım 4 dahil, 62°C'de 18 saati aşmayın)	1

8. Yakalama ile devam etmeye hazır olana kadar, tüpü/stribi termal döngü cihazı içinde bırakın. Yakalama boncuklarının oda sıcaklığına ulaştığından ve Yakalama Yıkama Tamponu ile Hybex'in 58°C'ye ısıtıldığından emin olun.

5.4 Yakalama

9. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Yakalama Boncukları	2°C ila 8°C KUTU 5	250	En az 30 dk. boyunca oda sıcaklığına getirin.
Yakalama Yıkama Tamponu	-15°C ila -25°C KUTU 4	800	Kullanmadan önce 58°C'ye ısıtın.
Yakalama Elüsyon Tamponu 1	-15°C ila -25°C KUTU 4	28.5	Oda sıcaklığına getirin.
2N NaOH	-15°C ila -25°C KUTU 4	1.5	Oda sıcaklığına getirin. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.
Yakalama Elüsyon Tamponu 2	2°C ila 8°C KUTU 5	4	Oda sıcaklığına getirin.

1. Yakalanacak havuz başına aşağıdaki reaktiflerin elüsyon ana karışımını hazırlayın:

Reaktif	Havuz Başına Hacim (µl)
Yakalama Elüsyon Tamponu 1	28.5
2N NaOH (taze)	1.5

NOT: NaOH çözeltisi havadan CO₂'yi kolaylıkla emerek, reaktifin pH değerini ve performansını değiştirir. Kullanılmadığında 2N NaOH tüpünün sızdırmaz şekilde kapatıldığından emin olun.

2. Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
3. Gerekli olan 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerini, PCR tüplerini/striplerini ve kapakları alın.

NOT: Bu işlem yaklaşık 1 saat sürer.

4. Her bir hibridizasyon reaksiyonu için, yeni bir 1,5 ml tüpe 250 µl Yakalama Boncuğu ekleyin.
5. Her bir hibridizasyon reaksiyonunun 100 µl'lik kısmını, Yakalama Boncukları olan ilgili tüpe **aktarın**.
6. Tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca 3 kez vorteksleyin. Santrifüjlemeyin veya puls spin uygulamayın.
7. Tüpü Hybex içinde 58°C'de 15 dakika inkübe edin.
8. Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
9. Tüpü 1 dakika boyunca mıknatıs üzerine hemen koyun, boncukların mıknatısın yanında toplanmasına izin verin.

10. Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde miknatıs boyunca bırakın.
11. Aşağıda açıklandığı gibi, ısıtılmış Yakalama Yıkama Tamponu ile üç kez yıkayın.

NOT: Kullanılmadığında Yakalama Yıkama Tamponunu 58°C sıcaklığı korumak için Hybex içinde tutun. Yalnızca, adım 12b ve 14'de reaksiyona eklemekten hemen önce çıkarın. Isıtılmış yıkama adımlarını uygularken, örnek havuzunun/tamponunun oda sıcaklığındaki süresini en düşük düzeye indirmek için hızlı çalışın.

- a) Tüpü miknatıstan çıkarın.
 - b) 200 µl ısıtılmış Yakalama Yıkama Tamponu (58°C) ekleyin,
 - c) Tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca 3 kez vorteksleyin. Santrifüjlemeyin veya puls spin uygulamayın.
 - d) Tüpü Hybex içinde 58°C'de 5 dakika inkübe edin.
 - e) Puls spin uygulayın ve ardından tüpü 1 dakika boyunca 1,5 ml miknatıs üzerine hemen koyun, boncukların miknatısın yanında toplanmasına izin verin.
 - f) Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde miknatıs boyunca bırakın.
 - g) a) ile f) arası adımları toplam 3 yıkama için iki kere daha tekrarlayın.
12. Tüpü miknatıstan çıkarın.
 13. 200 µl ısıtılmış Yakalama Yıkama Tamponu (58°C) ekleyin.
 14. Tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca 3 kez vorteksleyin. Santrifüjlemeyin veya puls spin uygulamayın.
 15. Bütün içeriği (yıkama çözeltisi ve boncuklar) yeni 1,5 ml tüpe **aktarın**.

NOT: Bu aktarım adımı, aşağı akış performansını etkileyebilecek PCR inhibitörlerinin giderilmesi için kritik önemdedir.

16. Tüpü Hybex içinde 58°C'de 5 dakika inkübe edin.
17. Hemen puls spin uygulayın ve ardından tüpü 1 dakika boyunca miknatıs üzerine koyun, boncukların miknatısın yanında toplanmasına izin verin.
18. Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde miknatıs boyunca bırakın.
19. Tüpe hızlıca puls spin uygulayın ve ardından tüpü 1 dakika boyunca miknatıs üzerine hemen koyun, boncukların miknatısın yanında toplanmasına izin verin.
20. P20 pipet kullanarak, kalan üst faz varsa aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde miknatıs boyunca bırakın.
21. Yukarıda hazırlanan elüsyon ana karışımını vorteksleyin ve ardından reaksiyon tüpünü miknatıstan çıkarın ve her tüpe 23 µl elüsyon ana karışımı ekleyin.
22. Tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca 3 kez vorteksleyin.
23. 2 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
24. Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
25. Tüpü 1 dakika boyunca miknatıs üzerine koyun, boncukların miknatısın yanında toplanmasına izin verin.
26. 21 µl üst fazı, yeni bir PCR tüpüne/stribine **aktarın**.
27. 4 µl Yakalama Elüsyon Tamponu 2 ekleyin.
28. 6-8 kez pipetle karıştırın. Son hacim 25 µl'dir.

NOT: Güvenli durma noktası. Kütüphaneler -15°C ila -25°C'de 24 saate kadar saklanabilir.

5.5 Zenginleştirme Sonrası PCR

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
PCR Primerler	-15°C ila -25°C KUTU 4	5	Buz üzerinde çözündürün. Ters çevirerek karıştırın, ardından kısa süreli santrifüjleyin.
PCR Mix (veya 96'lı kit için PCR Mix-2)	-15°C ila -25°C KUTU 4	20	Oda sıcaklığında çözündürün ve ardından buz üzerine koyun.

2. Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.

- Adım 5.4 Yakalama'dan yakalama kütüphanelerini içeren, gerekli olan PCR tüplerini alın.

NOT: Bu işlemde, ayar yaklaşık 5 dakika sürer, termal döngü cihazında **1:40** saat geçirilir.

- 5 µl PCR Primerlerini, PCR tüpündeki yakalanan kütüphanelere ekleyin.
- Tüpe 20 µl PCR Karışımı ekleyin.
- 10 kez pipetle karıştırın.
- Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
- Tüpü/stribi termal döngü cihazı içine koyun ve 105°C'ye ısıtılmış kapağı ve 50 µl reaksiyon hacmini kullanarak zenginleştirme sonrası PCR programını yürütün:

#	Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
1	Denatürasyon	98°C	30 saniye	1
2	Denatürasyon	98°C	1 dakika	17
3	Bağlanma	60°C	30 saniye	
4	Uzatma	72°C	3 dakika	
5	Son uzatma	72°C	5 dakika	1
6	Son bekletme	10°C	Bekletme	1

NOT: Güvenli durma noktası. Kütüphaneler -15°C ila -25°C'de 1 haftaya kadar saklanabilir.

