



Istruzioni per l'uso

IFU095

Numero versione: 5.0

Data di rilascio: Apr 2022

REF

ASTX17.1(24)-IVD

ASTX17.1(24)-B-IVD

ASTX17.1(96)-A-IVD

ASTX17.1(96)-B-IVD

IVD



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



CareDx AB,
Franzégatan 5,
SE-112 51
Stoccolma, Svezia

EC REP

Qarad BV,
Cipalstraat 3,
2440 Geel,
Belgio



Indice

1. Panoramica	3
1.1 Principio	3
1.2 Uso previsto	4
1.3 Contenuto genico mirato AlloSeq Tx.....	4
1.4 Contenuti del kit AlloSeq Tx e requisiti di conservazione	4
1.5 Limiti e controindicazioni	5
1.6 Requisiti campione	6
1.7 Sostanze interferenti.....	6
1.8 Caratteristiche di performance	7
1.9 Accuratezza	8
1.10 Specificità	8
1.11 Riproducibilità e Ripetibilità	9
1.12 Limite di rilevamento	9
1.13 Presupposti	9
1.14 Sicurezza.....	9
2. Preparazione della Libreria (flusso di lavoro Early Pooling).....	13
2.0 Introduzione al protocollo.....	13
2.1 Preparazione del campione.....	13
2.2 Preparazione della libreria	13
2.3 Selezione dimensione e purificazione	16
2.4 Quantificazione QuBit (opzionale)	18
2.5 Visualizzazione TapeStation (Opzionale).....	19
3. Cattura Ibrida (flusso di lavoro Early Pooling).....	20
3.0 Introduzione al protocollo.....	20
3.1 Ibridazione della sonda	21
3.2 Cattura.....	22
3.3 PCR post arricchimento	23
3.4 Purificazione PCR post arricchimento	24
3.5 Quantificazione Qubit	25
3.6 Visualizzazione TapeStation (Opzionale).....	26
4. Preparazione della Libreria (Flusso di lavoro Original)	27
4.0 Introduzione al protocollo.....	27
4.1 Preparazione del campione.....	27
4.2 Preparazione della libreria	28
4.3 Selezione dimensione e purificazione	31
4.4 Quantificazione QuBit (opzionale)	32
4.5 Visualizzazione TapeStation (Opzionale).....	33
5. Cattura Ibrida (flusso di lavoro Original).....	34
5.0 Introduzione al protocollo.....	34
5.1 Pooling campione	34
5.2 Concentrazione del Pool della libreria (opzionale)	34
5.3 Ibridazione della sonda	35
5.4 Cattura.....	36
5.5 PCR post arricchimento	38
5.6 Purificazione PCR post arricchimento	39
5.7 Quantificazione Qubit	40
5.8 Visualizzazione TapeStation (Opzionale).....	40
6. Sequenziamento	42
6.0 Introduzione al protocollo.....	42

6.1 Preparazione del controllo interno PhiX	42
6.2 Diluire e denaturare per MiSeq	43
6.3 Diluire e denaturare per MiniSeq	45
6.4 Diluire per iSeq	46
7. Analisi della sequenza	47
8. Guida alla risoluzione dei problemi	47
9. Informazioni di supporto	48
Licenza	48
Materiali consumabili e attrezzature richieste ma non fornite.....	48
10. Contatti.....	51
11. Bibliografia.....	52

1. Panoramica

1.1 Principio

AlloSeq Tx è la denominazione della famiglia di prodotti destinati al sequenziamento genico mirato, concepiti per agevolare la determinazione della compatibilità genetica tra i pazienti che necessitano di un trapianto e i potenziali donatori. AlloSeq Tx sfrutta la tecnologia di cattura ibrida per arricchire i geni di interesse dalla preparazione di un'intera libreria genomica. L'utilizzo della tecnologia di cattura ibrida, a differenza delle tecniche convenzionali PCR a lungo raggio, presenta notevoli benefici in termini di flussi di lavoro e consente la flessibilità del contenuto genico/sequenze variabili senza che sia necessario modificarlo.

I kit AlloSeq Tx includono:

- reagenti per approntare intere librerie genomiche,
- sonde biotinilate complementari alla cattura di target sequenziali e
- reagenti per arricchire i target catturati per il sequenziamento.

Il sequenziamento è eseguito su un sequenziatore Illumina (MiSeq, MiniSeq o iSeq), e i dati di sequenza ottenuti vengono rilasciati in file fastq che vengono importati nel software AlloSeq™ Assign® per agevolare la genotipizzazione.

Il presente documento di *Istruzioni per l'uso* descrive la procedura per l'utilizzo della famiglia di prodotti CareDx AlloSeq Tx. Il *Contenuto genico mirato* di ogni specifico prodotto AlloSeq Tx è elencato nella tabella seguente.

Per agevolare l'elaborazione del campione di laboratorio e la tenuta dei record, sono inoltre forniti i fogli di lavoro in Excel di ogni processo. I fogli di lavoro agevolano i calcoli del volume reagente e la realizzazione di fogli campione per il sequenziamento. I fogli di lavoro di supporto includono:

IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD

IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD

IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD

IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD

Sono delineate due opzioni di flusso di lavoro in questo documento: Flusso di lavoro Original e flusso di lavoro Early Pooling. Il flusso di lavoro Early Pooling raggruppa i campioni subito dopo l'indicizzazione in una provetta unica da utilizzare in tutti i passaggi successivi. Il flusso di lavoro Early Pooling elimina la selezione e purificazione delle dimensioni basate su piastra, nonché la fase di concentrazione opzionale quando si processano >12 campioni/corsa. Questo flusso di lavoro consente all'utente di prelevare i campioni fino al sequenziamento in un unico turno di lavoro. Questo flusso di lavoro è indicato per i laboratori che non utilizzano l'automazione e prediligono un protocollo che richiede meno tempo manuale, meno utilizzo di materiali di consumo e il 46% in meno di passaggi di pipettaggio se paragonato al flusso di lavoro Original. *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD* deve essere utilizzato in combinazione con il flusso di lavoro Early Pooling.

Il formato basato su piastra del flusso di lavoro Original è particolarmente indicato per i laboratori che scelgono di automatizzare questa procedura. *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD*, *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD* e *IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD* devono essere utilizzati in combinazione con il flusso di lavoro Original.

Il kit è destinato ad essere utilizzato da personale addestrato in laboratori regolamentati. La manipolazione dei prodotti deve essere effettuata con la dovuta cautela e attenzione. Raccomandiamo a tutti gli utenti di leggere nella sua totalità le istruzioni per l'uso, in particolare la sezione *Sicurezza*, prima di intraprendere qualsiasi procedura. Le procedure per il corretto utilizzo del software AlloSeq Assign sono riportate nelle Istruzioni per l'uso del software AlloSeq Assign.

1.2 Uso previsto

I kit di tipizzazione AlloSeq Tx 17 sono test qualitativi per la tipizzazione DNA dell'HLA-A, B, C, E, F, G, H, DRB1/3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, MICA e MICB al fine di individuare la compatibilità genetica in caso di trapianti di organi o di cellule staminali.

Il prodotto è destinato ad essere utilizzato con i sequenziatori Illumina MiSeq, MiniSeq e iSeq, congiuntamente al software di interpretazione AlloSeq Assign.

Il dispositivo è destinato ad essere utilizzato da personale adeguatamente addestrato, esperto in materia di frequenza genica dei tipi HLA nella propria popolazione, in laboratori opportunamente regolamentati che eseguono la tipizzazione dei tessuti (HLA) per identificare la compatibilità dei donatori e dei riceventi in caso di trapianto.

I prodotti AlloSeq Tx 17 sono destinati esclusivamente ad uso professionale e non devono essere utilizzati come unico criterio decisionale clinico. I kit AlloSeq Tx 17 non sono utilizzabili nella diagnostica delle patologie.

1.3 Contenuto genico mirato AlloSeq Tx

Nome prodotto	Codice prodotto	Geni mirati	Dimensioni kit	Capacità di sequenziamento
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(24)-IVD	HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA e MICB.	24 preparazioni libreria 4 arricchimenti (tra i 6 e i 24 campioni per arricchimento)	≤24 campioni su MiSeq Micro Flowcell
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(24)-B-IVD			≤6 campioni su MiSeq Nano Flowcell ≤24 campioni su iSeq ≤24 campioni su MiniSeq MidOutput Flowcell
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 e MICB	96 preparazioni libreria 8 arricchimenti (tra i 12 e i 96 campioni per arricchimento)	≤96 campioni su MiSeq v2 Standard Flowcell
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(96)-B-IVD			≤24 campioni su MiSeq Micro Flowcell ≤6 campioni su MiSeq Nano Flowcell ≤48 campioni su iSeq ≤24 campioni su MiniSeq MidOutput Flowcell

1.4 Contenuti del kit AlloSeq Tx e requisiti di conservazione

Se conservati conformemente alle specifiche di temperatura indicate in basso sui componenti del kit, gli stessi possono essere utilizzati fino alla scadenza riportata esternamente sui contenitori e possono tollerare fino a 12 cicli di gelo e disgelo. Dopo essere stati utilizzati, i kit/componenti devono essere immediatamente riportati alle condizioni di conservazione.

Gli studi di stabilità accelerati sono tuttora in corso per estendere ulteriormente questo arco temporale. Mentre sono in corso i test di verifica in tempo reale, si raccomanda vivamente di NON utilizzare questi kit oltre la loro data di scadenza.

Box reagenti 1 di 5, conservare da -15 a -25 °C

Reagente	Quantità (24 test)	Dimensione provetta/tipologia (24 test)	Quantità (96 test)	Dimensione/tipologia provetta (96 test)
Sfere di tagmentazione	1	0.5mL	1	1.5mL
Buffer di tagmentazione	1	0.5mL	1	1.5mL
PCR Mix-1	N/D	N/D	1	5mL

Box reagenti 2 di 5, conservare da 15 a 30 °C

Reagente	Quantità (24 test)	Dimensione provetta/tipologia (24 test)	Quantità (96 test)	Dimensione/tipologia provetta (96 test)
Stop Buffer	1	1.5mL	2	2mL
Buffer di lavaggio per la tagmentazione	2	5mL	1	50mL

Box reagenti 3 di 5, conservare da -15 a -25 °C

Reagente	Quantità (24 test)	Dimensione provetta/tipologia (24 test)	Quantità (96 test)	Dimensione provetta/tipologia (96 test)
AlloSeq Tx Index Primers	1 set (10x)	Provetta FluidX	1 piastra	piastra a 96 pozzetti

Box reagenti 4 di 5, conservare da -15 a -25 °C

Reagente	Quantità (24 test)	Dimensione provetta/tipologia (24 test)	Quantità (96 test)	Dimensione provetta/tipologia (96 test)
Specifiche Prodotto AlloSeq Tx Probes	1	0.5mL	1	0.5mL
PCR Mix	1	1.5mL	N/D	N/D
PCR Mix-2	N/D	N/D	1	0.5mL
Primer PCR	1	0.5mL	1	0.5mL
Buffer di ibridazione 1	1	1.5mL, conico	1	1.5mL, Conico
Buffer di lavaggio di cattura	4	1.5mL, ambra conico	8	1.5mL, ambra conico
Buffer di eluizione di cattura 1	1	0.5mL	1	0.5mL
2N NaOH	1	0.5mL	2	0.5mL

Box reagenti 5 di 5, conservare da 2 a 8 °C

Reagente	Quantità (24 test)	Dimensione provetta/tipologia (24 test)	Quantità (96 test)	Dimensione provetta/tipologia (96 test)
Purification Beads	1	5mL	N/D	N/D
Sfere di purificazione-1	N/D	N/D	3	5mL
Sfere di purificazione-2	N/D	N/D	1	0.5mL
Buffer di risospensione	2	1.5mL	2	5mL
Sfere di cattura	1	1.5mL	1	5mL
Buffer di ibridazione 2	1	0.5mL	1	0.5mL
Buffer di eluizione di cattura 2	1	0.5mL	1	0.5mL

1.5 Limiti e controindicazioni

- Si raccomanda espressamente che questi kit siano validati dall'utente prima di essere impiegati in laboratorio utilizzando campioni il cui genotipo è stato stabilito da altre procedure a base molecolare.
- Si raccomanda espressamente all'utente di attenersi a tutte le indicazioni riportate nell'etichettatura del prodotto. Eventuali difformità rispetto alla procedura descritta non sono consigliate, potrebbero non essere supportate e potrebbero determinare errori di tipizzazione.
- Si raccomanda di prevedere un controllo positivo (DNA umano) e un controllo negativo/no template control (NTC) (utilizzando acqua sterile al posto del DNA) in ogni processo di preparazione della libreria. Il controllo positivo deve

produrre una libreria quantificabile (misurata da Qubit o dalla metrica di copertura del sequenziamento) e la sequenza risultante deve essere coincidente con il genotipo atteso del campione. Non deve esserci una libreria quantificabile (misurata tramite QuBit o segnalata come Bassa Copertura nell'Assign) nel controllo negativo template per ogni esperimento. Se viene prodotta una libreria quantificabile per il no template control, l'esecuzione deve essere ripetuta.

- Il saggio AlloSeq Tx sequenzia frammenti di DNA con una dimensione media dell'inserito di 500bp, il che significa che i polimorfismi superiori a 500bp non possono essere scaglionati; ciò può causare ambiguità eterozigoti.

1.6 Requisiti campione

DNA genomico umano ad alto peso molecolare (sospeso in buffer Tris/EDTA e $OD_{260/280} > 1,8$) estratto da campioni di sangue intero anti-coagulato ACD o EDTA. NON utilizzare campioni di sangue intero contenenti eparina. Questo metodo può essere utilizzato anche sul DNA del tampone buccale.

Importante: Tutti i riferimenti al DNA del tampone buccale nel presente documento sono da intendersi solo per Uso esclusivo di ricerca. **Il DNA del tampone buccale non è stato validato con questo metodo per uso diagnostico.**

1.7 Sostanze interferenti

CareDx Pty Ltd ha identificato tutte le sostanze potenzialmente interferenti conosciute che potrebbero avere un impatto sul test. Vedere la tabella sottostante.

Inibitore	Fonte potenziale	Rischio	Osservazioni
EDTA	Buffer TE, provette per la raccolta del sangue	Molto basso	DNA ri-sospeso in Tris-HCl pH8 o TE con <1mM EDTA. Utilizzare kit di preparazione in commercio DNA Blood e/o evitare di utilizzare le provette per la raccolta del sangue EDTA
Alcoli	Etanolo, isopropanolo, alcool isoamilico	Basso	Assicurarsi che i pellet o le bead di DNA siano lasciati asciugare all'aria e ispezionati visivamente per individuare la presenza di goccioline di etanolo (1% di etanolo = 1,25 ul 80% di etanolo in reazione PCR a 100 ul). Sono previste più fasi di lavaggio di etanolo all'80% nel protocollo AlloSeq Tx; ciò implica che l'inibizione dovuta al carry-over di etanolo comporta un rischio basso ma leggermente più elevato rispetto ad altri fattori.
Sali in eccesso	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Molto basso	Provvedere a un lavaggio accurato dei pellet di DNA o delle bead con etanolo all'80%. Provvedere affinché l'assorbanza (OD) 230/260 per il DNA genomico di partenza sia ~2
Sali caotropici	Cloruro di guanidinio; Cloruro di magnesio; urea	Molto basso	Provvedere a un lavaggio accurato dei pellet di DNA o delle bead con etanolo all'80%. Provvedere affinché l'assorbanza (OD) 230/260 per il DNA genomico di partenza sia ~2
Fenolo-Cloroformio	Carry-over organico	Molto basso	Un componente della procedura di estrazione in commercio Trizol DNA. Provvedere a un lavaggio accurato dei pellet di DNA o delle bead con etanolo all'80%. Provvedere affinché l'assorbanza (OD) 230/260 per il DNA genomico di partenza sia ~2
Proteine	BSA, PEG, albumina sierica	Molto basso	Utilizzare i kit di preparazione in commercio Blood DNA Provvedere affinché l'assorbanza (OD) 260/280 del DNA genomico di partenza sia > 1,8

Inibitore	Fonte potenziale	Rischio	Osservazioni
Eme, emoglobina, immunoglobuline	Sangue	Molto basso	Evitare di utilizzare campioni di sangue che evidenzino un'emolisi grossolana. Utilizzare i kit di preparazione in commercio Blood DNA Provvedere affinché l'assorbanza (OD) 260/280 del DNA genomico di partenza sia > 1,8
Detergenti/DDT	Sodio desossicolato, sarkosyl, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, N-ottil glucoside	Molto basso	Provvedere a un lavaggio accurato dei pellet di DNA o delle bead con etanolo all'80%. Provvedere affinché l'assorbanza (OD) 230/260 del DNA genomico di partenza sia ~2
Proteasi	Proteinasi K, manipolazione del campione	Molto basso	Utilizzare i kit di preparazione in commercio Blood DNA o Saliva DNA. Indossare sempre i guanti
Nucleasi	Manipolazione del campione, enzimi di restrizione, nucleasi micrococcica	Molto basso	Utilizzare i kit di preparazione in commercio Blood DNA Indossare sempre i guanti
DNA/RNA esogeno	Carry-over, contaminazione	Molto basso	Preparare il DNA genomico in un'area dedicata pre-PCR
Carrier	RNA, eparina, glicogeno	Molto basso	Utilizzare kit di preparazione in commercio DNA Blood e/o evitare di utilizzare le provette per la raccolta di sangue con eparina
Ioni metallici in eccesso	Mg2+ dal buffer PCR, ioni Fe	Molto basso	Provvedere a un lavaggio accurato dei pellet di DNA o delle bead con etanolo all'80%. Provvedere affinché l'assorbanza (OD) 230/260 del DNA genomico di partenza sia ~2
Farmaci antivirali (ad es. aciclovir)	Sangue	Molto basso	Utilizzare i kit di preparazione in commercio Blood DNA Provvedere affinché l'assorbanza (OD) 260/280 del DNA genomico di partenza sia > 1,8
Polvere dei guanti	Guanti con polvere	Molto basso	Utilizzare guanti che non contengano polvere
Provette PCR irradiate da raggi UV	Trattamento UV di provette PCR	Molto basso	Evitare di trattare i componenti in plastica con i raggi UV
Biotina	Da farmaci che interagiscono con la streptavidina	Molto basso	Tra la raccolta del campione e la fase di cattura ibrida sono stati previsti, nel protocollo, numerosi lavaggi di purificazione che consentiranno la rimozione delle molecole di biotina. In caso di un saggio di cattura ibrida, la presenza di biotina (che, come sottolineato in precedenza, è improbabile) non comporterà il verificarsi di un risultato errato. Potrebbe causare una ridotta efficacia dell'arricchimento che verrebbe rilevata come un basso rendimento di arricchimento o non darebbe alcun risultato.