NOT: Saflaştırmaya hemen geçiliyorsa, kullanım öncesinde Saflaştırma Boncuklarının oda sıcaklığına getirildiğinden emin olun.

5.6 Zenginleştirme Sonrası PCR Saflaştırma

- Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Saflaştırma Boncukları (96'lı kit için Purification Beads-2)	2°C ila 8°C KUTU 5	27	En az 30 dk. boyunca oda sıcaklığına getirin.
Steril Su	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	80	Hazırlık gerekli değildir.
%100 Etanol	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	320	Aşağıda açıklandığı gibi %80 etanol hazırlayın.
Yeniden Süspansiyon Tamponu	2°C ila 8°C KUTU 5	32	Oda sıcaklığına getirin. Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün.

- 480 µl %100 Etanol ve 120 µl Steril Su (fazla hacim dahildir) kullanarak yeni %80 etanol (örnek başına 2 yıkama) hazırlayın.
- Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
- Gerekli 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünü alın.

NOT: İşlem yaklaşık **30** dakika sürer.

- Her bir saflaştırma reaksiyonu için, yeni bir 1,5 ml tüpe, iyice vortekslenmiş Saflaştırma Boncuklarının 27 µl'lik kısmını ekleyin.
- Her bir zenginleştirme sonrası PCR reaksiyonunun 45 µl'lik kısmını, Purification Beads olan ilgili tüpe **aktarın**.
- Her tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca 3 kez vorteksleyin.
- Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.

9. 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
10. 1 dakika boyunca veya tüm boncuklar mıknatısta toplanana kadar, tüpü mıknatıs üzerine koyun.
11. Bir pipet kullanarak, üst fazı aspire edin ve atın, boncukları tüp içinde mıknatıs boyunca bırakın.
12. Tüpü mıknatıs üzerinde bırakarak, %80 etanol ile iki kez yıkayın:
 - a) Her tüpe 200 µl %80 etanol ekleyin,
 - b) 30 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin,
 - c) Pipet kullanarak, tüm üst fazı aspire edin ve atın,
 - d) a) ile c) arası adımları toplam 2 yıkama için tekrarlayın.
13. Kalan üst fazın hepsini P20 pipetle giderin.
14. Kalan etanolün buharlaşmasını sağlamak için, tüpü oda sıcaklığında 5 dakika boyunca havayla kurutun.
15. Tüpü mıknatıstan çıkarın ve hedef fragmanları ayrıştırmak için her tüpe 32 µl Yeniden Süspansiyon Tamponu ekleyin.
16. Her tüpü yüksek hızda 10 saniye boyunca 3 kez vorteksleyin.
17. 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
18. Tüpe hızlıca puls spin uygulayın.
19. Tüpleri 1 dakika boyunca mıknatıs üzerine koyun, boncukların tüp içinde mıknatısın yanında toplanmasına izin verin.
20. 30 µl üst fazı, saklamak üzere yeni bir 1,5 ml tüpe **aktarın**.

NOT: Güvenli durma noktası. Kütüphaneler -15°C ila -25°C'de 1 aya kadar saklanabilir.

5.7 Qubit Miktar Belirleme

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
Qubit BR tamponu	-25°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	199	Hazırlık gerekli değildir.
Qubit BR boya	-25°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	1	Hazırlık gerekli değildir.
BR Standart 1	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	10	Oda sıcaklığına getirin.
BR Standart 2	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	10	Oda sıcaklığına getirin.

2. Gerekli Qubit tüplerini ve gerekli hacme göre 1,5 ml ya da 5 ml tüpü, çalışma çözeltisinin hazırlanması için alın.
3. Standartlar için iki ve her örnek için bir analiz tüpü hazırlayın.
4. Miktarı belirlenecek örnek/standart başına 1 µl Qubit boya ve 199 µl Qubit tampon kullanarak, 200 µl Qubit çalışma çözeltisini hazırlayın.
5. Çalışma çözeltisini 2-3 saniye vorteksleyin ve ardından puls spin uygulayın.
6. Çalışma çözeltisinin **190 µl**'lik kısmını her bir Standart tüpünün içine alıktalayın.
7. Çalışma çözeltisinin **198 µl**'lik kısmını Havuz tüplerinin her birinin içine alıktalayın.
8. Standart çözeltisinin **10 µl**'lik kısmını ilgili her bir Standart tüpünün içine alıktalayın.
9. Her bir havuzun **2 µl**'lik kısmını ilgili tüpün içine alıktalayın.

10. Bütün tüpleri 2-3 saniye vorteksleyin ve ardından puls spin uygulayın.
11. Tüpleri oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.
12. Tüpleri Qubit Florometre içine koyun ve okumalar yapın (daha fazla bilgi almak için Qubit üreticisinin protokolüne bakın).
13. Ortalama konsantrasyonu hesaplamak için, Qubit okumalarını çalışma kitabındaki tabloya kaydedin.

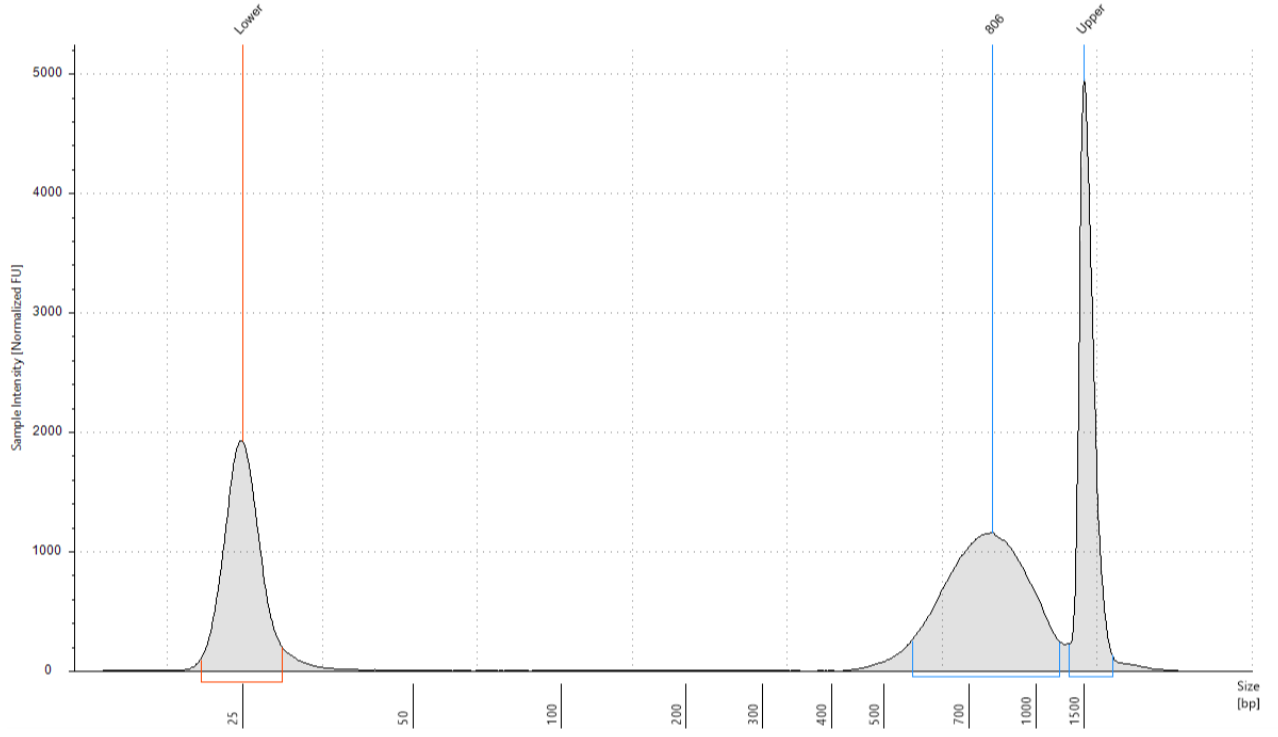
5.8 TapeStation Görselleştirme (İsteğe Bağlı)