1.8 Caratteristiche di performance

Le performance del saggio sono state valutate utilizzando un panel di campioni di DNA con genotipi noti, inclusi campioni di controllo interno CareDx, International Histocompatibility Workshops (IHW) HLA Reference Standards e

campioni ottenuti dall'International HLA DNA Exchange, Università della California, Los Angeles (UCLA). La preparazione della libreria, l'arricchimento e le performance di sequenziamento sono state valutate in base a criteri di ammissibilità definiti.

1.9 Accuratezza

Il prodotto AlloSeq Tx unitamente al software AlloSeq Assign sono progettati per essere conformi allo standard ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) e allo standard EFI (European Federation of Immunogenetics) per la tipizzazione HLA.

Negli studi di verifica e convalida, il prodotto AlloSeq Tx e il software AlloSeq Assign insieme sono stati impiegati per accertare la concordanza di genotipizzazione con campioni tipizzati utilizzando un metodo alternativo. I campioni di controllo interno sono stati tipizzati utilizzando la tipizzazione basata sulla sequenza (SBT). I campioni provenienti dalle banche dati riconosciute a livello internazionale IHW e UCLA sono stati utilizzati come parte degli studi di verifica e sono stati tipizzati utilizzando varie metodiche, tra le quali SBT, SSP e SSO. Si tratta di campioni di DNA caratterizzati che rappresentano gli alleli HLA più diffusi e alleli rari selezionati.

Sintesi dei risultati ottenuti dagli studi di Verifica e Validazione:

METRICA	PANEL	DIMENSIONE DEL PANEL (n)	RISULTATO
Concordanza di genotipizzazione	Interno	190	100%
Concordanza di genotipizzazione	UCLA	24	98,12%
Concordanza di genotipizzazione	IHW	48	98,06%
Concordanza di genotipizzazione	Siti Test Beta	124	99,54%
Concordanza totale/complessiva			99,49%

In tutti i casi di discordanza osservati negli studi di verifica/validazione, si ritiene che la discordanza derivi dalle limitazioni della precedente metodologia o tecnologia di tipizzazione.

1.10 Specificità

La specificità nel contesto dei saggi AlloSeq Tx descrive la percentuale di sequenze lette (rappresentanti i frammenti di DNA catturati dal saggio) che mappano su loci diversi dai loci target. Tutti i saggi di tipizzazione HLA che si basano su una qualche forma di ibridazione tra DNA genomico e reagenti di sequenza oligo-nucleotidica, indipendentemente dal fatto che si tratti di PCR o di saggi di cattura ibrida, avranno un elemento di "mancanza" di specificità. Ciò è una conseguenza del fatto che molti geni del genoma umano fanno parte di famiglie multigeniche. I geni HLA non differiscono. HLA-A, -B e -C fanno parte della famiglia di geni HLA di classe 1. Tuttavia, oltre ai geni ben noti, esistono anche pseudogeni HLA, frammenti di geni e possibili geni funzionali non descritti che possono essere catturati dalle caratteristiche di specificità intrinseche dei saggi di cattura ibrida. Il numero complessivo di tali geni non è noto, ma varia da un genoma all'altro di individui diversi.

Per AlloSeq Tx, la specificità è catturata dalle "letture fuori target". Lo scopo del saggio AlloSeq Tx è conseguire un livello di specificità per cui;

1. Le letture non specifiche NON risultano in letture target che risultano essere in numero insufficiente per eseguire un'accurata genotipizzazione,
2. Le letture non specifiche NON contribuiscono alla sequenza di consenso dei loci target,

3. Un'elevata specificità compromette la sensibilità e talune regioni di alcuni alleli non vengono catturate.

AlloSeq Assign è in grado di identificare letture non specifiche/fuori target e di rappresentarle in relazione al numero totale di letture catturate. Questi dati sono utilizzati come metrica di controllo qualità per le performance del saggio. Una specificità troppo alta o troppo bassa può indicare temperature di ibridazione, tempistiche, problemi legati alla qualità del reagente e della sonda non conformi.

I dati di verifica hanno evidenziato che la specificità fino al 12% non ha alcun impatto sul saggio, mentre i valori tipici di specificità sono compresi tra il 64 e il 92%. Una specificità assoluta è improbabile e sarebbe un indicatore di potenziali problemi di qualità. Mentre la strategia di progettazione della sonda rende inverosimile la probabilità che manchino gli alleli, è probabile che il paradigma sensibilità vs specificità rimanga invariato. Vale a dire, un certo grado di specificità ridotta garantirà una sensibilità completa e gli alleli, inclusi i nuovi alleli, saranno sequenziati con successo.

1.11 Riproducibilità e Ripetibilità

Il prodotto AlloSeq Tx unitamente al software AlloSeq Assign ha dimostrato di fornire risultati equivalenti tra lotti in uno studio di verifica da lotto-a-lotto e tra laboratori, utenti e strumenti comprovati in fase di verifica e validazione in quattro siti esterni. A seguito di verifiche, è stato dimostrato che il prodotto AlloSeq Tx fornisce risultati equivalenti per lo stesso campione in esecuzioni ripetute.

1.12 Limite di rilevamento

La quantità raccomandata di DNA genomico umano ad alto peso molecolare è di 100-1000 ng/μl. Test interni hanno evidenziato che possono essere utilizzati anche campioni con input DNA fino a 50 ng/μl. I genotipi corretti sono stati ottenuti anche da DNA di scarsa qualità o "tagliato".

1.13 Presupposti

- Gli strumenti sono adeguatamente calibrati, gestiti e sottoposti a un piano di manutenzione conforme alle prescrizioni.
- Le Procedure Operative Standard (SOP) sono applicate e sottoposte a controllo.
- Il kit è destinato ad essere utilizzato da personale di laboratorio formato e autorizzato
- I reagenti vanno utilizzati entro le date di scadenza indicate.
- I reagenti di diversi lotti di kit NON devono essere utilizzati congiuntamente. Tale operazione può influire sulle prestazioni del kit
- Sono utilizzati solo i reagenti registrati come non contemplati ma richiesti nel presente documento.
- Si pone particolare attenzione nel prevenire la contaminazione incrociata dei campioni di DNA o errori di miscelazione dei campioni.
- Si pone particolare attenzione in tutte le fasi di esercizio al fine di evitare sversamenti.
- I fogli di lavoro forniti dal produttore sono utilizzati in combinazione con questo documento

1.14 Sicurezza

Osservare le prassi di sicurezza standard di laboratorio e le prassi di prevenzione anti-contaminanti in camera bianca quando si esegue questa procedura. Grazie al processo di gestione del rischio adottato da CareDx Pty Ltd, tutti i rischi sono stati mitigati fino a raggiungere una soglia accettabile. È obbligatorio seguire le Istruzioni per l'uso, compresi i fogli di lavoro in dotazione, per evitare scenari d'uso potenzialmente pericolosi. In questo kit sono presenti sostanze pericolose. Consultare le schede dei dati di sicurezza e adottare tutte le precauzioni necessarie per la manipolazione e lo smaltimento.

COMPONENTI DEL KIT	SIMBOLI/PITTOGRAMMI	AVVERTENZA DI SICUREZZA
<p>TAGMENTATION BUFFER Contiene N, N-dimetilformammide</p>		<p>Tipo di avvertenza: Pericolo</p> <p>Indicazioni di pericolo: H319 - Provoca grave irritazione oculare H332 - Nocivo se inalato H350 – Può provocare il cancro H360 – Può nuocere alla fertilità o al feto</p> <p>Consigli di prudenza- UE (Articolo 28, 1272/2008) P201 - Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso P202 - Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze P261 - Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol P270 - Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso P264 - Lavare accuratamente il viso, le mani e la pelle eventualmente esposta dopo la manipolazione P272 - Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro P308 + P313 - In caso di esposizione o di possibile esposizione: contattare un medico/richiedere assistenza medica P304 + P340 - IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in una posizione che favorisca la respirazione P313 - Contattare un medico/richiedere assistenza medica P305 + P351 + P338 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare P337 + P313 - Se l'irritazione degli occhi persiste: contattare un medico/richiedere assistenza medica P405 - Conservare sotto chiave P501 - Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento rifiuti autorizzato</p>
<p>PCR MIX Contiene Cloruro di tetrametilammonio</p>		<p>Tipo di avvertenza Pericolo</p> <p>Indicazioni di pericolo H302 – Nocivo per ingestione H371 – Può provocare danni agli organi H412 – Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata</p> <p>Consigli di prudenza- UE (Articolo 28, 1272/2008) P260 - Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol P270 - Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso P264 - Lavare accuratamente il viso, le mani e la pelle eventualmente esposta dopo la manipolazione P272 - Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro P273 - Non disperdere nell'ambiente P308 + P313 - In caso di esposizione o di possibile esposizione: contattare un medico/richiedere assistenza medica P301 + P312 - IN CASO DI INGESTIONE: in presenza di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico P330 - Sciacquare la bocca P405 - Conservare sotto chiave</p>

COMPONENTI DEL KIT	SIMBOLI/PITTOGRAMMI	AVVERTENZA DI SICUREZZA
<p>2N NaOH Contiene idrossido di sodio</p>		<p>P501 - Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento rifiuti autorizzato</p> <p>Tipo di avvertenza Pericolo</p> <p>Indicazioni di pericolo H314 – Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari H318 – Provoca gravi lesioni oculari</p> <p>Consigli di prudenza- UE (Articolo 28, 1272/2008) P260 - Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol P264 - Lavare accuratamente il viso, le mani e la pelle eventualmente esposta dopo la manipolazione P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso P301 + P330 + P331 - IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito P303 + P361 + P353 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia P363 - Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente P310 - Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico P304 + P340 - IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'fortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in una posizione che favorisca la respirazione P305 + P351 + P338 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare P405 - Conservare sotto chiave P501 - Smaltire il contenuto/recipiente in conformità con le normative locali, regionali, nazionali e internazionali applicabili</p>
<p>CAPTURE BEADS Contiene Formammide</p>		<p>Tipo di avvertenza Pericolo</p> <p>Indicazioni di pericolo H351 – Sospettato di provocare il cancro. H360 – Può nuocere alla fertilità o al feto H373 - Può provocare danni agli organi in caso di esposizione prolungata o ripetuta</p> <p>Consigli di prudenza- UE (Articolo 28, 1272/2008) P201 - Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso P202 - Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze P260 - Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol P270 - Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso P264 - Lavare accuratamente il viso, le mani e la pelle eventualmente esposta dopo la manipolazione P272 - Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro P308 + P313 - In caso di esposizione o di possibile esposizione: contattare un medico/richiedere assistenza medica P405 - Conservare sotto chiave P501 - Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento rifiuti autorizzato</p>

COMPONENTI DEL KIT	SIMBOLI/PITTOGRAMMI	AVVERTENZA DI SICUREZZA
<p>HYBRIDISATION BUFFER 1 Contiene Formammide</p>		<p>Tipo di avvertenza Pericolo</p> <p>Indicazioni di pericolo H351 – Sospettato di provocare il cancro. H360 – Può nuocere alla fertilità o al feto</p> <p>Consigli di prudenza- UE (Articolo 28, 1272/2008) P201 - Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso P202 - Non manipolare prima di avere letto e compreso tutte le avvertenze P261 - Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol P270 - Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso P264 - Lavare accuratamente il viso, le mani e la pelle eventualmente esposta dopo la manipolazione P272 - Gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro P308 + P313 - In caso di esposizione o di possibile esposizione: contattare un medico/richiedere assistenza medica P405 - Conservare sotto chiave P501 - Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto di smaltimento rifiuti autorizzato</p>
<p>STOP BUFFER Contiene Sodio Dodecil Solfato</p>		<p>Parola segnale Avvertenza</p> <p>Indicazioni di pericolo H319 - Provoca grave irritazione oculare</p> <p>Consigli di prudenza- UE (Articolo 28, 1272/2008) P264 - Lavare accuratamente il viso, le mani e la pelle eventualmente esposta dopo la manipolazione P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso P305 + P351 + P338 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare P337 + P313 - Se l'irritazione degli occhi persiste: contattare un medico/richiedere assistenza medica</p>

NOTA: Il componente "Purification Beads" contiene azoturo di sodio (<0,1%) che non è considerato in una concentrazione pericolosa ai sensi del regolamento CE 1272/2008 (CLP/GHS), delle direttive CE 1999/45EC e 67/548/CEE o US-OSHA (HCS 29 CFR 1910.1200) e delle raccomandazioni GHS delle Nazioni Unite.

Per ulteriori informazioni su tutti i materiali pericolosi contenuti nel kit AlloSeq Tx, consultare la scheda dei dati di sicurezza TEC478_AlloSeq Tx all'indirizzo Web <http://www.caredx.com>.

2. Preparazione della Libreria (flusso di lavoro Early Pooling)

2.0 Introduzione al protocollo

- Attenersi al protocollo AlloSeq Tx riportato di seguito nell'ordine indicato utilizzando i parametri specificati.
- Prima di procedere, controllare il contenuto del kit e assicurarsi di disporre dei materiali consumabili e delle attrezzature necessarie.
- Per una maggiore semplicità operativa, le fasi procedurali di Preparazione della Libreria sono inoltre illustrate in dettaglio nel documento *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. I riferimenti al foglio di lavoro nel capitolo 2 attengono a tale foglio di lavoro.

2.1 Preparazione del campione

1. Inserire un ID esperimento, una descrizione, un operatore e la data nel foglio di lavoro.
2. Selezionare il set sonda AlloSeq da utilizzare per l'esperimento dal menu a tendina nel foglio di lavoro.
3. Selezionare il tipo di sequenziatore da utilizzare dal menu a tendina nel foglio di lavoro. Dopo aver selezionato il tipo di sequenziatore, le istruzioni di sequenziamento saranno visualizzate nel foglio di lavoro.
4. Inserire l'ID dei campioni da testare nella sezione gialla del layout della piastra nel foglio di lavoro, in base alla configurazione desiderata.

NOTA: Possono essere inseriti solo caratteri alfanumerici. Gli ID dei campioni duplicati saranno contrassegnati in rosso per sollecitare l'utente a correggerli. È un requisito del software del sequenziatore avere solo ID di campioni unici su una corsa. Non inserire alcuna informazione relativa ai pozzetti che non sono destinati a contenere alcun campione.

5. Selezionare la serie di indici desiderata dal menu a tendina arancione presente sotto Configurazione Piastra.
6. Se necessario e utilizzando il formato indice provettato, l'ordine dell'indice i7 può essere modificato, selezionare l'indice i7 alternativo da utilizzare dal menu a tendina Opzioni per la colonna richiesta. Se sono selezionati indici i7 duplicati, le celle saranno contrassegnate in rosso per sollecitare l'utente a correggerle.
7. Se necessario e utilizzando il formato indice provettato, l'ordine dell'indice i5 può essere modificato, selezionare l'indice i5 alternativo da utilizzare dal menu a tendina Opzioni per la riga richiesta. Se sono selezionati indici i5 duplicati, le celle saranno contrassegnate in rosso per sollecitare l'utente a correggerle.
8. Completate tutte le azioni descritte in precedenza, fare clic sulla scheda 1.2 SampleSheet e ricontrollare. La dicitura in rosso sarà utilizzata per contrassegnare dove le informazioni sono ancora indispensabili. Se non compare alcuna dicitura in rosso, è possibile salvare la scheda SampleSheet come CSV (Comma delimited) (*.csv). Salvare il file come "SampleSheet.csv". Il salvataggio in formato csv salverà solo la scheda attiva. Aprire il file SampleSheet.csv salvato in excel e cancellare tutte le righe vuote nella tabella [Dati], ovvero tutte le righe comprese tra 22 e 117 che non contengono informazioni sul campione. Effettuato tale operazione, salvare il file. Il foglio campione è dunque disponibile ad essere importato per il sequenziamento su un sequenziatore Illumina.