NOT: Kullanıcı validasyonunun ardından, Fragment Analyzer (Fragman Analizörü), Biyoanalizör gibi, alternatif fragman görselleştirme sistemleri kullanılabilir.

1. Gerekli reaktifleri (aşağıdaki tabloda belirtilen hacim) alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Havuz Başına Hacim (µl)	Gerekli Hazırlık
D1000 Merdiven	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	1	Oda sıcaklığına getirin.
D1000 Örnek Tamponu	2°C ila 8°C Kullanıcı tarafından temin edilir	3	Oda sıcaklığına getirin.

2. Gerekli D1000 ScreenTape, TapeStation optik tüp striplerini ve kapakları alın.
3. Her bir havuzun 1 µl'lik kısmını yeni bir tüpe aktarın.
4. Bir referans tüp içine 1 µl D1000 Ladder ekleyin.
5. Her bir havuz tüpüne ve referans tüpe 3 µl D1000 sample buffer ekleyin.
6. Bütün tüpleri kapaklarla sızdırmaz şekilde kapatın.
7. 1 dakika boyunca 2000 dev./dk.'da IKA vorteks kullanarak bütün tüpleri iyice vorteksleyin.
8. Bütün örneklerin tüplerin dibinde olmasını sağlamak için, kısa süreli olarak santrifüjleyin.
9. Örnek tüplerinin kapağını çıkarın ve tüpleri 2200 TapeStation cihazı içine yükleyin.
10. 2200 TapeStation Controller Yazılımında gerekli tüpleri seçin ve örnekleri çalıştırın (daha fazla bilgi almak için TapeStation kullanım kılavuzuna bakın).
11. Çalışma tamamlandığında, sonuçları görüntülemek için TapeStation Analysis Yazılımını başlatın (daha fazla bilgi almak için TapeStation kullanım kılavuzuna bakın).
12. Sonuçları çalışma kitabındaki tabloya kaydedin.



Şekil 5.8.1: Son zenginleştirilmiş kütüphane havuzu için TapeStation izinin temsili resmi.

6. Dizileme

6.0 Protokole Giriş

AlloSeq Tx kütüphaneleri, elde edilen dizileme verilerinin fastq dosyası biçiminde çıkarıldığı, MiSeq, MiniSeq veya iSeq'yu içeren Illumina dizileme cihazında yapılan dizileme için valide edilmiştir. Zenginleştirilmiş her bir havuza eklenen örnek sayısı, bu Kullanım Kılavuzunda 1.3 AlloSeq Tx Hedeflenmiş Gen İçeriği bölümünde listendiği şekilde, gerekli dizileme cihazı akış hücrelerini belirler.

- Belirtilen parametreleri kullanarak, aşağıdaki AlloSeq Tx protokolünü gösterilen sırayla izleyin.
- Devam etmeden önce kit bileşenlerini onaylayın ve gerekli sarf malzemeleri ile ekipmanlara sahip olduğunuzdan emin olun.
- Kullanım kolaylığı sağlamak için, Dizileme protokol adımları IFU095-5_AlloSeq Tx Erken Havuzlama Çalışma Kitabı CE IVD (Erken Havuzlama Çalışma Kitabı) ve IFU095-3_AlloSeq Tx Dizileme Çalışma Kitabı CE IVD (Asıl Çalışma Kitabı) içinde de ayrıntılı olarak verilmektedir. Bölüm 6'daki çalışma kitabı referansları, bu çalışma kitaplarıyla ilişkilidir.
- Dizileme cihazları, aşağıdaki talimatlarda belirtildiği gibi cihaz protokolüne uygun şekilde yüklenmelidir.
- Bir MiSeq cihazı kullanılıyorsa, optimum performans için MiSeq kullanıcı kılavuzu talimatlarına uygun olarak şablon çizgi beyazlatıcı (sodyum hipoklorit) yıkaması yapılması önerilir.

NOT: Illumina biçimlendirilmiş dizileme örnek sayfası içe aktarma .csv dosyası, IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Çalışma Kitabı CE IVD (Çalışma Kitabı "1.0 Sample_Prep"), "1.2 SampleSheet" (Early Pooling Çalışma Kitabı) kısmında veya IFU095-1_AlloSeq Tx Kütüphane Hazırlama Çalışma Kitabı CE IVD (Çalışma Kitabı "1.0 Sample_Prep"), "1.2 SampleSheet" (Asıl İş Akışı) kısmında açıklandığı gibi oluşturulabilir ve kaydedilebilir.

6.1 PhiX Hazırlama

1. Gerekli reaktifleri alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Gerekli Hazırlık
10 nM PhiX	-15°C ila -25°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Çözdürün ve ardından buz üzerinde tutun.
2N NaOH	-15°C ila -25°C KUTU 4	Oda sıcaklığına getirin.
Steril Su	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Hazırlık gerekli değildir.
Yeniden Süspansiyon Tamponu	2°C ila 8°C KUTU 5	Oda sıcaklığına getirin.
HT1 (Dizileme kartuşuyla)	-15°C ila -25°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Çözdürün ve ardından buz üzerinde tutun.

2. 0,2 NaOH çalışma çözeltisini 45 µl Steril Su ve 5 µl 2N NaOH kullanarak hazırlayın.

NOT: NaOH çözeltisi havadan CO₂'yi kolaylıkla emerek, reaktifin pH değerini ve performansını değiştirir. Kullanılmadığında 2N NaOH tüpünün sızdırmaz şekilde kapatıldığından emin olun.

3. Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
4. Gerekli 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünü alın.

6.1.1 MiSeq ve MiniSeq Çalışmaları için PhiX Seyreltme ve Denatürasyon

1. Yeni tüpe 3 µl Yeniden Süspansiyon Tamponu ekleyin.
2. Tüpe 2 µl 10 nM PhiX ekleyin.
3. Tüpe 5 µl 0.2N NaOH çalışma çözeltisi (yukarıda seyreltildiği şekilde) ekleyin.
4. Tüpe vorteksleme ve puls spin uygulayın.
5. 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
6. Denatüre PhiX içeren tüpe 990 µl önceden soğutulmuş HT1 ekleyin.
7. **Ters çevirerek karıştırın** (VORTEKSLEMEYİN) ve ardından tüpe puls spin uygulayın.

NOT: Bu, MiSeq çalışmalarında kullanılmaya hazır olan 1 ml 20 pM PhiX ile sonuçlanır MiniSeq çalışmaları için, aşağıda açıklandığı gibi 5 pM'ye ayarlanmış ek seyreltmeyi gerçekleştirin. Denatüre pHiX, -15°C ila -25°C'de 1 aya kadar saklanabilir.

6.1.2 MiniSeq Çalışmaları için, PhiX'i İlaveten 5 pM'ye Seyreltin

1. PhiX için uygun seyreltmeyi hesaplamak üzere, istediğiniz seyreltme hacmini çalışma kitabına girin.
2. Bir mikrosantrifüj tüpünde reaktif hacmini (çalışma kitabına bakın) birleştirerek PhiX'i 5 pM'ye seyreltin.
3. **Ters çevirerek karıştırın** (VORTEKSLEMEYİN) ve ardından tüpe puls spin uygulayın.

NOT: Denatüre pHiX, -15°C ila -25°C'de 1 aya kadar saklanabilir.

6.1.3 iSeq Çalışmaları için, PhiX'i 20pM'ye Seyreltin (Denatüre Etmeden)

1. PhiX için uygun seyreltmeyi hesaplamak üzere, istediğiniz seyreltme hacmini çalışma kitabına girin.
2. Bir mikrosantrifüj tüpünde reaktif hacmini (çalışma kitabına bakın) birleştirerek PhiX'i 20 pM'ye seyreltin.
3. **Ters çevirerek karıştırın** (VORTEKSLEMEYİN) ve ardından tüpe puls spin uygulayın.

NOT: Denatüre pHix, -15°C ila -25°C'de 1 aya kadar saklanabilir.

6.2 MiSeq için Seyreltin ve Denatüre Edin

1. Gerekli reaktifleri alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Gerekli Hazırlık
AlloSeq Tx Zenginleştirilmiş Örnek Havuzu	-15°C ila -25°C Kullanıcının hazırladığı	Çözdürün ve ardından buz üzerinde tutun.
2N NaOH	-15°C ila -25°C KUTU 4	Oda sıcaklığına getirin.
Steril Su	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Hazırlık gerekli değildir.
HT1 (MiSeq kartuşuyla)	-15°C ila -25°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Çözdürün ve ardından buz üzerinde tutun.
Yeniden Süspansiyon Tamponu	2°C ila 8°C KUTU 5	Oda sıcaklığına getirin.
20 pM PhiX (önceden seyreltilmiş)	-15°C ila -25°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Çözdürün ve ardından buz üzerinde tutun.

2. 0,2N NaOH çalışma çözeltisini 45 µl Steril Su ve 5 µl 2N NaOH kullanarak hazırlayın.

NOT: NaOH çözeltisi havadan CO₂'yi kolaylıkla emerek, reaktifin pH değerini ve performansını değiştirir. Kullanılmadığında 2N NaOH tüpünün sızdırmaz şekilde kapatıldığından emin olun.

- Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
- Gerekli 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünü alın.
- Kütüphane için uygun seyreltmeyi hesaplamak üzere, 4 nM'de, zenginleştirilmiş örnek havuzu konsantrasyonunu, fragman büyüklüğünü (yaklaşık 800 bp bekleyin) ve istenen toplam hacmi (önerilen 30 µl) çalışma kitabına girin.
- Bir mikrosantrifüj tüpünde reaktifleri birleştirerek örnek havuzunu 4 nM'ye seyreltin (çalışma kitabına bakın).
- Daha fazla kullanmadan önce, seyreltilmiş örnek havuzuna vorteksleme ve puls spin uygulayın.
- Yeni bir tüpe 5 µl 4 nM zenginleştirilmiş örnek havuzu ekleyin.
- Tüpe 5 µl 0.2N NaOH çalışma çözeltisi (yukarıda seyreltildiği şekilde) ekleyin.
- Tüpe vorteksleme ve puls spin uygulayın.
- 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
- Denatüre zenginleştirilmiş örnek havuzunu içeren tüpe 990 µl önceden soğutulmuş HT1 ekleyin.
- Ters çevirerek karıştırın** (VORTEKSLEMEYİN) ve ardından tüpe puls spin uygulayın.

NOT: Bu, 1 ml 20 pM örnek havuzuyla sonuçlanır. Havuzlar -15°C ila -25°C'de 1 aya kadar saklanabilir.

- Kütüphane için uygun seyreltmeyi hesaplamak amacıyla, dizileme için birleştirilecek havuz sayısını, yükleme konsantrasyonunu (önerilen 12 pM), istediğiniz % PhiX eklemesini (önerilen en az %1) ve yükleme hacmini (en az 600 µl) çalışma kitabına girin.
- Bir mikrosantrifüj tüpünde reaktifleri birleştirerek örnek havuzunu, yükleme konsantrasyonuna seyreltin (çalışma kitabına bakın).
- Ters çevirerek karıştırın** (VORTEKSLEMEYİN) ve ardından tüpe puls spin uygulayın.

17. Dizileme için MiSeq reaktif kartuşuna yüklenmeye hazır olana kadar, kenara buz üzerine koyun.

NOT: Havuzlar dizileme öncesinde -15°C ila -25°C'de 48 saate kadar saklanabilir.

18. Cihaz protokolüne uygun şekilde MiSeq'yu yüklemeye geçin.

6.3 MiSeq için Seyreltin ve Denatüre Edin

1. Gerekli reaktifleri alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Gerekli Hazırlık
AlloSeq Tx Zenginleştirilmiş Örnek Havuzu	-15°C ila -25°C Kullanıcının hazırladığı	Çözdürün ve ardından buz üzerinde tutun.
2N NaOH	-15°C ila -25°C KUTU 4	Oda sıcaklığına getirin.
Steril Su	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Hazırlık gerekli değildir.
HT1 (dizileme kartuşuyla)	-15°C ila -25°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Çözdürün ve ardından buz üzerinde tutun.
Yeniden Süspansiyon Tamponu	2°C ila 8°C KUTU 5	Oda sıcaklığına getirin.
200 mM Tris-HCl, pH 7,0	15°C ila 30°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Hazırlık gerekli değildir.
5 pM PhiX (önceden seyreltilmiş)	-15°C ila -25°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Çözdürün ve ardından buz üzerinde tutun.