2.2 Preparazione della libreria

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per campione (µl)	Preparazione richiesta
Tagmentation Buffer	da -15 °C a -25 °C BOX 1	10	Portare a temperatura ambiente.
Acqua sterile	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	30	Non è necessaria alcuna preparazione.
Tagmentation Beads	da -15 °C a -25 °C BOX 1	10	Portare a temperatura ambiente, per almeno 30 minuti.
Stop Buffer	da 15 °C a 30 °C BOX 2	10	Non è necessaria alcuna preparazione.
Tagmentation Wash Buffer	da 15 °C a 30 °C BOX 2	300	Non è necessaria alcuna preparazione.
PCR Mix	da -15 °C a -25 °C BOX 4	20	Scongelare e conservare su ghiaccio. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.
Indici: 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: 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: H510, H511, H513, H522, H515, H516, H518, H520, H716, H718, H719, H720, H721, H722, H723, H724, H726, H727, H728, H729	da -15 °C a -25 °C BOX 3	20	Scongelare e conservare su ghiaccio.

- Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
- Preparare la piastra a mezzo bordo da 96 pozzetti, il Microseal B e le provette per microcentrifuga da 1,5 ml.

NOTA: non esiste un punto di arresto sicuro fino alla PCR di indicizzazione. Il processo richiede circa **1 ora e 50 minuti** (inclusi 50 min di termociclaggio PCR).

- Per ogni campione di DNA, dosare 10 µl di campione 10-100 ng/µl nel pozzetto appropriato di una piastra PCR in base al layout piastra sul foglio 1.0 Sample_Prep.
- Preparare 40 µl di Tagmentation Master Mix per campione utilizzando: 10 µl di Tagmentation Buffer, 20 µl di acqua sterile e 10 µl di Tagmentation Beads.
- Miscelare il master mix di cui sopra tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi.
- Pipettare 40 µl di Tagmentation Master Mix in ogni pozzetto che contiene un campione DNA.

8. Sigillare la piastra con la pellicola Microseal B.
9. Centrifugare la piastra a 100 x g per 10 secondi per raccogliere tutti i reagenti sul fondo del pozzetto.
10. Usare lo shaker per piastre per miscelare a 1800 giri al minuto per 1 minuto.
11. Ispezionare visivamente la piastra:
 - a) Se le bead non sono distribuite uniformemente nel pozzetto, ripetere l'operazione di scuotimento come al punto 10,
 - b) Se il materiale non è sul fondo del pozzetto o è schizzato sulla pellicola Microseal B, centrifugare a impulsi e ripetere la fase 10 di scuotimento.
12. Posizionare la piastra nel termociclatore ed eseguire il programma di tagmentazione utilizzando il coperchio riscaldato a 105 °C, e il volume di reazione 50 µl:

Temperatura	Durata
55 °C	5 minuti
10 °C	2 minuti

13. Una volta terminato il programma, rimuovere immediatamente la piastra dal termociclatore e lasciarla a temperatura ambiente per 2 minuti.
14. Rimuovere la pellicola Microseal B.
15. Aggiungere 10 µl di Stop Buffer.
16. Sigillare nuovamente la piastra con una nuova pellicola Microseal B.
17. Usare lo scuotitore per piastre per miscelare a 1800 giri al minuto per 1 minuto.
18. Incubare la piastra per ulteriori 5 minuti a temperatura ambiente.
19. Durante l'incubazione rimuovere il PCR Mix e gli indici dal congelatore per scongelarli; successivamente posizzarli su un rack porta-provette refrigerato/su ghiaccio.
20. Ispezionare visivamente la piastra, se il materiale non si trova sul fondo del pozzetto o è schizzato sulla pellicola Microseal B, centrifugare la piastra a impulsi.
21. Lavare tre volte con il Tagmentation Wash Buffer come descritto di seguito:
 - a) Rimuovere la pellicola Microseal B e posizionare la piastra sul Supporto Magnetico 96 per 30 secondi, permettendo alle bead di raccogliersi nei pozzetti adiacenti al magnete.
 - b) Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare il surnatante, lasciando le bead nei pozzetti adiacenti al magnete,
 - c) Aggiungere lentamente 100 µl di Tagmentation Wash Buffer in ogni pozzetto,
 - d) Sigillare nuovamente la piastra con una nuova pellicola Microseal B; assicurarsi che sia correttamente fissata,
 - e) Usare lo scuotitore per piastre per miscelare a 1800 giri al minuto per 2 minuti a temperatura ambiente.
 - f) **ATTENZIONE:** se i campioni sono schizzati sulla pellicola, centrifugare a 100 x g per 10 secondi prima di rimuoverla,
 - g) Ripetere le fasi da a) a f) altre due volte per un totale di 3 lavaggi.

NOTA: prima di scartare il supernatante del terzo lavaggio, preparare il master mix PCR come descritto di seguito.

22. Preparare 40 µl di master mix PCR utilizzando 20 µl di Acqua Sterile e 20 µl di PCR Mix. (o PCR Mix-1 se si utilizzano kit test da 96).

NOTA: PCR Mix è utilizzato per i passaggi successivi nel protocollo. Non scartare questa fiala.

23. Rimuovere la pellicola Microseal B e posizionare la piastra sul Supporto Magnetico 96 per 30 minuti, permettendo alle bead di raccogliersi nei pozzetti adiacenti al magnete.
24. Utilizzando una pipetta impostata a 100 µl, aspirare e scartare il supernatante dal Tagmentation Wash finale.
25. Rimuovere la piastra dal supporto magnetico.
26. Aggiungere 40 µl di master mix PCR in ogni pozzetto.
27. Sigillare la piastra con la pellicola Microseal B.
28. Usare lo scuotitore per piastre per miscelare a 1800 giri al minuto per 2 minuti a temperatura ambiente.
29. Centrifugare la piastra a 100 x g per 10 secondi affinché tutte le bead siano sospese nel master mix PCR.

Per indici in tubi (T)

30. (T) Vortexare e centrifugare a impulsi le provette indice per garantire che tutto il volume sia concentrato nella parte inferiore della provetta.
31. (T) Rimuovere la pellicola Microseal B dalla piastra campione.
32. Aggiungere 5 µl dell'indice i7 in ogni pozzetto, in base al layout piastra sul foglio 1.0 Sample_Prep.
33. Aggiungere 5 µl dell'indice i5 in ogni pozzetto, in base al layout piastra sul foglio 1.0 Sample_Prep.
Riprendere dal passaggio 34.

Per indici in piastra (P)

30. (P) Usare uno shaker per piastre per miscelare la piastra indice a 1800 giri al minuto per 1 minuto.
31. (P) Centrifugare la piastra indice a 100 x g per 10 secondi per assicurarsi che tutto il volume sia sul fondo del pozzetto.
32. (P) Rimuovere la pellicola Microseal B dalla piastra campione.
33. (P) **Confermare l'orientamento corretto della piastra e il set di indice corretto. Non staccare il rivestimento sigillante.** Perforare con un puntale il rivestimento sigillante della piastra indice. Servendosi di un nuovo puntale, trasferire 10 µl degli indici combinati dalla piastra indice a ciascun pozzetto campione, conformemente al layout piastra sul foglio 1.0 Sample_Prep.
Riprendere dal passaggio 34.
34. Sigillare con una nuova pellicola Microseal B.
35. Usare lo shaker per piastre per miscelare a 1800 giri al minuto per 1 minuto a temperatura ambiente.
36. Centrifugare la piastra a 100 x g per 10 secondi per raccogliere tutti i reagenti sul fondo del pozzetto. Ispezionare visivamente per assicurarsi che le bead siano ancora uniformemente distribuite nella soluzione. Se le bead non sono distribuite uniformemente, ripetere l'operazione di scuotimento come al punto 35,
37. Posizionare la piastra nel termociclatore ed eseguire il programma PCR di indicizzazione utilizzando il coperchio riscaldato a 105 °C e il volume di reazione 50 µl:

N.	Fase	Temperatura	Durata	Numero di cicli
1	Riempimento dei vuoti	72 °C	3 minuti	1
2	Denaturazione iniziale	98 °C	3 minuti	1
3	Denaturazione	98 °C	20 secondi	9
4	Appaiamento	60 °C	30 secondi	
5	Amplificazione	72 °C	3 minuti	
6	Amplificazione finale	72 °C	3 minuti	1
7	Sospensione finale	10 °C	Sospensione	1

NOTA: punto di arresto sicuro. Le librerie possono essere conservate da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 settimana.

NOTA: se si procede immediatamente alla selezione dimensione e alla purificazione, assicurarsi che le Purification Beads siano ricondotte a temperatura ambiente prima di utilizzarle.

2.3 Selezione dimensione e purificazione

1. Al fine di ottenere una resa e una selezione delle dimensioni ottimali, il volume del campione, delle bead e del surnatante viene modificato in funzione delle caratteristiche della corsa. La tabella sottostante delinea i volumi testati per il range specificato di campioni per corsa.

Volumi Reagenti per i Calcoli	6 - 24 Campioni/Pool	25 - 48 Campioni/Pool	49 - 96 Campioni/Pool
Numero di campioni da raggruppare (max. elencati per range)	24	48	96
Volume della libreria da raggruppare per campione (µl)	10	5	2.5
Volume delle bead diluite per campione (µl)	50	25	12.5
Volume di trasferimento del surnatante per campione (µl)	55	27.5	13.75
Volume delle bead pulite per campione, fase 8 (µl)	4.4	2.2	1.1

2. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per campione (µl)	Preparazione richiesta
Purification Beads (Purification Beads – 1 per kit test da 96)	da 2 °C a 8 °C BOX 5	24.7	Portare a temperatura ambiente, per almeno 30 minuti. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.
Acqua sterile	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	Variabile	Non è necessaria alcuna preparazione.
Etanolo al 100%	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	1920	Preparare etanolo all'80%, come descritto di seguito.
Resuspension Buffer	da 2 °C a 8 °C BOX 5	Variabile	Portare a temperatura ambiente. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.

- Preparare le Purification Beads diluite con Purification Beads e acqua sterile utilizzando i volumi calcolati da *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. Assicurarsi che le Purification Beads siano vortexate accuratamente prima dell'uso.
- Preparare 2400 µl di Etanolo fresco all'80% per campione, sufficiente per 2 lavaggi, utilizzando 1920 µl di Etanolo al 100% e 480 µl di Acqua Sterile.

NOTA: Il numero di pool per esperimento è preimpostato a 1 nella cella gialla nel passaggio 3 del foglio di lavoro. Questo valore può essere sovrascritto manualmente se necessario. La modifica di questa cella attualizzerà il numero di pool per i passaggi successivi di questo protocollo/foglio di lavoro. Se in questo esperimento devono essere eseguiti più di 1 pool con lo stesso numero di campioni per pool, il volume delle Purification Beads deve essere, di conseguenza, aumentato (cioè, raddoppiato per due pool) e le istruzioni riportate di seguito devono essere rispettate integralmente per ogni pool. Se sono richiesti pool multipli con un numero diverso di campioni, questa scheda nel foglio di lavoro dovrebbe essere duplicata e le celle in giallo aggiornate in modo tale da riflettere il numero di campioni, cosicché i volumi di reagente richiesti/trasferiti siano regolati adeguatamente. Per duplicare la scheda, fare clic con il pulsante destro del mouse su una qualsiasi scheda e selezionare "Move or Copy", selezionare "3.0 SS_Purification" dall'elenco, spuntare la casella "Create Copy" e fare clic su "OK".

- Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
- Prelevare le provette da 1,5 ml (**Opzionale:** se si preferisce, si possono utilizzare provette da 2 ml con aumento del volume di lavaggio con etanolo da 1200 µl a 1500 µl nel passaggio 20a riportato di seguito).

NOTA: il processo richiede approssimativamente 1 ora.

7. Dosare 50 µl di Purification Beads diluite nella provetta da 1,5 ml, **per campione**.
8. Pipettare la miscela di Tagmentation beads e il surnatante **oppure** shakerare la piastra PCR di indicizzazione per 1 minuto a 1800 giri al minuto, dopodiché aggiungere 10 µl di ciascun campione alla provetta contenente le Purification Beads diluite.
9. Vortexare ogni provetta ad alta velocità per 10 secondi fino a che il campione appare omogeneo all'ispezione visiva.
10. Incubare la provetta per 5 minuti a temperatura ambiente. Durante questa incubazione, si legano i frammenti più grandi alle bead.
11. Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
12. Posizionare la provetta sul magnete per 2 minuti e 30 secondi, permettendo alle bead di compattarsi contro il magnete stesso. Se il surnatante risulta torbido, è necessario che rimanga sul magnete fino a quando non si è chiarificato.
13. **Trasferire** 55 µl del surnatante in una nuova provetta, **per campione**.
14. Aggiungere 4,4 µl di Purification Beads (non diluite) alla provetta contenente il surnatante, **per campione**.
15. Vortexare ogni provetta ad alta velocità per 10 secondi.
16. Incubare la provetta per 5 minuti a temperatura ambiente. Durante questa incubazione si legano i frammenti target dimensionati alle bead.
17. Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
18. Posizionare la provetta sul magnete per 2 minuti e 30 secondi, permettendo alle bead di compattarsi contro il magnete. Se il surnatante risulta torbido, è necessario che rimanga sul magnete fino a quando non si è chiarificato.
19. Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare il surnatante, senza toccare le bead.
20. Tenendo la provetta sul magnete, lavare due volte con etanolo all'80%:
 - A) Aggiungere 1200 µl di etanolo all'80% ad ogni provetta,
 - b) Incubare a temperatura ambiente per 30 secondi,
 - c) Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare tutto il surnatante,
 - d) Ripetere le fasi da a) a c) per un totale di 2 lavaggi.
21. Rimuovere tutto il surnatante rimanente con la pipetta P20.
22. Lasciare asciugare all'aria la provetta per 5 minuti a temperatura ambiente, in modo tale da consentire l'evaporazione dell'etanolo residuo.
23. Rimuovere la provetta dal magnete e aggiungere 37 µl di Resuspension Buffer ad ogni provetta per eluire i frammenti target.
24. Vortexare ogni provetta ad alta velocità per 10 secondi.
25. Incubare la provetta per 5 minuti a temperatura ambiente.
26. Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
27. Posizionare la provetta su un magnete per 30 secondi, permettendo alle bead di raccogliersi nella provetta accanto al magnete.
28. **Trasferire** 35 µl di surnatante in una nuova provetta da 1,5 ml a scopo conservativo. Questo pool può continuare fino all'ibridazione.

NOTA: punto di arresto sicuro. Le librerie possono essere conservate da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 mese.

2.4 Quantificazione QuBit (opzionale)

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per campione (µl)	Preparazione richiesta
Qubit BR buffer	da -25 °C a 30 °C Fornito dall'utente	199	Non è necessaria alcuna preparazione.
Qubit BR dye	da -25 °C a 30 °C Fornito dall'utente	1	Non è necessaria alcuna preparazione.
BR Standard n.1	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	10	Portare a temperatura ambiente.
BR Standard n.2	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	10	Portare a temperatura ambiente.

- Prelevare le provette Qubit necessarie e le provette da 1,5 ml o 5 ml al fine di preparare la soluzione di lavoro, a seconda del volume richiesto.
- Configurare due provette di saggio per gli standard e una per ogni campione.
- Preparare la soluzione di lavoro Qubit da 200 µl utilizzando 199 µl di QuBit buffer e 1 µl di QuBit dye per campione/standard da quantificare.
- Vortexare la soluzione di lavoro per 2-3 secondi, e poi centrifugare ad impulsi.
- Dispensare **190 µl** di soluzione di lavoro in ciascuna delle provette Standard.
- Dispensare **198 µl** di soluzione di lavoro in ciascuna delle provette Campione.
- Aggiungere **10 µl** di soluzione Standard in ciascuna delle rispettive provette Standard.
- Aggiungere **2 µl** di ciascun campione nella rispettiva provetta.
- Vortexare tutte le provette per 2-3 secondi e poi centrifugare ad impulsi.
- Incubare le provette per 2 minuti a temperatura ambiente.
- Inserire le provette nel Fluorimetro Qubit ed eseguire le letture (vedere il protocollo del produttore Qubit per ulteriori informazioni).
- Registrare le letture Qubit nella tabella del foglio di lavoro al fine di calcolare la media per campione.

NOTA: la resa prevista della biblioteca è di circa 30 ng/µL ma può variare a seconda della qualità del DNA e numero di campioni. Una resa di 10 ng/µL o superiore ci si attende che garantisca risultati soddisfacenti in termini di arricchimento.

2.5 Visualizzazione TapeStation (Opzionale)

NOTA: Sistemi alternativi per la visualizzazione del frammento, come Fragment Analyzer, Bioanalyzer o similari, possono essere utilizzati dopo la validazione da parte dell'utente.

- Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per campione (µl)	Preparazione richiesta
Ladder D1000	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	1	Portare a temperatura ambiente.
D1000 Sample Buffer	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	3	Portare a temperatura ambiente.

- Prelevare lo ScreenTape necessario, le strisce ottiche della provetta TapeStation e i tappi.
- Trasferire 1 µl di ogni libreria pre-arricchita in una nuova provetta.
- Aggiungere 1 µl di Ladder D1000 in una provetta di riferimento.

5. Aggiungere 3 µl di D1000 sample buffer ad ogni provetta campione e provetta di riferimento.
6. Sigillare tutte le provette con i tappi.
7. Vortexare accuratamente tutte le provette utilizzando il vortex IKA a 2000 rpm per 1 minuto.
8. Centrifugare brevemente per assicurarsi che tutti i campioni si trovino sul fondo delle provette.
9. Togliere il tappo e caricare le provette del campione nello strumento TapeStation 2200.
10. Selezionare le provette desiderate sul software TapeStation 2200 Controller e processare i campioni (consultare il manuale utente TapeStation per ulteriori informazioni).
11. Al termine del processo, avviare il software di analisi TapeStation Analysis per visualizzare i risultati (consultare il manuale utente TapeStation per ulteriori informazioni).
12. Registrare i risultati nel foglio di lavoro.

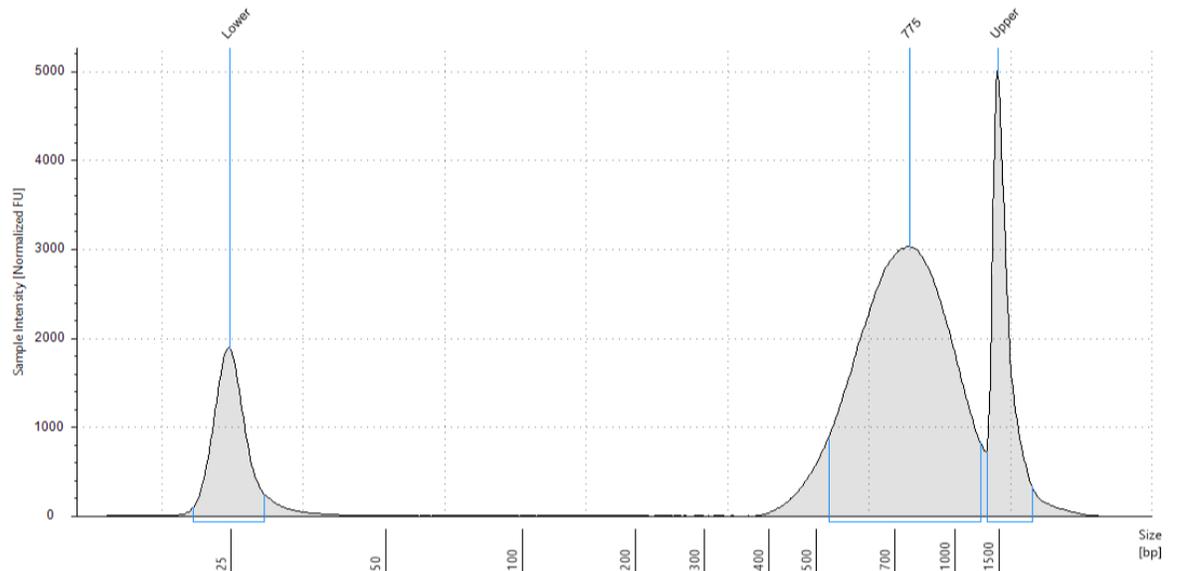


Figura 2.5.1: Immagine rappresentativa della traccia TapeStation per le librerie.

3. Cattura Ibrida (flusso di lavoro Early Pooling)

3.0 Introduzione al protocollo

- Attenersi al protocollo AlloSeq Tx riportato di seguito nell'ordine indicato utilizzando i parametri specificati.
- Prima di procedere, controllare il contenuto del kit e assicurarsi di disporre dei materiali consumabili e delle attrezzature necessarie.
- Per una maggiore semplicità operativa, le fasi procedurali di preparazione della Cattura ibrida sono inoltre illustrate in dettaglio nel documento *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. I riferimenti al foglio di lavoro nel capitolo 3 attengono a tale foglio di lavoro.

3.1 Ibridazione della sonda

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
AlloSeq Tx Probe Panel	da -15 °C a -25 °C BOX 4	10	Portare a temperatura ambiente.
Hybridisation Buffer 1	da -15 °C a -25 °C BOX 4	50	Posizionare nel sistema Hybex a 58 °C per 15 minuti. Vortexare e ispezionare visivamente, se il precipitato rimane, incubare a 58 °C per altri 15 minuti.
Hybridisation Buffer 2	da 2 °C a 8 °C BOX 5	10	Portare a temperatura ambiente.

2. Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
3. Prelevare le provette/strip PCR e i tappi necessari.

NOTA: non esiste un punto di arresto sicuro dopo il protocollo di cattura. I pool campione devono procedere direttamente dalla fase di attesa a 62 °C della reazione di ibridazione del termociclaggio alla fase di cattura della bead e alle fasi di lavaggio riscaldate.

NOTA: il processo richiede circa 20 minuti per essere configurato, e un minimo di 1,5 ore fino a un massimo di 18 ore nel termociclatore (le reazioni lasciate riposare durante la notte, o quelle di durata fino a 18 ore, devono essere mantenute ad una temperatura di 62 °C nella fase finale di attesa della reazione).

4. Per ogni reazione di ibridazione, combinare i seguenti reagenti nell'ordine elencato di seguito in una provetta/strip PCR:

Reagente	Volume per Pool (µl)
Pool delle librerie campione	30
Pannello sonda AlloSeq Tx	10
Buffer di ibridazione 1	50
Buffer di ibridazione 2	10
Totale	100

5. Con una pipetta impostata a 70 µl, miscelare bene ogni reazione di ibridazione per 10 volte, tappare e successivamente centrifugare a impulsi.
6. Se la soluzione rimane torbida, miscelare con la pipetta altre 6-8 volte, tappare e successivamente centrifugare a impulsi.
7. Posizionare la provetta/strip ed eseguire il programma di ibridazione utilizzando il coperchio riscaldato a **100 °C**, e il volume di reazione 100 µl:

N.	Fase	Temperatura	Durata	N. di cicli
1	Denaturazione	98 °C	5 minuti	1
2	Rallentamento	98 °C - 62 °C, in diminuzione di 2 °C/ciclo	1 minuto	1
3	Andare alla fase 2 per altri 18 cicli (in totale 19 cicli) diminuendo di 2 °C/ciclo.			
4	Ibridazione	62 °C	60 minuti	1
5	Sospensione finale	62 °C	Sospensione (non superare le 18 ore a 62 °C, incluso il passaggio n. 4)	1

8. Lasciare la provetta/strip nel termociclatore fino a quando non si è pronti a procedere con la cattura. Assicurarsi che le bead di cattura abbiano raggiunto la temperatura ambiente e che il Capture Wash Buffer e il sistema Hybex siano riscaldati a 58 °C.

3.2 Cattura

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
Capture Beads	da 2 °C a 8 °C BOX 5	250	Portare a temperatura ambiente, per almeno 30 minuti.
Capture Wash Buffer	da -15 °C a -25 °C BOX 4	800	Preriscaldare a 58 °C prima di utilizzarlo.
Capture Elution Buffer 1	da -15 °C a -25 °C BOX 4	28.5	Portare a temperatura ambiente.
2N NaOH	da -15 °C a -25 °C BOX 4	1.5	Portare a temperatura ambiente. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.
Capture Elution Buffer 2	da 2 °C a 8 °C BOX 5	4	Portare a temperatura ambiente.

2. Preparare un master mix di eluizione dei seguenti reagenti per ogni pool da catturare:

Reagente	Volume per Pool (µl)
Capture Elution Buffer 1	28.5
2N NaOH (fresco)	1.5

NOTA: la soluzione NaOH assorbirà rapidamente la CO₂ dall'atmosfera, alterando il pH e le prestazioni del reagente. Assicurarsi che la provetta 2N NaOH sia sigillata quando non è utilizzata.

3. Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
4. Prelevare le provette per microcentrifuga da 1,5 ml, strip/provette PCR e i tappi necessari.

NOTA: il processo richiede approssimativamente 1 ora.

5. Per ogni reazione di ibridazione, aggiungere 250 µl di Purification Beads in una provetta nuova da 1,5 ml.
6. **Trasferire** 100 µl di ogni reazione di ibridazione nella rispettiva provetta contenente le Capture Beads.
7. Vortexare la provetta ad alta velocità per 10 secondi. Non centrifugare in nessun modo
8. Incubare la provetta a 58 °C nel sistema Hybex per 15 minuti.
9. Centrifugare brevemente la provetta.
10. Posizionare immediatamente la provetta su un magnete per 30 secondi, permettendo alle bead compattarsi .
11. Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare il surnatante, facendo attenzione a non toccare le bead con il puntale .
12. Lavare tre volte con Capture Wash Buffer riscaldato come descritto di seguito:

NOTA: quando non viene utilizzato, conservare il Capture Wash Buffer nel sistema Hybex al fine di mantenere una temperatura di 58 °C. Rimuoverlo immediatamente solo prima di aggiungerlo alla reazione nelle fasi 12b e 14. Procedere rapidamente durante l'esecuzione delle fasi di lavaggio riscaldate per ridurre al minimo la permanenza del pool/buffer campione a temperatura ambiente.

- a) Rimuovere la provetta dal magnete.
- b) Aggiungere 200 µl di Capture Wash Buffer riscaldato (58 °C).

- c) Vortexare la provetta ad alta velocità per 10 secondi. Non centrifugare in nessun modo la provetta
 - d) Incubare la provetta a 58 °C nel sistema Hybex per 5 minuti.
 - e) Centrifugare a impulsi e posizionare immediatamente la provetta su un magnete per 30 secondi, permettendo alle stesse di raccogliersi accanto al magnete.
 - f) Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare il surnatante, facendo attenzione a non toccare le bead con il puntale.
 - g) Ripetere le fasi da a) a f) altre due volte per un totale di 3 lavaggi.
13. Rimuovere la provetta dal magnete
 14. Aggiungere 200 µl di Capture Wash Buffer riscaldato (58 °C).
 15. Vortexare la provetta ad alta velocità per 10 secondi. Non centrifugare in nessun modo la provetta
 16. **Trasferire** l'intero contenuto (soluzione di lavaggio e bead) in una nuova provetta da 1,5 ml.

NOTA: questa fase di trasferimento è fondamentale per rimuovere gli inibitori di PCR che potrebbero influenzare le prestazioni a valle.

17. Incubare la provetta a 58 °C nel sistema Hybex per 5 minuti.
18. Centrifugare immediatamente a impulsi e successivamente posizionare la provetta sul magnete per 30 secondi permettendo alle bead di raccogliersi accanto allo stesso.
19. Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare il surnatante, facendo attenzione a non toccare le bead con il puntale..
20. Centrifugare la provetta a impulsi rapidamente e successivamente posizionarla immediatamente sul magnete per 30 secondi, permettendo alle bead di raccogliersi accanto allo stesso.
21. Utilizzando una pipetta P20, aspirare e scartare tutto il surnatante residuo, facendo attenzione a non toccare le bead con il puntale.
22. Vortexare il master mix di eluizione preparato in precedenza, quindi rimuovere la provetta di reazione dal magnete e aggiungere 23 µl di master mix di eluizione in ogni provetta.
23. Vortexare la provetta ad alta velocità per 10 secondi.
24. Incubare a temperatura ambiente per 2 minuti.
25. Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
26. Posizionare la provetta sul magnete per 30 secondi, permettendo alle bead di raccogliersi accanto allo stesso.
27. **Trasferire** 21 µl di surnatante in una nuova provetta/strip PCR.
28. Aggiungere 4 µl di Capture Elution Buffer 2.
29. Pipettare la miscela 6-8 volte. Il volume finale è pari a 25 µl.

NOTA: punto di arresto sicuro. Le librerie possono essere conservate da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 24 ore.

3.3 PCR post arricchimento

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
PCR Primers	da -15 °C a -25 °C BOX 4	5	Scongelare su ghiaccio. Invertire per miscelare, quindi centrifugare brevemente.
PCR Mix (oppure PCR Mix-2 per kit test da 96)	da -15 °C a -25 °C BOX 4	20	Scongelare a temperatura ambiente e successivamente posizionare su ghiaccio.

2. Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
3. Prelevare le provette PCR necessarie contenenti le librerie di cattura dalla fase 3.2 Capture.

NOTA: questo processo richiede circa 5 minuti per essere configurato, 1 ora e 40 minuti nel termociclatore.

4. Aggiungere 5 µl di PCR Primers alle librerie catturate nella provetta PCR.
5. Aggiungere 20 µl di PCR Mix alla provetta.
6. Pipettare la miscela 10 volte.
7. Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
8. Posizionare la provetta/strip nel termociclatore ed eseguire il programma PCR Post-Arricchimento utilizzando il coperchio riscaldato a 105 °C, e il volume di reazione 50 µl:

N.	Fase	Temperatura	Durata	Numero di cicli
1	Denaturazione	98 °C	30 secondi	1
2	Denaturazione	98 °C	1 minuto	17
3	Appaiamento	60 °C	30 secondi	
4	Amplificazione	72 °C	3 minuti	
5	Amplificazione finale	72 °C	5 minuti	1
6	Sospensione finale	10 °C	Sospensione	1

NOTA: punto di arresto sicuro. Le librerie possono essere conservate da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 settimana.

NOTA: se si procede immediatamente alla purificazione, assicurarsi che le Purification Beads siano state lasciate a temperatura ambiente per almeno 30 minuti.

3.4 Purificazione PCR post arricchimento

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
Purification Beads (Purification Beads -2 per kit test da 96)	da 2 °C a 8 °C BOX 5	27	Portare a temperatura ambiente, per almeno 30 minuti.
Acqua sterile	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	80	Non è necessaria alcuna preparazione.
Etanolo al 100%	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	320	Preparare etanolo all'80%, come descritto di seguito.
Resuspension Buffer	da 2 °C a 8 °C BOX 5	32	Portare a temperatura ambiente. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.

2. Preparare etanolo fresco all'80% (2 lavaggi per pool) utilizzando 480 µl di etanolo al 100% e 120 µl di Acqua Sterile (è incluso un volume in eccesso).
3. Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
4. Prelevare le provette per microcentrifuga da 1,5 ml necessarie.

NOTA: Il processo richiede approssimativamente **30** minuti.

5. Per ogni reazione di purificazione, aggiungere 27 µl di Purification Beads vortexate accuratamente in una provetta nuova da 1,5 ml.
6. **Trasferire** 45 µl di ogni reazione PCR post-arricchimento nella rispettiva provetta contenente le Purifications Beads.
7. Vortexare ogni provetta ad alta velocità per 10 secondi.
8. Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.

9. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
10. Posizionare la provetta sul magnete per 30 secondi, permettendo alle bead di raccogliersi accanto allo stesso.
11. Utilizzando una pipetta, rimuovere e scartare il surnatante, facendo attenzione a non toccare le bead con il puntale.
12. Tenendo la provetta sul magnete, lavare due volte con etanolo all'80%:
 - a) Aggiungere 200 µl di etanolo all'80% ad ogni provetta,
 - b) Incubare a temperatura ambiente per 30 secondi,
 - c) Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare tutto il surnatante,
 - d) Ripetere le fasi da a) a c) per un totale di 2 lavaggi.
13. Rimuovere tutto il surnatante rimanente con la pipetta P20.
14. Lasciare asciugare all'aria la provetta per 5 minuti a temperatura ambiente, in modo tale da consentire l'evaporazione dell'etanolo residuo.
15. Togliere la provetta dal magnete e aggiungere 32 µL di Resuspension Buffer ad ogni provetta per eluire i frammenti target.
16. Vortexare ogni provetta ad alta velocità per 10 secondi.
17. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
18. Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
19. Posizionare le provette sul magnete per 30 secondi, permettendo alle bead di raccogliersi accanto allo stesso.
20. **Trasferire** 30 µl di surnatante in una nuova provetta da 1,5 ml a scopo conservativo.

NOTA: punto di arresto sicuro. Le librerie possono essere conservate da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 mese.

3.5 Quantificazione Qubit

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
Qubit BR buffer	da -25 °C a 30 °C Fornito dall'utente	199	Non è necessaria alcuna preparazione.
Qubit BR dye	da -25 °C a 30 °C Fornito dall'utente	1	Non è necessaria alcuna preparazione.
BR Standard n.1	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	10	Portare a temperatura ambiente.
BR Standard n.2	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	10	Portare a temperatura ambiente.

2. Procurarsi le provette Qubit necessarie e le provette da 1,5 ml o 5 ml al fine di preparare la soluzione di lavoro, a seconda del volume richiesto.
3. Preparare due provette di saggio per gli standard e una per ogni pool.
4. Preparare la soluzione di lavoro Qubit da 200 µl utilizzando 199 µl di QuBit buffer e 1 µl di QuBit dye per campione/standard da quantificare.
5. Vortexare la soluzione di lavoro per 2-3 secondi, e poi centrifugare ad impulsi.
6. Dispensare **190 µl** di soluzione di lavoro in ciascuna delle provette Standard.
7. Dispensare **198 µl** di soluzione di lavoro in ciascuna delle provette Pool.
8. Aggiungere **10 µl** di soluzione Standard in ciascuna delle rispettive provette Standard.
9. Aggiungere **2 µl** di ciascun pool nella rispettiva provetta.
10. Vortexare tutte le provette per 2-3 secondi e poi centrifugare ad impulsi.