2. 0,1N NaOH çalışma çözeltisini 95 µl Steril Su ve 5 µl 2N NaOH kullanarak hazırlayın.

NOT: NaOH çözeltisi havadan CO₂'yi kolaylıkla emerek, reaktifin pH değerini ve performansını değiştirir. Kullanılmadığında 2N NaOH tüpünün sızdırmaz şekilde kapatıldığından emin olun.

- Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
- Gerekli 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünü alın.
- Kütüphane için uygun seyreltmeyi hesaplamak üzere, 1 nM'de, zenginleştirilmiş örnek havuzu konsantrasyonunu, fragman büyüklüğünü (yaklaşık 800 bp bekleyin) ve istenen toplam hacmi (önerilen 100 µl) çalışma kitabına girin.
- Bir mikrosantrifüj tüpünde reaktifleri birleştirerek örnek havuzunu 1 nM'ye seyreltin (çalışma kitabına bakın).
- Daha fazla kullanmadan önce, seyreltilmiş örnek havuzuna vorteksleme ve puls spin uygulayın.
- Yeni bir tüpe 5 µl 1 nM zenginleştirilmiş örnek havuzu ekleyin.
- Tüpe 5 µl 0.1N NaOH çalışma çözeltisi (yukarıda seyreltildiği şekilde) ekleyin.
- Tüpe vorteksleme ve puls spin uygulayın.
- 5 saniye boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
- pH 7,0 değerinde 5 µl 200 mM Tris-HCl'yi ekleyin.
- Tüpe vorteksleme ve puls spin uygulayın.
- Denatüre zenginleştirilmiş örnek havuzunu içeren tüpe 985 µl önceden soğutulmuş HT1 ekleyin.
- Ters çevirerek karıştırın** (VORTEKSLEMEYİN) ve ardından tüpe puls spin uygulayın.

NOT: Bu, 1 ml 5 pM örnek havuzuyla sonuçlanır. Havuzlar -15°C ila -25°C'de 1 aya kadar saklanabilir.

16. Kütüphane için uygun seyreltmeyi hesaplamak amacıyla, dizileme için birleştirilecek havuz sayısını, yükleme konsantrasyonunu (önerilen 1,6 pM), istediğiniz % PhiX eklemesini (önerilen en az %1) ve yükleme hacmini (en az 500 µl) çalışma kitabına girin.
17. Bir mikrosantrifüj tüpünde reaktifleri birleştirerek örnek havuzunu, yükleme konsantrasyonuna seyreltin (çalışma kitabına bakın).
18. **Ters çevirerek karıştırın** (VORTEKSLEMEYİN) ve ardından tüpe puls spin uygulayın.
19. Dizileme için MiniSeq reaktif kartuşuna yüklenmeye hazır olana kadar, kenara buz üzerine koyun.

NOT: Havuzlar dizileme öncesinde -15°C ila -25°C'de 48 saate kadar saklanabilir.

20. Cihaz protokolüne uygun şekilde MiniSeq'yu yüklemeye geçin.

6.4 iSeq için Seyreltin

1. Gerekli reaktifleri alın ve tabloya uygun şekilde hazırlayın:

Reaktif	Saklama Koşulları	Gerekli Hazırlık
AlloSeq Tx Zenginleştirilmiş Örnek Havuzu	-15°C ila -25°C Kullanıcının hazırladığı	Çözdürün ve ardından buz üzerinde tutun.
Yeniden Süspansiyon Tamponu	2°C ila 8°C KUTU 5	Oda sıcaklığına getirin.
20 pM PhiX (önceden seyreltilmiş)	-15°C ila -25°C Kullanıcı tarafından temin edilir	Çözdürün ve ardından buz üzerinde tutun.

2. Kullanmadan önce tüm reaktifleri vorteksleyin ve puls spin uygulayın.
3. Gerekli 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünü alın.
4. Kütüphane için uygun seyreltmeyi hesaplamak üzere, 1 nM'de, zenginleştirilmiş örnek havuzu konsantrasyonunu, fragman büyüklüğünü (yaklaşık 800 bp bekleyin) ve istenen toplam hacmi (önerilen 100 µl) çalışma kitabına girin.
5. Bir mikrosantrifüj tüpünde reaktifleri birleştirerek örnek havuzunu 1 nM'ye seyreltin (çalışma kitabına bakın).
6. Daha fazla kullanmadan önce, seyreltilmiş örnek havuzuna vorteksleme ve puls spin uygulayın.
7. Kütüphane için uygun seyreltmeyi hesaplamak amacıyla, dizileme için birleştirilecek havuz sayısını, yükleme konsantrasyonunu (önerilen 200 pM), istediğiniz % PhiX eklemesini (önerilen en az %1) ve yükleme hacmini (en az 100 µl) çalışma kitabına girin.
8. Bir mikrosantrifüj tüpünde reaktifleri birleştirerek örnek havuzunu, yükleme konsantrasyonuna seyreltin (çalışma kitabına bakın).
9. **Ters çevirerek karıştırın** (VORTEKSLEMEYİN) ve ardından tüpe puls spin uygulayın.
10. Dizileme için iSeq reaktif kartuşuna yüklenmeye hazır olana kadar, kenara buz üzerine koyun.

NOT: Havuzlar dizileme öncesinde -15°C ila -25°C'de 48 saate kadar saklanabilir.

11. Seyreltilmiş örnek havuzunun 20 µl'lik kısmını, cihaz protokolüne uygun şekilde iSeq kartuşu içine yükleyerek devam edin.

7. Dizi Analizi

Elde edilen Fastq dosyaları, AlloSeq Assign yazılımı kullanılarak analiz edilecektir. AlloSeq Assign yazılımının kullanımıyla ilgili prosedürler, *IFU094_AlloSeq Assign Kullanım Kılavuzu CE IVD*'de bulunabilir.