11. Incubare le provette per 2 minuti a temperatura ambiente.
12. Inserire le provette nel Fluorimetro Qubit ed eseguire le letture (vedere il protocollo del produttore Qubit per ulteriori informazioni).
13. Registrare le letture Qubit nella tabella del foglio di lavoro al fine di calcolare la concentrazione media.

3.6 Visualizzazione TapeStation (Opzionale)

NOTA: Sistemi alternativi per la visualizzazione del frammento, come Fragment Analyzer, Bioanalyzer o similari, possono essere utilizzati dopo la validazione da parte dell'utente.

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
Ladder D1000	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	1	Portare a temperatura ambiente.
D1000 Sample Buffer	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	3	Portare a temperatura ambiente.

2. Prelevare lo ScreenTape necessario, la Piastra Campione a 96 pozzetti (a bordo sottile) e il rivestimento sigillante.
3. Trasferire 1 µl di ogni libreria arricchita in una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
4. Aggiungere 1 µl di Ladder D1000 in un pozzetto di riferimento.
5. Aggiungere 3 µl di D1000 sample buffer ad ogni libreria arricchita e al pozzetto di riferimento.
6. Sigillare la piastra con il rivestimento sigillante.
7. Vortexare utilizzando il miscelatore vortex per piastra IKA a 2000 giri al minuto per 1 minuto.
8. Centrifugare brevemente per assicurarsi che tutti i campioni si trovino sul fondo dei pozzetti.
9. Caricare la piastra campione nello strumento TapeStation 2200.
10. Selezionare i pozzetti desiderati sul software TapeStation 2200 Controller e processare i campioni (consultare il manuale utente TapeStation per ulteriori informazioni).
11. Al termine del processo, avviare il software di analisi TapeStation Analysis per visualizzare i risultati (consultare il manuale utente TapeStation per ulteriori informazioni).
12. Registrare i risultati nella tabella del foglio di lavoro.

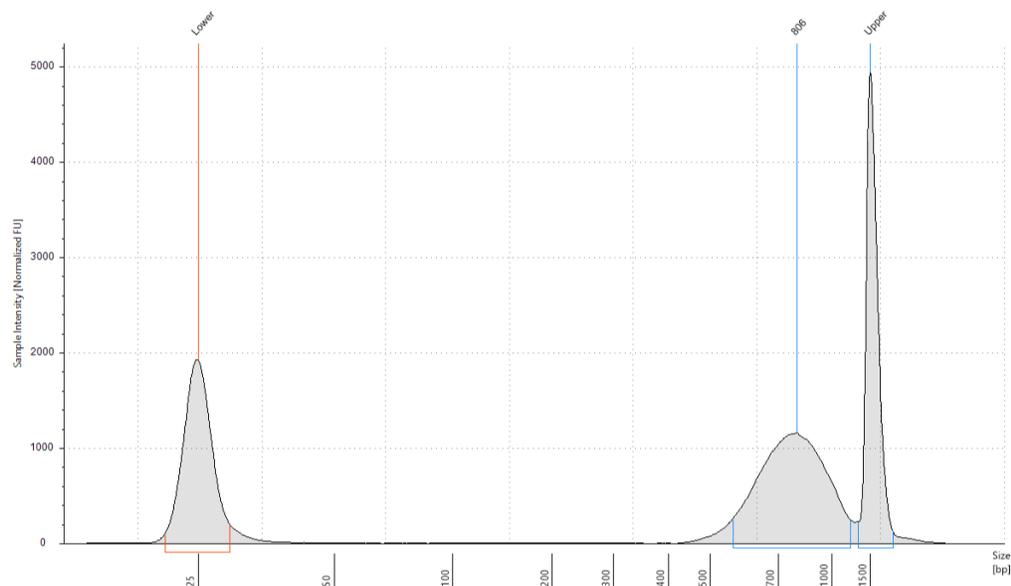


Figura 3.6.1: Immagine rappresentativa della traccia TapeStation per il pool libreria arricchito finale.

4. Preparazione della Libreria (Flusso di lavoro Original)

4.0 Introduzione al protocollo

- Attenersi al protocollo AlloSeq Tx riportato di seguito nell'ordine indicato utilizzando i parametri specificati.
- Prima di procedere, controllare il contenuto del kit e assicurarsi di disporre dei materiali consumabili e delle attrezzature necessarie.
- Per una maggiore semplicità operativa, le fasi procedurali di Preparazione della libreria sono inoltre illustrate in dettaglio nel documento *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD*. I riferimenti al foglio di lavoro nel capitolo 4 attengono a tale foglio di lavoro.

4.1 Preparazione del campione

1. Inserire un ID esperimento, una descrizione, un operatore e la data nel foglio di lavoro.
2. Selezionare il set sonda AlloSeq da utilizzare per l'esperimento dal menu a tendina nel foglio di lavoro.
3. Selezionare il tipo di sequenziatore da utilizzare dal menu a tendina nel foglio di lavoro.
4. Inserire l'ID dei campioni da testare nella sezione gialla del layout della piastra nel foglio di lavoro, in base alla configurazione desiderata.

NOTA: Possono essere inseriti solo caratteri alfanumerici. Gli ID dei campioni duplicati saranno contrassegnati in rosso per sollecitare l'utente a correggerli. È un requisito del software del sequenziatore avere solo ID di campioni unici su una corsa. Non inserire alcuna informazione relativa ai pozzetti che non sono destinati a contenere alcun campione.

5. Selezionare la serie di indici desiderata dal menu a tendina arancione presente sotto Configurazione Piastra.
6. Se necessario e utilizzando il formato indice provettato, l'ordine dell'indice i7 può essere modificato, selezionare l'indice i7 alternativo da utilizzare dal menu a tendina Opzioni per la colonna richiesta. Se sono selezionati indici i7 duplicati, le celle saranno contrassegnate in rosso per sollecitare l'utente a correggerle.
7. Se necessario e utilizzando il formato indice provettato, l'ordine dell'indice i5 può essere modificato, selezionare l'indice i5 alternativo da utilizzare dal menu a tendina Opzioni per la riga richiesta. Se sono selezionati indici i5 duplicati, le celle saranno contrassegnate in rosso per sollecitare l'utente a correggerle.
8. Completate tutte le azioni descritte in precedenza, fare clic sulla scheda 1.2 SampleSheet e ricontrollare. La dicitura in rosso sarà utilizzata per contrassegnare dove le informazioni sono ancora indispensabili. Se non compare alcuna dicitura in rosso, è possibile salvare la scheda SampleSheet come CSV (Comma delimited) (*.csv). Salvare il file come "SampleSheet.csv". Il salvataggio in formato csv salverà solo la scheda attiva. Aprire il file SampleSheet.csv salvato in excel e cancellare tutte le righe vuote nella tabella [Dati], ovvero tutte le righe comprese tra 22 e 117 che non contengono informazioni sul campione. Effettuato tale operazione, salvare il file. Il foglio campione è dunque disponibile ad essere importato per il sequenziamento su un sequenziatore Illumina.

4.2 Preparazione della libreria

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per campione (µl)	Preparazione richiesta
Tagmentation Buffer	da -15 °C a -25 °C BOX 1	10	Portare a temperatura ambiente.
Acqua sterile	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	30	Non è necessaria alcuna preparazione.
Tagmentation Beads	da -15 °C a -25 °C BOX 1	10	Portare a temperatura ambiente, per almeno 30 minuti.
Stop Buffer	da 15 °C a 30 °C BOX 2	10	Non è necessaria alcuna preparazione.
Tagmentation Wash Buffer	da 15 °C a 30 °C BOX 2	300	Non è necessaria alcuna preparazione.
PCR Mix	da -15 °C a -25 °C BOX 4	20	Scongelare e conservare su ghiaccio. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.
Indici: 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: 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: H510, H511, H513, H522, H515, H516, H518, H520, H716, H718, H719, H720, H721, H722, H723, H724, H726, H727, H728, H729	da -15 °C a -25 °C BOX 3	20	Scongelare e conservare su ghiaccio.

2. Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
3. Preparare la piastra a mezzo bordo da 96 pozzetti, il Microseal B e le provette per microcentrifuga da 1,5 ml.

NOTA: non esiste un punto di arresto sicuro fino alla PCR di indicizzazione. Il processo richiede circa **1 ora e 50 minuti** (inclusi 50 min di termociclaggio PCR).

4. Per ogni campione di DNA, dosare 10 µl di campione 10-100 ng/µl nel pozzetto appropriato di una piastra PCR in base al layout piastra sul foglio 1.0 Sample_Prep.

5. Preparare 40 µl di Tagmentation Master Mix per campione utilizzando: 10 µl di Tagmentation Buffer, 20 µl di acqua sterile e 10 µl di Tagmentation Beads.
6. Miscelare il master mix di cui sopra tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi.
7. Pipettare 40 µl di Tagmentation Master Mix in ogni pozzetto che contiene un campione DNA.
8. Sigillare la piastra con la pellicola Microseal B.
9. Centrifugare la piastra a 100 x g per 10 secondi per raccogliere tutti i reagenti sul fondo del pozzetto.
10. Usare il vortex per piastre per miscelare a 1600 giri al minuto per 1 minuto.
11. Ispezionare visivamente la piastra:
 - a) Se le bead non sono distribuite uniformemente nel pozzetto, ripetere l'operazione di scuotimento come al punto 10,
 - b) Se il materiale non è sul fondo del pozzetto o è schizzato sulla pellicola Microseal B, centrifugare a impulsi e ripetere la fase 10 di scuotimento.
12. Posizionare la piastra nel termociclatore ed eseguire il programma di tagmentazione utilizzando il coperchio riscaldato a 105 °C, e il volume di reazione 50 µl:

Temperatura	Durata
55 °C	5 minuti
10 °C	2 minuti

13. Una volta terminato il programma, rimuovere immediatamente la piastra dal termociclatore e lasciarla a temperatura ambiente per 2 minuti.
14. Rimuovere la pellicola Microseal B.
15. Aggiungere 10 µl di Stop Buffer.
16. Sigillare nuovamente la piastra con una nuova pellicola Microseal B.
17. Usare il vortex per piastre per miscelare a 1600 giri al minuto per 1 minuto.
18. Incubare la piastra per ulteriori 5 minuti a temperatura ambiente.
19. Durante l'incubazione rimuovere il PCR Mix e gli indici dal congelatore per scongelarli; successivamente posizzarli su un rack porta-provette refrigerato/su ghiaccio.
20. Ispezionare visivamente la piastra, se il materiale non si trova sul fondo del pozzetto o è schizzato sulla pellicola Microseal B, centrifugare la piastra a impulsi.
21. Lavare tre volte con il Tagmentation Wash Buffer come descritto di seguito:
 - a) Rimuovere la pellicola Microseal B e posizionare la piastra sul Supporto Magnetico 96 per 1 minuto, permettendo alle bead di raccogliersi nei pozzetti adiacenti al magnete,
 - b) Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare il surnatante, Evitando di toccare le bead con il puntale,
 - c) Aggiungere lentamente 100 µl di Tagmentation Wash Buffer in ogni pozzetto,
 - d) Sigillare nuovamente la piastra con una nuova pellicola Microseal B; assicurarsi che sia correttamente fissata,
 - e) Usare lo shaker per piastre per miscelare a 1800 giri al minuto per 2 minuti a temperatura ambiente.
 - f) **ATTENZIONE:** se i campioni sono schizzati sulla sigillatura, centrifugare a 100 x g per 10 secondi prima di rimuoverla,
 - g) Ripetere le fasi da a) a f) altre due volte per un totale di 3 lavaggi.

NOTA: prima di scartare il supernatante del terzo lavaggio, preparare il master mix PCR come descritto di seguito.

22. Preparare 40 µl di master mix PCR utilizzando 20 µl di Acqua Sterile e 20 µl di PCR Mix (oppure PCR Mix-1 se si utilizzano kit test da 96).

NOTA: PCR Mix è utilizzato per i passaggi successivi nel protocollo. Non scartare questa fiala.

23. Rimuovere la pellicola Microseal B e posizionare la piastra sul Supporto Magnetico 96 per 1 minuto, permettendo alle bead di raccogliersi nei pozzetti adiacenti al magnete.
24. Utilizzando una pipetta impostata a 100 µl, aspirare e scartare il supernatante dal Tagmentation Wash finale.
25. Rimuovere la piastra dal supporto magnetico.

26. Aggiungere 40 µl di master mix PCR in ogni pozzetto.
27. Sigillare la piastra con la pellicola Microseal B.
28. Usare lo scuotitore per piastre per miscelare a 1800 giri al minuto per 2 minuti a temperatura ambiente.
29. Centrifugare la piastra a 100 x g per 10 secondi affinché tutte le bead siano sospese nel master mix PCR.

Per gli indici in provetta (P),

30. (T) Vortexare e centrifugare a impulsi le provette indice per garantire che tutto il volume sia concentrato nella parte inferiore della provetta.
31. (T) Rimuovere la pellicola Microseal B dalla piastra campione.
32. Aggiungere 5 µl dell'indice i7 in ogni pozzetto, in base al layout piastra sul foglio 1.0 Sample_Prep.
33. Aggiungere 5 µl dell'indice i5 in ogni pozzetto, in base al layout piastra sul foglio 1.0 Sample_Prep.
Riprendere dal passaggio 34.

Per gli indici in piastra ,

30. (P) Usare uno shaker per piastre per miscelare la piastra indice a 1800 giri al minuto per 1 minuto.
31. (P) Centrifugare la piastra indice a 100 x g per 10 secondi per assicurarsi che tutto il volume sia sul fondo del pozzetto.
32. (P) Rimuovere la pellicola Microseal B dalla piastra campione.
33. (P) **Confermare l'orientamento corretto della piastra e il set di indice corretto. Non staccare il rivestimento sigillante.** Perforare con un puntale il rivestimento sigillante della piastra indice. Servendosi di un nuovo puntale, trasferire 10 µl degli indici combinati dalla piastra indice a ciascun pozzetto campione, conformemente al layout piastra sul foglio 1.0 Sample_Prep.
Riprendere dal passaggio 34.
34. Sigillare con una nuova pellicola Microseal B.
35. Usare lo scuotitore per piastre per miscelare a 1800 giri al minuto per 1 minuto a temperatura ambiente.
36. Centrifugare la piastra a 100 x g per 10 secondi per raccogliere tutti i reagenti sul fondo del pozzetto. Ispezionare visivamente per assicurarsi che le bead siano ancora uniformemente distribuite nella soluzione. Se le bead non sono distribuite uniformemente, ripetere l'operazione di scuotimento come al punto 35,
37. Posizionare la piastra nel termociclatore ed eseguire il programma PCR di indicizzazione utilizzando il coperchio riscaldato a 105 °C e il volume di reazione 50 µl:

N.	Fase	Temperatura	Durata	Numero di cicli
1	Riempimento dei vuoti	72 °C	3 minuti	1
2	Denaturazione iniziale	98 °C	3 minuti	1
3	Denaturazione	98 °C	20 secondi	9
4	Appaiamento	60 °C	30 secondi	
5	Amplificazione	72 °C	3 minuti	
6	Amplificazione finale	72 °C	3 minuti	1
7	Sospensione finale	10 °C	Sospensione	1

NOTA: punto di arresto sicuro. Le librerie possono essere conservate da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 settimana.

NOTA: se si procede immediatamente alla selezione dimensione e alla purificazione, assicurarsi che le Purification Beads siano ricondotte a temperatura ambiente prima di utilizzarle.

4.3 Selezione dimensione e purificazione

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per campione (µl)	Preparazione richiesta
Purification Beads (Purification Beads – 1 per kit test da 96)	da 2 °C a 8 °C BOX 5	110.8	Portare a temperatura ambiente, per almeno 30 minuti. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.
Acqua sterile	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	215	Non è necessaria alcuna preparazione.
Etanolo al 100%	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	320	Preparare etanolo all'80%, come descritto di seguito.
Resuspension Buffer	da 2 °C a 8 °C BOX 5	17	Portare a temperatura ambiente. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.

- Preparare le Purification Beads diluite utilizzando 90 µl di Purification Beads e 135 µl di Acqua Sterile, per campione. Assicurarsi che le Purification Beads siano vortexate accuratamente prima dell'uso.
- Preparare 600 µl di Etanolo fresco all'80% per campione, sufficiente per 2 lavaggi, utilizzando 480 µl di Etanolo al 100% e 120 µl di acqua Sterile (è incluso un volume in eccesso).
- Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
- Prelevare la piastra MIDI desiderata, il Microseal B e le piastre PCR.

NOTA: il processo richiede approssimativamente 1 ora.