8. Sorun Giderme Kılavuzu

SORUN	OLASI NEDENLER	Çözüm
Kütüphane hazırlamada verim düşük veya hiç yok (Qubit miktar tayiniyle saptanır)	Yetersiz kalitede ya da düşük konsantrasyon girdili DNA	Jel elektrofeziyle DNA kalitesini değerlendirin. Sağlam DNA yaklaşık 3kb olup, jel üzerinde bulaşma bulgusu az olmalı ya da hiç olmamalıdır. DNA'yı yeniden ekstrakte edin ve mümkün olduğunda prosedürü tekrarlayın.
	Hatalı primer örnek tipi kullanılmıştır.	Heparin içeren tam kan numuneleri kullanmayın. ACD veya EDTA korumalı tam kandan DNA'yı yeniden ekstrakte edin ve mümkün olduğunda prosedürü tekrarlayın.
	Yakalama esnasında kütüphaneler kaybolmuştur	Protokole bakın. Üst fazı koruyan Safılaştırma adımlarının; ve üst fazı atan adımların doğru izlendiğinden emin olun. Etanol konsantrasyonunun doğru olduğundan emin olun. Yalnızca su veya fazla su içeriği kullanılması halinde DNA beklenenden önce ayrışabilir.
	Kütüphaneler yakalama boncuklarından ayrıştırılmamıştır	Protokole bakın. Elüsyon tamponlarının doğru sırada kullanıldığından emin olun. Yeniden süspansiyon ve elüsyondan önce reaktiflerin/tamponların yeterli şekilde giderildiğinden emin olun. Kurutma adımları esnasında DNA'nın veya boncuğa bağlı DNA peletlerinin gereğinden fazla kurutulmasından kaçının. DNA peletlerinin uzun süreli kurutulması, yeniden süspansiyonu ve müteakip verimi engelleyebilir.
	Kritik reaktifler eklenmemiştir (yani boncuk, indeks primeri, PCR ana karışımı vb.) ya da doğru sırada kullanılmamıştır.	Protokole bakın. Reaktiflerin doğru sırada ve doğru hacimde eklendiğinden emin olun. Kalan reaktif hacimlerinin fazla olup olmadığını kontrol edin. Gerekli olduğu görülüyorsa prosedürü tekrarlayın.
	Hatalı inkübasyon veya döngü koşulları	Termal döngü cihazı koşullarını inceleyin: Tagmentasyon programı İndeksleme PCR programı
Zenginleştirmede verim düşük veya hiç yok (Qubit miktar belirlemeyle saptanır)	Yakalama esnasında kütüphaneler kaybolmuştur	Protokolü inceleyin ve korunan üst fazı ve atılan üst fazı gerektiren adımların doğru izlendiğinden emin olun. Seyreltilmiş Safılaştırma Boncuklarının doğru konsantrasyonda olduğundan ve seyreltilmemiş Safılaştırma Boncuklarının (seyreltilmiş boncuklardan arta kalanlar değil), boyut seçiminin ardından kullanıldığından emin olun.
	Kütüphaneler yakalama boncuklarından ayrıştırılmamıştır	Elüsyon tamponlarının doğru sırada kullanıldığından emin olun. Yeniden süspansiyon ve elüsyondan önce reaktiflerin/tamponların yeterli şekilde giderildiğinden emin olun. Kurutma adımları esnasında DNA'nın veya boncuğa bağlı DNA peletlerinin gereğinden fazla kurutulmasından kaçının. DNA peletlerinin uzun süreli kurutulması, çözeltinin yeniden süspansiyon edilme becerisini ve müteakip verimi azaltabilir.

SORUN	OLASI NEDENLER	Çözüm
	Hatalı inkübasyon veya döngü koşulları	Termal döngü cihazı koşullarını inceleyin: Hibridizasyon programı Zenginleştirme sonrası PCR programı
Kütüphane hazırlama veya zenginleştirme sonrasında hatalı boyutta fragmanlar (fragman analiziyle saptanır)	Örneğin Saflaştırma Boncuklarına oranı hatalıdır.	Protokolü tekrarlayın Protokolün saflaştırma ve boyut seçme adımları esnasında doğru boncuk konsantrasyonunun kullanıldığından emin olun.
Dizileme yapılamadı		Protokolün izlendiğini kontrol edin. Kullanılan dizileme cihazı modeli için ilgili kullanım kılavuzuna bakın.
Yüksek zenginleştirme verimi olmasına rağmen, Assign'da hedeflenen lokuslar için düşük kapsam.	Yakalama ve ısıtılmış yıkama adımları esnasında daha düşük sıcaklık nedeniyle spesifik olmayan fragmanlar yakalanmıştır.	Isıtılmış yıkama adımları için kullanılan Hybex'in kalibre edildiğinden ve korunduğundan emin olun. Havuz sıcaklığının önemli düzeyde düşmemesini sağlamak için, ısıtılmış yıkama adımları esnasında hızlı çalışın.

9. Destekleyici Bilgiler

Bu kılavuzda açıklanan protokolde, bu bölümdeki içeriği incelediğiniz, gerekli tüm sarf malzemelerini ve ekipmanları onayladığınız ve aldığınız varsayılır.

Lisans

AlloSeq Tx kitleri, CareDx Pty Ltd. tarafından dağıtılmak üzere Illumina Inc. tarafından üretilen, Zenginleştirme reaktifleri için Nextera Flex içerir.

Gerekli Olan Ancak Temin Edilmeyen Sarf Malzemeleri ve Ekipmanlar

Aşağıda listelenen sarf malzemeleri ve ekipmanlar, analizin gerçekleştirilmesi için gereklidir ancak AlloSeq Tx Kitinde yer almamaktadır.

Protokol, listelenen öğeler kullanılarak optimize edilmiş ve valide edilmiştir. Alternatif sarf malzemeleri ve ekipmanlar kullanıldığında benzer performans elde edileceği garanti edilmez.

Sarf Malzemesi	Tedarikçi/Katalog No.
PCR kalitesinde su	Sigma-Aldrich, W3500
Moleküler biyoloji için mutlak etanol	Genel laboratuvar tedarikçisi
Qubit™ dsDNA BR Analiz Kiti	Thermo Fisher Scientific, Q32850 ya da Q32853
Qubit™ Analiz Tüpleri	Thermo Fisher Scientific, Q32856
D1000 ScreenTape (isteğe bağlı)	Agilent Technologies, 5067-5584
D1000 Reaktifler (isteğe bağlı)	Agilent Technologies, 5067-5585
96 Kuyucuklu Örnek Plakaları (isteğe bağlı)	Agilent Technologies, 5067-5150
96 Kuyucuklu Plaka Folyo Sızdırmazlık Elemanı (isteğe bağlı)	Agilent Technologies, 5067-5154
Optik tüp stripleri (8x Strip) (isteğe bağlı)	Agilent Technologies, 401428
Optik tüp strip kapakları (8x Strip) (isteğe bağlı)	Agilent Technologies, 401425

Aşağıdaki dizileme reaktif kitlerinden biri:

- MiSeq V2 Standard (300 döngü)
- MiSeq V2 Micro (300 döngü)
- MiSeq V2 Nano (300 döngü)
- MiniSeq Mid Çıktı Kiti (300 döngü)
- Illumina, MS-102-2002
- Illumina, MS-103-1002
- Illumina, MS-103-1001
- Illumina, FC-420-1004

Sarf Malzemesi	Tedarikçi/Katalog No.
• iSeq 100 i1 Reaktif v2 (300 döngü)	• Illumina, 20031371
PhiX Control v3	Illumina, FC-110-3001
20 µl bariyer pipet uçları	Genel laboratuvar tedarikçisi
200 µl bariyer pipet uçları	Genel laboratuvar tedarikçisi
1000 µl bariyer pipet uçları	Genel laboratuvar tedarikçisi
1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri	Genel laboratuvar tedarikçisi
5 ml tüpler	Genel laboratuvar tedarikçisi
15 ml konik santrifüj tüpleri	Genel laboratuvar tedarikçisi
25 ml reaktif hazneleri	Genel laboratuvar tedarikçisi
0,2 ml PCR 8 tüp stripler, kapaklı	Genel laboratuvar tedarikçisi
96 kuyucuklu PCR Plakaları	Genel laboratuvar tedarikçisi
Microseal 'B' yapışkan sızdırmazlık elemanları	Bio-Rad, MSB1001
Abgene™ 96 Kuyucuklu 0,8 ml Polipropilen Derin Kuyucuklu Saklama Plakası (MIDI plakası, yalnızca Asıl iş akışı)	Thermo Fisher, AB0859 ya da AB0765
Çalışma sonrası dizileme yıkaması için sodyum hipoklorit (NaOCl) (isteğe bağlı)	Sigma, 239305

Ekipman	Tedarikçi/Katalog No.
20 µl pipet	Genel laboratuvar tedarikçisi
200 µl pipet	Genel laboratuvar tedarikçisi
1000 µl pipet	Genel laboratuvar tedarikçisi
20 µl çok kanallı pipetler	Genel laboratuvar tedarikçisi
200 µl çok kanallı pipetler	Genel laboratuvar tedarikçisi
Mikrosantrifüj	Genel laboratuvar tedarikçisi
Mikroplaka santrifüj	Genel laboratuvar tedarikçisi
Vorteksleyici	Genel laboratuvar tedarikçisi
Sızdırmazlık film rulosu	Genel laboratuvar tedarikçisi
İndeks Fikstür Plakası	Illumina, FC-130-1005
Aşağıdaki manyetik raklardan biri:	
• DynaMag™-2 Mıknatıs	Thermo Fisher, 12321D
• MagJET Ayırma Rakı, 2 x 1,5 ml tüp	Thermo Fisher, MR01
Manyetik Stand-96	Thermo Fisher, AM10027
BioShake iQ veya	BioShake iQ, 1808-0506
BioShake XP	BioShake XP, 1808-0505
Agilent 2200 TapeStation Sistemi (isteğe bağlı)	Agilent Technologies
Qubit Florometre	Thermo Fisher
Aşağıdaki 96 kuyucuklu termal döngü cihazlarından biri:	
• Veriti™ 96-Kuyucuklu Termal Döngü Cihazı	Thermo Fisher, 4375786
• Eppendorf Termal Döngü Cihazı	Eppendorf, 6325000560
Hybex Sistemi	SciGene, 1057-30-2
Hybex 1,5 ml tüp bloğu. (32 x 1,5 ml tüpler).	SciGene, 1057-34-0
Aşağıdaki dizileme cihazlarından biri:	
• Illumina MiSeq	Illumina, SY-410-1003
• Illumina MiniSeq	Illumina, SY-420-1001
• Illumina iSeq	Illumina, 20021532

10. İletişim Bilgileri

Üretici:

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

Distribütör:

Asya Pasifik (APAC)
CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Avustralya, 6160.
Tel: +61-8-9336-4212
E-posta: orders-aus@caredx.com
Web sitesi: <http://www.caredx.com>

Avrupa, Orta Doğu ve Afrika (EMEA)
CareDx AB,
Franzégatan 5, SE-112 51 Stockholm, İsveç.
Tel: +46-8-508 939 00
Faks: +46-8-717 88 18
E-posta: orders-se@caredx.com
Web sitesi: <http://www.caredx.com/>

Amerika Kıtası
CareDx Lab Solutions Inc.,
901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
Tel: 1-877-OLERUP1
Faks: 610-344-7989
E-posta: orders-us@caredx.com
Web sitesi: <http://www.caredx.com>

Teknik Destek ve Ciddi olayların raporlanması:

E-posta: techsupport-global@caredx.com

Cihazla ilgili olarak meydana gelen tüm ciddi olaylar, üreticiye ve kullanıcının ve/veya hastanın yerleşik olduğu Üye Devletin yetkili makamına bildirilmelidir.

Daha fazla bilgi almak için lütfen CareDx web sitesine bakın (<https://www.caredx.com/contact-us/>).

İlgili Ürünler:

CE işaretli IVD'ler:
AlloSeq Assign

11. Referanslar

1. Illumina Teknik Notu. **Nextera XT library prep: tips and troubleshooting** (06/29/18)
2. Illumina Teknik Notu. **DNA/RNA isolation considerations for Illumina library preparation kits.** (21.12.2018)
3. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. **PCR inhibitors – occurrence, properties and removal.** 2012 J Appl Micro. 113:1014-26 (see also citations therein)
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 (see also citations therein)
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.