- Dosare 225 µl di Purification Beads diluite nel pozzetto appropriato di una piastra MIDI (in base al layout piastra sul foglio 1.0 Sample_Prep).
- Pipettare la miscela di tagmentation beads e del supernatante dal PCR di indicizzazione **oppure** Mescolare tramite il vortex la piastra PCR di indicizzazione per 1 minuto a 1800 giri al minuto, quindi aggiungere 45 µl di ogni miscela nel relativo pozzetto della piastra MIDI contenente le Purification Beads diluite.
- Sigillare la piastra MIDI con la pellicola Microseal B.
- Usare lo scuotitore per piastre per miscelare a 1800 giri al minuto per 2 minuti.
- Incubare la piastra per 5 minuti a temperatura ambiente. Durante tale incubazione i frammenti più grandi si legano alle bead.
- Centrifugare la piastra a 280 x g per 1 minuto.
- Rimuovere la pellicola Microseal B e posizionare la piastra sul Supporto Magnetico 96 per 5 minuti, permettendo alle bead di raccogliersi nei pozzetti adiacenti al magnete.
- Trasferire 260 µl del supernatante in una nuova piastra MIDI o in nuovi pozzetti della stessa piastra.**
- Aggiungere 20,8 µl di Purification Beads (non diluite) ad ogni campione. Sigillare con una pellicola Microseal B.
- Usare lo scuotitore per piastre per miscelare a 1800 giri al minuto per 1 minuto.
- Incubare la piastra per 5 minuti a temperatura ambiente. Durante tale incubazione i frammenti target dimensionati si legano alle bead.
- Rimuovere la pellicola Microseal B e posizionare la piastra sul Supporto Magnetico 96 per 5 minuti, permettendo alle bead di raccogliersi nei pozzetti adiacenti al magnete.
- Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare il surnatante, senza toccare le bead con il puntale.

19. Tenendo la piastra sul magnete, lavare due volte con etanolo all'80%:
 - a) Aggiungere 200 µl di etanolo all'80% ad ogni campione,
 - b) Incubare a temperatura ambiente per 30 secondi,
 - c) Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare tutto il surnatante,
 - d) Ripetere le fasi da a) a c) per un totale di 2 lavaggi.
20. Rimuovere tutto il surnatante rimanente con la pipetta P20.
21. Lasciare asciugare all'aria la piastra per 5 minuti a temperatura ambiente, in modo tale da consentire l'evaporazione dell'etanolo residuo.
22. Aggiungere 17 µl di Resuspension Buffer ad ogni pozzetto per eluire i frammenti target.
23. Sigillare la piastra con la pellicola Microseal B.
24. Usare lo shaker per piastre per miscelare a 1800 giri al minuto per 2 minuti.
25. Incubare la piastra per 5 minuti a temperatura ambiente.
26. Centrifugare la piastra a 280 x g per 30 secondi.
27. Rimuovere la pellicola Microseal B e posizionare la piastra sul Supporto Magnetico 96 per 5 minuti, permettendo alle bead di raccogliersi nei pozzetti adiacenti al magnete.
28. **Trasferire** 15 µl di surnatante in una nuova piastra PCR a scopo conservativo.

NOTA: punto di arresto sicuro. Le librerie possono essere conservate da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 mese.

4.4 Quantificazione QuBit (opzionale)

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per campione (µl)	Preparazione richiesta
Qubit BR buffer	da -25 °C a 30 °C Fornito dall'utente	199	Non è necessaria alcuna preparazione.
Qubit BR dye	da -25 °C a 30 °C Fornito dall'utente	1	Non è necessaria alcuna preparazione.
BR Standard n.1	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	10	Portare a temperatura ambiente.
BR Standard n.2	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	10	Portare a temperatura ambiente.

2. Prelevare le provette Qubit necessarie e le provette da 1,5 ml o 5 ml al fine di preparare la soluzione di lavoro, a seconda del volume richiesto.
3. Configurare due provette di saggio per gli standard e una per ogni campione.
4. Preparare la soluzione di lavoro Qubit da 200 µl utilizzando 199 µl di QuBit buffer e 1 µl di QuBit dye per campione/standard da quantificare.
5. Vortexare la soluzione di lavoro per 2-3 secondi, e poi centrifugare ad impulsi.
6. Dispensare **190 µl** di soluzione di lavoro in ciascuna delle provette Standard.
7. Dispensare **198 µl** di soluzione di lavoro in ciascuna delle provette Campione.
8. Aggiungere **10 µl** di soluzione Standard in ciascuna delle rispettive provette Standard.
9. Aggiungere **2 µl** di ciascun campione nella rispettiva provetta.
10. Vortexare tutte le provette per 2-3 secondi e poi centrifugare ad impulsi.
11. Incubare le provette per 2 minuti a temperatura ambiente.

12. Inserire le provette nel Fluorimetro Qubit ed eseguire le letture (vedere il protocollo Qubit per ulteriori informazioni).
13. Registrare le letture Qubit nella tabella del foglio di lavoro al fine di calcolare la media per campione.

NOTA: la resa prevista della biblioteca è di circa 30 ng/μL ma può variare a seconda della qualità del DNA e degli input. Una resa di 10 ng/μL o superiore ci si attende che garantisca risultati soddisfacenti in termini di arricchimento.

4.5 Visualizzazione TapeStation (Opzionale)

NOTA: Sistemi alternativi per la visualizzazione del frammento, come Fragment Analyzer, Bioanalyzer o similari, possono essere utilizzati dopo la validazione da parte dell'utente.

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per campione (μl)	Preparazione richiesta
Ladder D1000	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	1	Portare a temperatura ambiente.
D1000 Sample Buffer	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	3	Portare a temperatura ambiente.

2. Prelevare lo ScreenTape necessario, la Piastra Campione a 96 pozzetti (a bordo sottile) e il rivestimento sigillante.
3. Trasferire 1 μl di ogni libreria pre-aricchita in una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
4. Aggiungere 1 μl di Ladder D1000 in un pozzetto di riferimento.
5. Aggiungere 3 μl di D1000 sample buffer ad ogni pozzetto campione e al pozzetto di riferimento.
6. Sigillare la piastra con il rivestimento sigillante.
7. Vortexare utilizzando il miscelatore vortex per piastra IKA a 2000 giri al minuto per 1 minuto.
8. Centrifugare brevemente per assicurarsi che tutti i campioni si trovino sul fondo dei pozzetti.
9. Caricare la piastra campione nello strumento TapeStation 2200.
10. Selezionare i pozzetti desiderati sul software TapeStation 2200 Controller e processare i campioni (consultare il manuale utente TapeStation per ulteriori informazioni).
11. Al termine del processo, avviare il software di analisi TapeStation Analysis per visualizzare i risultati (consultare il manuale utente TapeStation per ulteriori informazioni).
12. Registrare i risultati nel foglio di lavoro.

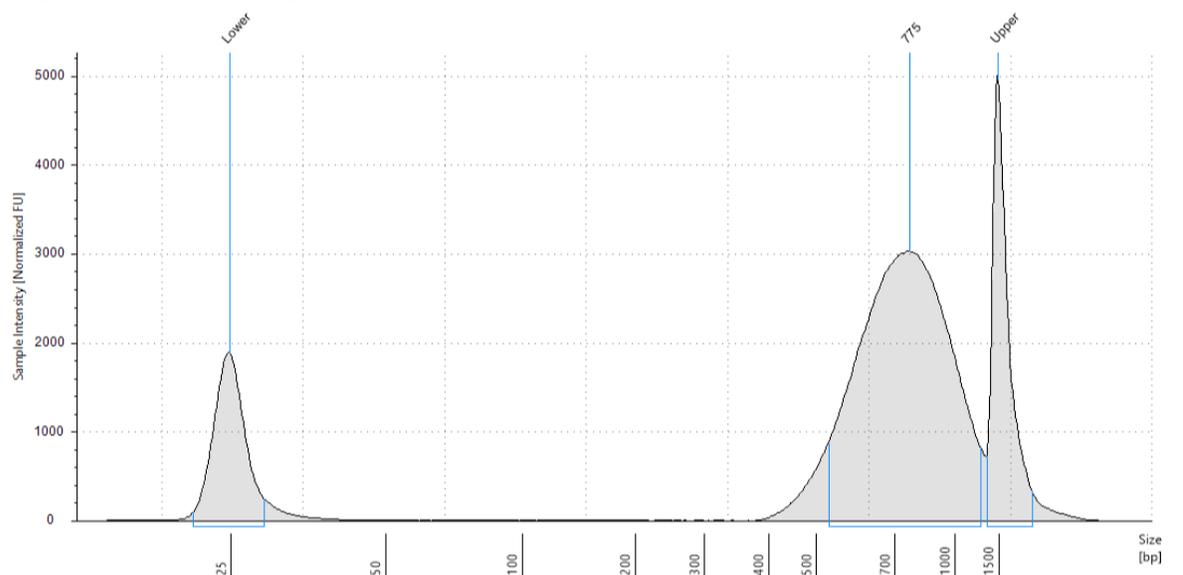


Figura 4.5.1: Immagine rappresentativa della traccia TapeStation per le librerie.

5. Cattura Ibrida (flusso di lavoro Original)

5.0 Introduzione al protocollo

- Attenersi al protocollo AlloSeq Tx riportato di seguito nell'ordine indicato utilizzando i parametri specificati.
- Prima di procedere, controllare il contenuto del kit e assicurarsi di disporre dei materiali consumabili e delle attrezzature necessarie.
- Per una maggiore semplicità operativa, le fasi procedurali di preparazione della Cattura ibrida sono inoltre illustrate in dettaglio nel documento *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD*. I riferimenti al foglio di lavoro nel capitolo 5 attengono a tale foglio di lavoro.

5.1 Pooling campione

1. Inserire un ID esperimento nell'apposito campo giallo del foglio di lavoro.
2. Inserire il numero di pool da processare nell'apposito campo giallo del foglio di lavoro.
3. Copiare le informazioni del campione appropriato dalla scheda 1.1 Linear View di *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD* e incollare nell'elenco Library Pool List in *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD* utilizzando l'opzione incolla speciale "Values & Number Formatting".
4. Se il pooling è costituito da 12 o meno campioni, aggiungere 2,5 µl di ogni libreria da arricchire in una provetta/strip PCR e aggiungere il volume appropriato di Resuspension Buffer per un totale di 30 µl, in base alla tabella sottostante.
5. Se il pooling è costituito da 12 o meno campioni, aggiungere 2,5 µl di ogni libreria da arricchire in una provetta per microcentrifuga da 1,5 ml e procedere alla fase di concentrazione (1.1 del foglio di lavoro *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD*).
6. Se si processano pool multipli, duplicare questa tab e seguire i passi 1-5 riportati in precedenza, identificando in modo univoco ogni pool.

NOTA: le librerie a resa ridotta, comprese quelle delle preparazioni DNA delle cellule dell'epitelio buccale, possono beneficiare dell'utilizzo di un volume di input della libreria più grande (non superiore ai 30 µL di volume di input della libreria totale combinato). Si raccomanda, ove possibile, il processamento di librerie a bassa resa (epitelio buccale) in un pool di arricchimento separato dalle librerie a più alta resa (genomiche). Per ottenere una consulenza specifica, contattare il rappresentante tecnico locale.

5.2 Concentrazione del Pool della libreria (opzionale)

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
Purification Beads (Purification Beads – 1 per kit test da 96)	da 2 °C a 8 °C BOX 5	58,5 - 108	Portare a temperatura ambiente, per almeno 30 minuti. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.
Acqua sterile	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	120	Non è necessaria alcuna preparazione.

Etanolo al 100%	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	480	Preparare etanolo all'80%, come descritto di seguito.
Resuspension Buffer	da 2 °C a 8 °C BOX 5	32	Portare a temperatura ambiente. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.

- Preparare etanolo fresco all'80% (2 lavaggi per campione) utilizzando 480 µl di etanolo al 100% e 120 µl di Acqua Sterile (è incluso un volume in eccesso).
- Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
- Prelevare le provette per microcentrifuga da 1,5 ml necessarie.

NOTA: il processo richiede approssimativamente 30 minuti.

- Librerie di campioni in pool, in una provetta da 1,5 ml, secondo le istruzioni del foglio di lavoro 1.0 Sample Pooling.
- Aggiungere volume (1,8 x volume di campione pooled) di Purification Beads vortexate accuratamente alla provetta da 1,5 ml contenente le librerie pooled in base alle istruzioni del foglio di lavoro 1.1 Concentrate (opzionale).
- Vortexare ogni provetta ad alta velocità per 10 secondi, 3 volte.
- Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
- Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
- Posizionare la provetta sul magnete per 1 minuto, permettendo alle bead di raccogliersi accanto allo stesso.
- Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare il surnatante, lasciando le bead nella provetta adiacenti al magnete.
- Tenendo la provetta sul magnete, lavare due volte con etanolo all'80%:
 - Aggiungere 200 µl di etanolo all'80% ad ogni provetta,
 - Incubare a temperatura ambiente per 30 secondi,
 - Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare tutto il surnatante,
 - Ripetere le fasi da a) a c) per un totale di 2 lavaggi.
- Rimuovere tutto il surnatante rimanente con la pipetta P20.
- Lasciare asciugare all'aria la provetta per 5 minuti a temperatura ambiente, in modo tale da consentire l'evaporazione dell'etanolo residuo.
- Aggiungere 32 µl di Resuspension Buffer ad ogni provetta per eluire le librerie.
- Vortexare ogni provetta ad alta velocità per 10 secondi, 3 volte.
- Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
- Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
- Posizionare le provette su un magnete per 1 minuto, permettendo alle bead di raccogliersi nelle stesse accanto al magnete.
- Trasferire** 30 µl di surnatante in una nuova provetta/strip PCR per l'ibridazione.

NOTA: punto di arresto sicuro. Le librerie possono essere conservate da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 settimana.

5.3 Ibridazione della sonda

- Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
AlloSeq Tx Probe Panel	da -15 °C a -25 °C BOX 4	10	Portare a temperatura ambiente.

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
Hybridisation Buffer 1	da -15 °C a -25 °C BOX 4	50	Posizionare nel sistema Hybex a 50 °C per 15 minuti. Vortexare e ispezionare visivamente; se il precipitato rimane, incubare a 50 °C per altri 15 minuti.
Hybridisation Buffer 2	da 2 °C a 8 °C BOX 5	10	Portare a temperatura ambiente.

- Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
- Prelevare le provette/strip PCR e i tappi necessari.

NOTA: non esiste un punto di arresto sicuro dopo il protocollo di cattura. I pool campione devono procedere direttamente Dallo step 5 della alla fase di cattura della bead e alle fasi di lavaggio riscaldate.

NOTA: il processo richiede circa 20 minuti per La preparazione, e un minimo di 2 ore fino a un massimo di 18 ore nel termociclatore (le reazioni lasciate riposare durante la notte, o quelle di durata fino a 18 ore, devono essere mantenute ad una temperatura di 62 °C nella fase finale di attesa della reazione).

- Per ogni reazione di ibridazione, combinare i seguenti reagenti nell'ordine elencato di seguito in una provetta/strip PCR:

Reagente	Volume per Pool (µl)
Pool delle librerie campione	30
Pannello sonda AlloSeq Tx	10
Buffer di ibridazione 1	50
Buffer di ibridazione 2	10
Totale	100

- Con una pipetta impostata a 70 µl, miscelare bene ogni reazione di ibridazione per 10 volte, sigillare e successivamente centrifugare a impulsi.
- Se la soluzione rimane torbida, miscelare con la pipetta altre 6-8 volte.
- Posizionare la provetta/strip ed eseguire il programma di ibridazione utilizzando il coperchio riscaldato a **100 °C**, e il volume di reazione 100 µl:

N.	Fase	Temperatura	Durata	N. di cicli
1	Denaturazione	98 °C	5 minuti	1
2	Ramp down	98 °C - 62 °C, in diminuzione di 2 °C/ciclo	1 minuto	1
3	Andare alla fase 2 per altri 18 cicli (in totale 19 cicli) diminuendo di 2 °C/ciclo.			
4	Ibridazione	62 °C	90 minuti	1
5	Sospensione finale	62 °C	Hold (non superare le 18 ore a 62 °C, incluso il passaggio n. 4)	1

- Lasciare la provetta/strip nel termociclatore fino a quando non si è pronti a procedere con la cattura. Assicurarsi che le bead di cattura abbiano raggiunto la temperatura ambiente e che il Capture Wash Buffer e il sistema Hybex siano riscaldati a 58 °C.

5.4 Cattura

- Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
Capture Beads	da 2 °C a 8 °C BOX 5	250	Portare a temperatura ambiente, per almeno 30 minuti.

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
Capture Wash Buffer	da -15 °C a -25 °C BOX 4	800	Preriscaldare a 58°C prima di utilizzarlo.
Capture Elution Buffer 1	da -15 °C a -25 °C BOX 4	28.5	Portare a temperatura ambiente.
2N NaOH	da -15 °C a -25 °C BOX 4	1.5	Portare a temperatura ambiente. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.
Capture Elution Buffer 2	da 2 °C a 8 °C BOX 5	4	Portare a temperatura ambiente.

2. Preparare la master mix di eluizione dei seguenti reagenti per ogni pool da catturare:

Reagente	Volume per Pool (µl)
Capture Elution Buffer 1	28.5
2N NaOH (fresco)	1.5

NOTA: la soluzione NaOH assorbirà rapidamente la CO₂ dall'atmosfera, alterando il pH e le prestazioni del reagente. Assicurarsi che la provetta 2N NaOH sia sigillata quando non è utilizzata.

- Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare tutti i reagenti prima di utilizzarli.
- Prelevare le provette per microcentrifuga da 1,5 ml, strip/provette PCR e i tappi necessari.

NOTA: il processo richiede approssimativamente 1 ora.

- Per ogni reazione di ibridazione, aggiungere 250 µl di Purification Beads in una provetta nuova da 1,5 ml.
- Trasferire** 100 µl di ogni reazione di ibridazione nella rispettiva provetta contenente le Capture Beads.
- Vortexare la provetta ad alta velocità per 10 secondi, 3 volte. Non centrifugare
- Incubare la provetta a 58 °C nel sistema Hybex per 15 minuti.
- Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
- Posizionare immediatamente la provetta sul magnete per 1 minuto, permettendo alle bead di raccogliersi accanto allo stesso.
- Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare il surnatante, senza toccare le bead .
- Lavare tre volte con Capture Wash Buffer riscaldato come descritto di seguito:

NOTA: quando non viene utilizzato, conservare il Capture Wash Buffer nel Hybex al fine di mantenere una temperatura di 58 °C. Rimuoverlo immediatamente solo prima di aggiungerlo alla reazione nelle fasi 12b e 14. Procedere rapidamente durante l'esecuzione delle fasi di lavaggio riscaldate per ridurre al minimo la permanenza del pool/buffer campione a temperatura ambiente.

- Rimuovere la provetta dal magnete.
 - Aggiungere 200 µl di Capture Wash Buffer riscaldato (58 °C).
 - Vortexare la provetta ad alta velocità per 10 secondi, 3 volte. Non centrifugare
 - Incubare la provetta a 58 °C nel sistema Hybex per 5 minuti.
 - Centrifugare a impulsi e posizionare immediatamente la provetta su un magnete da 1,5 ml per 1 minuto, permettendo alle bead di raccogliersi accanto allo stesso.
 - Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare il surnatante, senza rimuovere le bead.
 - Ripetere le fasi da a) a f) altre due volte per un totale di 3 lavaggi.
- Rimuovere la provetta dal magnete
 - Aggiungere 200 µl di Capture Wash Buffer riscaldato (58 °C).
 - Vortexare la provetta ad alta velocità per 10 secondi, 3 volte. Non centrifugare o centrifugare a impulsi
 - Trasferire** l'intero contenuto (soluzione di lavaggio e bead) in una nuova provetta da 1,5 ml.

NOTA: questa fase di trasferimento è fondamentale per rimuovere gli inibitori di PCR che potrebbero influenzare le prestazioni a valle.

17. Incubare la provetta a 58 °C nel sistema Hybex per 5 minuti.
18. Centrifugare a impulsi immediatamente e posizionare la provetta sul magnete per 1 minuto, permettendo alle bead di raccogliersi accanto allo stesso.
19. Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare il surnatante, senza toccare le bead.
20. Centrifugare la provetta a impulsi rapidamente e posizionarla immediatamente sul magnete per 1 minuto, permettendo alle bead di raccogliersi accanto allo stesso.
21. Utilizzando una pipetta P20, aspirare e scartare tutto il surnatante residuo, senza toccare le bead.
22. Vortexare il master mix di eluizione preparato in precedenza, quindi rimuovere la provetta di reazione dal magnete e aggiungere 23 µl di master mix di eluizione in ogni provetta.
23. Vortexare la provetta ad alta velocità per 10 secondi, 3 volte.
24. Incubare a temperatura ambiente per 2 minuti.
25. Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
26. Posizionare la provetta sul magnete per 1 minuto, permettendo alle bead di raccogliersi accanto allo stesso.
27. **Trasferire** 21 µl di surnatante in una nuova provetta/strip PCR.
28. Aggiungere 4 µl di Capture Elution Buffer 2.
29. Pipettare la miscela 6-8 volte. Il volume finale è pari a 25 µl.

NOTA: punto di arresto sicuro. Le librerie possono essere conservate da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 24 ore.

5.5 PCR post arricchimento

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
PCR Primers	da -15 °C a -25 °C BOX 4	5	Scongelare su ghiaccio. Invertire per miscelare, quindi centrifugare brevemente.
PCR Mix (oppure PCR Mix-2 per kit test da 96)	da -15 °C a -25 °C BOX 4	20	Scongelare a temperatura ambiente e successivamente posizionare su ghiaccio.

2. Vortexare e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
3. Prelevare le provette PCR necessarie contenenti le librerie di cattura dalla fase 3.4 Capture.

NOTA: questo processo richiede circa 5 minuti per la preparazione manuale, 1 ora e 40 minuti nel termociclatore.

4. Aggiungere 5 µl di PCR Primers alle librerie catturate nella provetta PCR.
5. Aggiungere 20 µl di PCR Mix alla provetta.
6. Pipettare la miscela 10 volte.
7. Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
8. Posizionare la provetta/strip nel termociclatore ed eseguire il programma PCR Post-Arricchimento utilizzando il coperchio riscaldato a 105 °C, e il volume di reazione 50 µl:

N.	Fase	Temperatura	Durata	Numero di cicli
1	Denaturazione	98 °C	30 secondi	1
2	Denaturazione	98 °C	1 minuto	17
3	Appaiamento	60 °C	30 secondi	
4	Amplificazione	72 °C	3 minuti	
5	Amplificazione finale	72 °C	5 minuti	1

N.	Fase	Temperatura	Durata	Numero di cicli
6	Sospensione finale	10 °C	Sospensione	1

NOTA: punto di arresto sicuro. Le librerie possono essere conservate da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 settimana.

NOTA: se si procede immediatamente alla purificazione, assicurarsi che le Purification Beads siano a temperatura ambiente prima di utilizzarle.

5.6 Purificazione PCR post arricchimento

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
Purification Beads	da 2 °C a 8 °C BOX 5	27	Portare a temperatura ambiente, per almeno 30 minuti.
Acqua sterile	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	80	Non è necessaria alcuna preparazione.
Etanolo al 100%	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	320	Preparare etanolo all'80%, come descritto di seguito.
Resuspension Buffer	da 2 °C a 8 °C BOX 5	32	Portare a temperatura ambiente. Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi.

2. Preparare etanolo fresco all'80% (2 lavaggi per campione) utilizzando 480 µl di etanolo al 100% e 120 µl di Acqua Sterile (è incluso un volume in eccesso).
3. vortexare e centrifugare brevemente tutti i reagenti prima di utilizzarli.
4. Prelevare le provette per microcentrifuga da 1,5 ml necessarie.

NOTA: Il processo richiede approssimativamente **30** minuti.

5. Per ogni reazione di purificazione, aggiungere 27 µl di Purification Beads vortexate accuratamente in una provetta fresca da 1,5 ml.
6. **Trasferire** 45 µl di ogni reazione PCR post-arricchimento nella rispettiva provetta contenente le Purifications Beads.
7. Vortexare ogni provetta ad alta velocità per 10 secondi, 3 volte.
8. Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
9. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
10. Posizionare la provetta sul magnete per 1 minuto, o fino a quando tutte le bead non si saranno raccolte sullo stesso.
11. Utilizzando una pipetta, rimuovere e scartare il surnatante, evitando di toccare le bead.
12. Tenendo la provetta sul magnete, lavare due volte con etanolo all'80%:
 - a) Aggiungere 200 µl di etanolo all'80% ad ogni provetta,
 - b) Incubare a temperatura ambiente per 30 secondi,
 - c) Utilizzando una pipetta, aspirare e scartare tutto il surnatante,
 - d) Ripetere le fasi da a) a c) per un totale di 2 lavaggi.
13. Rimuovere tutto il surnatante rimanente con la pipetta P20.
14. Lasciare asciugare all'aria la provetta per 5 minuti a temperatura ambiente, in modo tale da consentire l'evaporazione dell'etanolo residuo.

15. Togliere la provetta dal magnete e aggiungere 32 μ L di Resuspension Buffer ad ogni provetta per eluire i frammenti target.
16. Vortexare ogni provetta ad alta velocità per 10 secondi, 3 volte.
17. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
18. Centrifugare rapidamente a impulsi la provetta.
19. Posizionare le provette sul magnete per 1 minuto, o fino a quando tutte le bead non si saranno raccolte sullo stesso.
20. **Trasferire** 30 μ l di surnatante in una nuova provetta da 1,5 ml .

NOTA: punto di arresto sicuro. Le librerie possono essere conservate da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 mese.

5.7 Quantificazione Qubit

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (μ l)	Preparazione richiesta
Qubit BR buffer	da -25 °C a 30 °C Fornito dall'utente	199	Non è necessaria alcuna preparazione.
Qubit BR dye	da -25 °C a 30 °C Fornito dall'utente	1	Non è necessaria alcuna preparazione.
BR Standard n.1	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	10	Portare a temperatura ambiente.
BR Standard n.2	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	10	Portare a temperatura ambiente.

2. Prelevare le provette Qubit necessarie e le provette da 1,5 ml o 5 ml al fine di preparare la soluzione di lavoro, a seconda del volume richiesto.
3. preparare 2 provette per gli standard e una per ogni pool.
4. Preparare la soluzione di lavoro Qubit da 200 μ l utilizzando 199 μ l di QuBit buffer e 1 μ l di QuBit dye per campione/standard da quantificare.
5. Vortexare la soluzione di lavoro per 2-3 secondi, e poi centrifugare ad impulsi.
6. Dosare **190 μ l** di soluzione di lavoro in ciascuna delle provette Standard.
7. Dosare **198 μ l** di soluzione di lavoro in ciascuna delle provette Pool.
8. Dosare **10 μ l** di soluzione Standard in ciascuna delle rispettive provette Standard.
9. Dosare **2 μ l** di ciascun pool nella rispettiva provetta.
10. Vortexare tutte le provette per 2-3 secondi e poi centrifugare ad impulsi.
11. Incubare le provette per 2 minuti a temperatura ambiente.
12. Inserire le provette nel Fluorimetro Qubit ed eseguire le letture (vedere il protocollo del produttore Qubit per ulteriori informazioni).
13. Registrare le letture Qubit nella tabella del foglio di lavoro al fine di calcolare la concentrazione media.

5.8 Visualizzazione TapeStation (Opzionale)

NOTA: Sistemi alternativi per la visualizzazione del frammento, come Fragment Analyzer, Bioanalyzer o similari, possono essere utilizzati dopo la validazione da parte dell'utente.

1. Prelevare i reagenti necessari (il volume è specificato nella tabella sottostante) e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Volume per Pool (µl)	Preparazione richiesta
Ladder D1000	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	1	Portare a temperatura ambiente.
D1000 Sample Buffer	da 2 °C a 8 °C Fornito dall'utente	3	Portare a temperatura ambiente.

- Prelevare lo ScreenTape necessario, le strisce ottiche della provetta TapeStation e i tappi.
- Trasferire 1 µl di ogni libreria arricchita in una nuova provetta.
- Aggiungere 1 µl di Ladder D1000 in una provetta di riferimento.
- Aggiungere 3 µL di D1000 sample buffer a ciascuna provetta di libreria arricchita e alla provetta di riferimento.
- Sigillare tutte le provette con i tappi.
- Vortexare accuratamente tutte le provette utilizzando il vortex IKA a 2000 rpm per 1 minuto.
- Centrifugare brevemente per assicurarsi che tutti i campioni si trovino sul fondo delle provette.
- Caricare le provette campione nello strumento TapeStation 2200.
- Selezionare le provette desiderate sul software TapeStation 2200 Controller e processare i campioni (consultare il manuale utente TapeStation per ulteriori informazioni).
- Al termine del processo, avviare il software di analisi TapeStation Analysis per visualizzare i risultati (consultare il manuale utente TapeStation per ulteriori informazioni).
- Registrare i risultati nella tabella del foglio di lavoro.

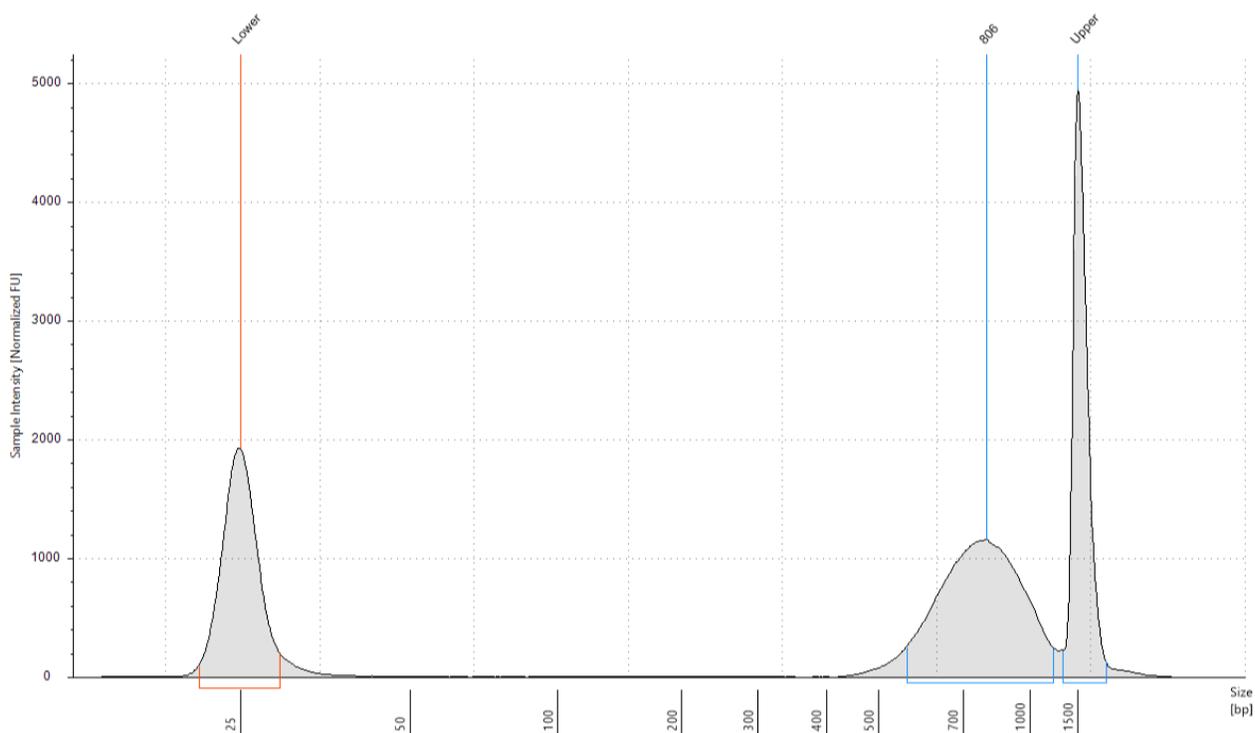


Figura 5.8.1: Immagine rappresentativa della traccia TapeStation per il pool libreria arricchito finale.

6. Sequenziamento

6.0 Introduzione al protocollo

Le librerie AlloSeq Tx sono validate per il sequenziamento sui sequenziatori Illumina, tra cui: MiSeq, MiniSeq o iSeq, dove i dati di sequenza risultanti sono emessi in formato di file fastq. la flow cell da utilizzare dipende dal numero di campioni processati nel pool, come riportato nella sezione *1.3 AlloSeq Tx Targeted Gene Content* della presente IFU.

- Attenersi al protocollo AlloSeq Tx riportato di seguito utilizzando i parametri specificati.
- Prima di procedere, controllare il contenuto del kit e assicurarsi di disporre dei materiali consumabili e delle attrezzature necessarie.
- A titolo esemplificativo, i passaggi del protocollo relativi al sequenziamento sono descritti in dettaglio anche in *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD* (Flusso di lavoro Early Pooling) e *IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD* (Flusso di lavoro Original). I riferimenti al foglio di lavoro nel capitolo 6 attengono a tale foglio di lavoro.
- I sequenziatori devono essere caricati conformemente al protocollo dello strumento, come riportato nelle istruzioni seguenti.
- Se si utilizza uno strumento MiSeq, si suggerisce di eseguire il lavaggio con candeggina (ipoclorito di sodio) conformemente alle istruzioni della guida utente MiSeq al fine di ottenere una prestazione ottimale.

NOTA: Il file .csv di importazione del campione di sequenziamento formattato Illumina può essere generato e salvato come descritto in *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD* (Foglio di Lavoro "1.0 Sample_Prep"), da "1.2 SampleSheet" (Flusso di Lavoro Early Pooling) oppure da *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD* (Foglio di Lavoro "1.0 Sample_Prep"), da "1.2 SampleSheet" (Flusso di Lavoro Original).

6.1 Preparazione del controllo interno PhiX

1. Prelevare i reagenti necessari e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Preparazione richiesta
10 nm del controllo interno PhiX	da -15 °C a -25 °C Fornito dall'utente	Scongellare e successivamente conservare su ghiaccio.
2N NaOH	da -15 °C a -25 °C BOX 4	Portare a temperatura ambiente.
Acqua sterile	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	Non è necessaria alcuna preparazione.
Resuspension Buffer	da 2 °C a 8 °C BOX 5	Portare a temperatura ambiente.
HT1 (con cartuccia di sequenziamento)	da -15 °C a -25 °C Fornito dall'utente	Scongellare e successivamente conservare su ghiaccio.

2. Preparare una soluzione di lavoro 0,2 N NaOH utilizzando 45 µl di acqua sterile e 5 µl di 2N NaOH.

NOTA: la soluzione NaOH assorbirà rapidamente la CO₂ dall'atmosfera, alterando il pH e le prestazioni del reagente. Assicurarsi che la provetta 2N NaOH sia sigillata quando non è utilizzata.