Yöntem geçmişi

Sürüm	Tarih	Değişiklik	Onaylayan
1.0	19 Şubat 2020	AlloSeq Tx Kullanım Kılavuzu CE'nin ilk sürümü. Yayınlayan E. Naughton 19 Şubat 2020	L. Westwood
1.1	28 Nisan 2020	AlloSeq Tx analizi, 700 bp ortalama boyutu olan DNA fragmanlarını diziler, yani 700 bp'den fazla aralıklı polimorfizmler evrelenemez ve bu, heterozigot belirsizliklere yol açabilir ifadesi, kısıtlamalar bölümüne eklendi. Yayınlayan E. Naughton 29 Nisan 2020	L. Westwood
1.2	08 Mayıs 2020	Etkileşim maddeleri güncellendi. Yeniden yayınlayan E. Naughton 8 Mayıs 2020	L. Westwood
1.3	13 Mayıs 2020	Etkileşim maddeleri tablosuna Biyotin eklendi. Bölüm 1.9'a kontrol örneği detayları eklendi. Yeniden yayınlayan E. Naughton 14 Mayıs 2020	L. Westwood
1.4	20 Mayıs 2020	1.4 AlloSeq Tx Kit içeriği ve Saklama ile ilgili Gereklilikler bölümü, aşağıdaki düzeltmelerle güncellendi: Tagmentation Wash Buffer için 2x Tüp, Capture Wash Buffer için 2x Tüp. Yeniden yayınlayan E. Naughton 20 Mayıs 2020	L. Westwood
1.5	05 Haziran 2020	Aşağıdaki değişiklikler yapıldı: - Bölüm 2.2'deki reaktif tablosunda H714 düzeltildi, - 3.0 bölümünde Hibrit Yakalama referansı düzeltildi, - Sarf Malzemelerinde PhiX referansı eklendi - Madde 3.1.5 ve 3.2.5 için çalışma kitaplarına referans eklendi. Yeniden yayınlayan E. Naughton 5 Haziran 2020	L. Westwood
1.6	20 Ekim 2020	NaOH kullanımına ilişkin bir not eklendi. Yeniden Yayınlayan E. Naughton 20 Ekim 2020	H. Hogan
2.0	26 Mart 2021	CR 2020-097 uyarınca bölüm 8.0'de distribütör Viyana iken Stockholm olarak güncellendi. iSeq reaktifi v1, devam edilmeyen olarak güncellendi ve CR 2020-077 uyarınca bölüm 7.0'da v2 ile değiştirildi. Bölüm 1.4'te 25 dondurma çözündürme döngüsü 12 olarak düzeltildi. Yeniden yayınlayan S. Antony 9 Nisan 2021	S. Carnachan
3.0	6 Mayıs 2021	Aşağıdaki güncellemeler yapılmıştır: • Bölüm 1: Destekleyici çalışma kitapları bölümü 9. bölüme taşındı; IFU095-5 eklendi. Asıl ve Early Pooling iş akışı karşılaştırmasına ilişkin açıklama eklendi. ASTX17.1(24)-B-IVD hedeflenmiş gen içeriği eklendi. Tx kit içeriği tablosunun biçimi güncellendi. Bukkal sürüntü referansı (RUO) eklendi. Tespit sınırı düzeltilerek DNA konsantrasyonu değil, DNA belirtildi. 2N NaOH için H318 uyarısı ve Capture Beads için H351 ile H373 tehlike uyarıları, Hybridisation Buffer 1 için H351 uyarısı eklendi; tabloya, Stop Buffer güvenlik bilgileri eklendi. • Bölüm 2 – Kütüphane Hazırlama (Early Pooling iş akışı) bölümü eklendi • Bölüm 3 – Hibrit Yakalama (Erken Havuzlama iş akışı) bölümü eklendi • Bölüm 4.1 – çalışma kitabıyla uyum sağlanması adına, örnek hazırlama açıklaması güncellendi • Bölüm 4.2 – tabloya Grup B indeksleri eklendi, zaman tahmini 2:45 saatten 1:50 saate güncellendi, santrifüj adımı 30 saniye 280 x g iken 10 saniye 100 x g olarak değiştirildi, adım 9, 21f, santrifüj adımı 1 dakika 280 x g iken 10 saniye 100 x g olarak değiştirildi, adım 29, santrifüj adımı 10 saniye 280 x g iken 10 saniye 100 x g olarak değiştirildi, adım 36, 'çalkalamayı adım 35'teki gibi tekrarlayın' yorumu adım 36'da eklendi • Bölüm 4.4/5.7 – tüm Qubit reaktif tablolarına Geniş Aralık (BR) açıklaması eklendi • Bölüm 5.3 - Hibridizasyon programı tablosuna, "Bekletin (adım 4 dahil, 62°C'de 18 saati aşmayın)" açıklama yorumu eklendi	S. Carnachan

Sürüm	Tarih	Değişiklik	Onaylayan
		• Bölüm 5.8 – tüp/kapaklara TapeStation plaka/sızdırmazlık elemanı referansları düzeltildi • Bölüm 6.0 – tablo kaldırıldı. Bu tablo Bölüm 1.1’de yer alır • Bölüm 6.2 – istenen MiSeq toplam hacmi, çalışma kitabıyla uyum sağlanması için 100 ul iken 30 ul olarak değiştirildi • Bölüm 6.4 – iSeq üzerine, 100 ul’lik seyreltilmiş havuzun yalnızca 20 ul’lik kısmının yüklendiğini açıklamak üzere yorum • Bölüm 9 – MIDI plakasına “Yalnızca Asıl iş akışı” ifadesi eklendi, çalışma sonrası dizileme yıkaması için sodyum hipoklorit (NaOCl) eklendi • Bölüm 9 – Illumina sipariş detaylarıyla uyum sağlanması için, MiSeq reaktif adları değiştirildi. AlloSeq Tx 8, için MiSeq Reaktif Kiti v3 (600 döngü) eklendi, Qubit tüp ve TapeStation tüp/kapak/plaka/ folyo sipariş bilgileri eklendi. Genel: Kapak sayfasına ASTX17.1(24)-B-IVD eklendi. “Sonraki adımlar için kullandıktan sonra saklamaya geri götürün” eklendi. Sonraki adımlar için muhafaza edilmesi gereken reaktiflere yönelik tavsiyeler, küçük biçimlendirmeler, gramer, noktalama ve imla hataları belge içinde düzeltildi. Saha ekibinin geri bildirimi izlenerek, düzgün Saflaştırma Boncuğu geçen her yerde ‘iyice vorteksleyin’ şeklinde ilave kılavuz eklendi. ‘hybex’ ifadesi geçen her yer ‘Hybex’, ‘QuBit’ ifadesi geçen her yer ‘Qubit’ ve ‘puls spin’ ifadesi geçen her yer ‘puls spin’ olarak düzeltildi. Bölüm 2.2 ve 4.2 Stop Buffer tablosu güncellendi ve Hazırlama Gerekli olarak düzeltilerek ‘Hazırlık gerekli değildir’ yapıldı. ISO 15223-1-2021 ve IVDR uyarınca “içe aktaran” ve sembolü eklendi. Yeniden yayınlayan L.Langley 13 Ekim 2021	
4.0	28 ocak22	Gramer düzeltildi. Kontrol miktar belirlemeye ilişkin kısıtlamalar ifadesi düzeltildi. Performans özellikleri paket insertü ile eşleşmesi için düzeltildi. ZD-2445 ile ilgili düzeltmeler yapıldı. Özet değerlendirme temelinde, Bölüm 2.3 adım 8, 12, 18 ve Bölüm 4.3 adım 7 Tagmentation Beads ve Purification Beads’i karıştırmaya ilişkin ayrıntılarla güncellendi. Kutu içerikleri güncellenen kit yapılandırmasını CR2020-096 (SCN 2021-08-13) yansıtabilecek şekilde güncellendi.	K. Hunter
5.0	31Mart22	Ürün kodları, Hedeflenmiş Gen İçeriği ve Kit İçeriklerine Tx 17 (96) Grup A ve B eklendi. Özellikle bölüm 2.2 ve 4.2 olmak üzere, önceden plakalanmış indeksin, kullanımına ilişkin talimat vermek amacıyla Kullanım Kılavuzuna ayrıntılar eklendi. Yayınlayan E. Naughton 27 Nisan 2022	K. Hunter
6.0	13 Haziran22	Ürün kodları, Hedeflenmiş Gen İçeriği ve kullanım amacına Tx 9 (96) Grup A ve B eklendi. AlloSeq Tx logosundaki ™ kaldırıldı. Etkileşim maddelerindeki OD değerleri düzeltildi. Çalışma kitabı ile Kullanım Kılavuzu arasındaki ifadeler uyumlaştırıldı. Bölüm 5.2, madde 12; etanol hacmi 200 µl’den 800 µl’ye değiştirildi. Bölüm 10: Vijilans raporlama gereksinimleri eklendi	K. Hunter