3. Vortexare e centrifugare brevemente tutti i reagenti prima di utilizzarli.
4. Prelevare le provette per microcentrifuga da 1,5 ml necessarie.

6.1.1 Diluire e denaturare il controllo interno PhiX per esecuzioni MiSeq e MiniSeq

1. Aggiungere 3 µl di Resuspension Buffer alla provetta nuova.
2. Aggiungere 2 µl di 10 nM del controllo interno PhiX alla provetta.
3. Aggiungere 5 µl di soluzione di lavoro 0,2N NaOH (come diluito in precedenza) nella provetta.
4. Vortexare e centrifugare a impulsi la provetta.
5. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
6. Aggiungere 990 µl di HT1 pre-raffreddato alla provetta contenente il PhiX denaturato.
7. **Invertire per miscelare** (NON vortexare) e successivamente centrifugare a impulsi la provetta.

NOTA: il risultato è 1 ml di 20 pm PhiX denaturato pronto per l'uso su corse MiSeq. Per corse sul MiniSeq effettuare la diluizione aggiuntiva impostata a 5 pM come descritto di seguito. Il controllo interno PhiX denaturato può essere conservato da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 mese.

6.1.2 Per esecuzioni MiniSeq, diluire ulteriormente il controllo interno PhiX a 5 pM

1. Inserire il volume di diluizione desiderato nel foglio di lavoro per calcolare la diluizione appropriata per il controllo interno PhiX.
2. Diluire il controllo interno PhiX a 5 pM combinando il volume del reagente (vedi foglio di lavoro) in una provetta per microcentrifuga.
3. **Invertire per miscelare** (NON vortexare) e successivamente centrifugare a impulsi la provetta.

NOTA: il controllo interno PhiX denaturato può essere conservato da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 mese.

6.1.3 Per esecuzioni iSeq, Diluire il controllo interno PhiX a 20 pM(Senza Denaturazione)

1. Inserire il volume di diluizione desiderato nel foglio di lavoro per calcolare la diluizione appropriata per il controllo interno PhiX.
2. Diluire il controllo interno PhiX a 20 pm combinando il volume del reagente (vedi foglio di lavoro) in una provetta per microcentrifuga.
3. **Invertire per miscelare** (NON vortexare) e successivamente centrifugare a impulsi la provetta.

NOTA: il controllo interno PhiX denaturato può essere conservato da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 mese.

6.2 Diluire e denaturare per MiSeq

1. Prelevare i reagenti necessari e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Preparazione richiesta
Pool campione arricchito AlloSeq Tx	da -15 °C a -25 °C Preparazione utente	Scongellare e successivamente conservare su ghiaccio.
2N NaOH	da -15 °C a -25 °C BOX 4	Portare a temperatura ambiente.
Acqua sterile	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	Non è necessaria alcuna preparazione.
HT1 (con cartuccia MiSeq)	da -15 °C a -25 °C	Scongellare e successivamente conservare su ghiaccio.

Reagente	Modalità di conservazione	Preparazione richiesta
	Fornito dall'utente	
Resuspension Buffer	da 2 °C a 8 °C BOX 5	Portare a temperatura ambiente.
20 pm del controllo interno PhiX (precedentemente diluito)	da -15 °C a -25 °C Fornito dall'utente	Scongelare e successivamente conservare su ghiaccio.

2. Preparare una soluzione di lavoro 0,2N NaOH utilizzando 45 µl di acqua sterile e 5 µl di 2N NaOH.

NOTA: la soluzione NaOH assorbirà rapidamente la CO₂ dall'atmosfera, alterando il pH e le prestazioni del reagente. Assicurarsi che la provetta 2N NaOH sia sigillata quando non è utilizzata.

3. Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
4. Prelevare le provette per microcentrifuga da 1,5 ml necessarie.
5. Inserire la concentrazione del pool campione arricchito, la dimensione del frammento (si stima circa 800 bp) e il volume totale desiderato (consigliato 30 µl) a 4 nM nel foglio di lavoro, che consente di calcolare la diluizione appropriata per la libreria.
6. Diluire il pool campione a 4 nM combinando i reagenti (vedere il foglio di lavoro) in una provetta per microcentrifuga.
7. Vortexare e centrifugare a impulsi il pool campione diluito prima di utilizzarlo ulteriormente.
8. Aggiungere 5 µl di pool campione arricchito a 4 nM alla provetta fresca.
9. Aggiungere 5 µl di soluzione di lavoro 0,2N NaOH (come diluito in precedenza) nella provetta.
10. Vortexare e centrifugare a impulsi la provetta.
11. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
12. Aggiungere 990 µl di HT1 pre-raffreddato alla provetta contenente il pool campione denaturato arricchito.
13. **Invertire per miscelare** (NON vortexare) e successivamente centrifugare a impulsi la provetta.

NOTA: il risultato è 1 ml di un pool campione da 20 pM. I pool possono essere conservati da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 mese.

14. Inserire il numero di pool da combinare per il sequenziamento, la concentrazione di carico (consigliato a 12 pm), il picco % desiderato di controllo interno PhiX (consigliato minimo 1%) e il volume di carico (minimo 600 µl) nel foglio di lavoro, in modo tale da calcolare la diluizione appropriata per la libreria.
15. Diluire il pool campione per la concentrazione di carico combinando i reagenti (vedere il foglio di lavoro) in una provetta per microcentrifuga.
16. **Invertire per miscelare** (NON vortexare) e successivamente centrifugare a impulsi la provetta.
17. Conservare su ghiaccio fino a quando non si è pronti per il caricamento sulla cartuccia reagente MiSeq al fine di eseguire il sequenziamento.

NOTA: i pool possono essere conservati da -15 °C a -25 °C per un massimo di 48 ore prima del sequenziamento.

18. Procedere al caricamento del MiSeq in base al protocollo dello strumento.

6.3 Diluire e denaturare per MiniSeq

1. Prelevare i reagenti necessari e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Preparazione richiesta
Pool campione arricchito AlloSeq Tx	da -15 °C a -25 °C Preparazione utente	Scongelare e successivamente conservare su ghiaccio.
2N NaOH	da -15 °C a -25 °C BOX 4	Portare a temperatura ambiente.
Acqua sterile	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	Non è necessaria alcuna preparazione.
HT1 (con cartuccia di sequenziamento)	da -15 °C a -25 °C Fornito dall'utente	Scongelare e successivamente conservare su ghiaccio.
Resuspension Buffer	da 2 °C a 8 °C BOX 5	Portare a temperatura ambiente.
200 mM Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato, pH 7.0	da 15 °C a 30 °C Fornito dall'utente	Non è necessaria alcuna preparazione.
5 pM del controllo interno PhiX (precedentemente diluito)	da -15 °C a -25 °C Fornito dall'utente	Scongelare e successivamente conservare su ghiaccio.

2. Preparare una soluzione di lavoro 0,1N NaOH utilizzando 95 µl di acqua sterile e 5 µl di 2N NaOH.

NOTA: la soluzione NaOH assorbirà rapidamente la CO₂ dall'atmosfera, alterando il pH e le prestazioni del reagente. Assicurarsi che la provetta 2N NaOH sia sigillata quando non è utilizzata.

3. Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
4. Prelevare le provette per microcentrifuga da 1,5 ml necessarie.
5. Inserire la concentrazione del pool campione arricchito, la dimensione del frammento (si stima circa 800 bp) e il volume totale desiderato (consigliato 100 µl) a 1 nM nel foglio di lavoro, che consente di calcolare la diluizione appropriata per la libreria.
6. Diluire il pool campione a 1 nM combinando i reagenti (vedere il foglio di lavoro) in una provetta per microcentrifuga.
7. Vortexare e centrifugare a impulsi il pool campione diluito prima di utilizzarlo ulteriormente.
8. Aggiungere 5 µl di pool campione arricchito a 1 nM alla provetta fresca.
9. Aggiungere 5 µl di soluzione di lavoro 0,1N NaOH (come diluito in precedenza) nella provetta.
10. Vortexare e centrifugare a impulsi la provetta.
11. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
12. Aggiungere 5 µl di 200 mM di Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato, pH7.0
13. Vortexare e centrifugare a impulsi la provetta.
14. Aggiungere 985 µl di HT1 pre-raffreddato alla provetta contenente il pool campione denaturato arricchito.
15. **Invertire per miscelare** (NON vortexare) e successivamente centrifugare a impulsi la provetta.

NOTA: il risultato è 1 ml di un pool campione da 5 pM. I pool possono essere conservati da -15 °C a -25 °C per un periodo massimo di 1 mese.

16. Inserire il numero di pool da combinare per il sequenziamento, la concentrazione di carico (consigliato a 1,6 pM, il picco % desiderato di controllo interno PhiX (consigliato minimo 1%) e il volume di carico (minimo 500 µl) nel foglio di lavoro, in modo tale da calcolare la diluizione appropriata per la libreria.

17. Diluire il pool campione per la concentrazione di carico combinando i reagenti (vedere il foglio di lavoro) in una provetta per microcentrifuga.
18. **Invertire per miscelare** (NON vortexare) e successivamente centrifugare a impulsi la provetta.
19. Conservare su ghiaccio fino a quando non si è pronti per il caricamento sulla cartuccia reagente MiniSeq al fine di eseguire il sequenziamento.

NOTA: i pool possono essere conservati da -15 °C a -25 °C per un massimo di 48 ore prima del sequenziamento.

20. Procedere al caricamento del MiniSeq in base al protocollo dello strumento.

6.4 Diluire per iSeq

1. Prelevare i reagenti necessari e prepararli secondo la tabella:

Reagente	Modalità di conservazione	Preparazione richiesta
Pool campione arricchito AlloSeq Tx	da -15 °C a -25 °C Preparazione utente	Scongelare e successivamente conservare su ghiaccio.
Resuspension Buffer	da 2 °C a 8 °C BOX 5	Portare a temperatura ambiente.
20 pm del controllo interno PhiX (precedentemente diluito)	da -15 °C a -25 °C Fornito dall'utente	Scongelare e successivamente conservare su ghiaccio.

2. Vortexare tramite miscelatore vortex e centrifugare ad impulsi tutti i reagenti prima di utilizzarli.
3. Prelevare le provette per microcentrifuga da 1,5 ml necessarie.
4. Inserire la concentrazione del pool campione arricchito, la dimensione del frammento (si stima circa 800 bp) e il volume totale desiderato (consigliato 100 µl) a 1 nM nel foglio di lavoro, che consente di calcolare la diluizione appropriata per la libreria.
5. Diluire il pool campione a 1 nM combinando i reagenti (vedere il foglio di lavoro) in una provetta per microcentrifuga.
6. Vortexare e centrifugare a impulsi il pool campione diluito prima di utilizzarlo ulteriormente.
7. Inserire il numero di pool da combinare per il sequenziamento, la concentrazione di carico (consigliato a 200 pM, il picco % desiderato di controllo interno PhiX (consigliato minimo 1%) e il volume di carico (minimo 100 µl) nel foglio di lavoro, in modo tale da calcolare la diluizione appropriata per la libreria.
8. Diluire il pool campione per la concentrazione di carico combinando i reagenti (vedere il foglio di lavoro) in una provetta per microcentrifuga.
9. **Invertire per miscelare** (NON vortexare) e successivamente centrifugare a impulsi la provetta.
10. Conservare su ghiaccio fino a quando non si è pronti per il caricamento sulla cartuccia reagente iSeq al fine di eseguire il sequenziamento.

NOTA: i pool possono essere conservati da -15 °C a -25 °C per un massimo di 48 ore prima del sequenziamento.

11. Procedere nel caricare 20 µl di pool del campione diluito nella cartuccia iSeq attenendosi al protocollo dello strumento.

7. Analisi della sequenza

I file Fastq ottenuti devono essere analizzati utilizzando il software AlloSeq Assign. Le procedure per il corretto utilizzo del software AlloSeq Assign sono riportate nel documento *IFU094_AlloSeq Assign IFU CE IVD*.

8. Guida alla risoluzione dei problemi

PROBLEMA	CAUSA(E) POSSIBILE(I)	Soluzioni
Resa bassa o nulla derivante dalla preparazione della libreria (rilevata dalla quantificazione Qubit)	DNA in ingresso di scarsa qualità o in bassa concentrazione	Testare la qualità del DNA tramite elettroforesi su gel. Il DNA intatto dovrebbe essere di c.ca 3 kb con poca o nessuna evidenza di sbavatura sul gel. Estrarre nuovamente il DNA e ripetere la procedura, se possibile.
	Librerie perse durante la cattura	Consultare il protocollo. Assicurarsi che le fasi di purificazione trattengano il supernatante e che le fasi di scarto del supernatante siano seguite correttamente. Assicurarsi che la concentrazione di etanolo sia corretta. L'utilizzo di solo acqua o un contenuto eccessivo di acqua può eluire il DNA prematuramente.
	Librerie non eluite da bead di cattura	Consultare il protocollo. Assicurarsi che l'ordine dei buffer di eluizione utilizzati sia corretto. Assicurarsi di rimuovere adeguatamente i reagenti/buffer prima della ri-sospensione e dell'eluizione. Evitare di asciugare eccessivamente il DNA o i pellet DNA legati alle bead durante le fasi di asciugatura. La prolungata asciugatura dei pellet di DNA può ostacolare la ri-sospensione e la conseguente resa.
	Omessa aggiunta di reagente(i) essenziale(i) (ad es. bead, index primer, master mix PCR, ecc.); o utilizzo non in ordine corretto.	Consultare il protocollo. Assicurarsi che i reagenti siano stati aggiunti nell'ordine corretto e al volume appropriato. Controllare il(i) volume(i) residuo(i) di reagente(i) per accertarsi che non sia(no) presente(i) una quantità eccessiva di residuo(i). Ripetere la procedura, se previsto.
	Incubazione o condizioni di ciclo non appropriate	Verificare le condizioni del termociclatore: Programma di tagmentazione Programma di indicizzazione PCR
Resa bassa o nulla derivante dall'arricchimento (rilevata dalla quantificazione Qubit)	Tipo di campione primario utilizzato non appropriato.	Evitare di utilizzare campioni di sangue intero contenenti eparina. Estrarre nuovamente il DNA dall'ACD o dall'EDTA conservando il sangue intero e ripetere la procedura, ove possibile.
	Librerie perse durante la cattura	Esaminare attentamente il protocollo e assicurarsi che le fasi richiedenti la presenza del supernatante e quelle in cui è necessario scartare il supernatante siano adeguatamente osservate. Assicurarsi che le Purification Beads diluite si trovino nella concentrazione appropriata; e che le Purification Beads non diluite (non residuali di bead diluite) siano impiegate dopo la selezione della dimensione.

PROBLEMA	CAUSA(E) POSSIBILE(I)	Soluzioni
	Le librerie non sono state eluite dalle bead di cattura	Assicurarsi che l'ordine dei buffer di eluizione utilizzati sia corretto. Assicurarsi di rimuovere adeguatamente i reagenti/buffer prima della ri-sospensione e dell'eluizione. Evitare di asciugare eccessivamente il DNA o i pellet DNA legati alle bead durante le fasi di asciugatura. La prolungata asciugatura dei pellet di DNA può ridurre la capacità di ri-sospendere la soluzione e la conseguente resa.
	Incubazione o condizioni di ciclo non appropriate	Verificare le condizioni del termociclatore: Programma di ibridazione Programma PCR post-arricchimento
Frammenti di dimensioni non appropriate derivanti dalla preparazione o dall'arricchimento della libreria (rilevati tramite l'analisi dei frammenti)	Rapporto errato tra campione e Purification Beads.	Ripetere il protocollo. Assicurarsi che durante le fasi in protocollo di selezione delle dimensioni e di purificazione sia utilizzata la corretta concentrazione di bead.
Sequenza non corretta		Verificare che il protocollo sia stato osservato. Consultare il relativo manuale operativo del rispettivo modello di sequenziatore utilizzato.
Bassa copertura per loci target nell'Assign malgrado l'elevata resa di arricchimento.	Frammenti non specifici catturati a causa della temperatura più bassa durante la cattura e le fasi di lavaggio riscaldate.	Assicurarsi che il sistema Hybex utilizzato per le fasi di lavaggio riscaldate sia calibrato e mantenuto. Lavorare rapidamente durante le fasi di lavaggio riscaldate per evitare che la temperatura pool scenda sensibilmente.

9. Informazioni di supporto

Il protocollo descritto in questo manuale presuppone che l'utente abbia esaminato il contenuto di questa sezione, verificato e acquisito tutti i materiali consumabili e le attrezzature necessarie.

Licenza

I kit AlloSeq Tx includono Nextera Flex per reagenti di arricchimento prodotti da Illumina Inc. distribuiti da CareDx Pty Ltd.

Materiali consumabili e attrezzature richieste ma non fornite

I materiali consumabili e le attrezzature elencate di seguito sono indispensabili per l'esecuzione del saggio, ma non sono inclusi nel kit AlloSeq Tx.

Il protocollo è stato ottimizzato e validato utilizzando gli elementi elencati. Le prestazioni comparabili non sono garantite quando si utilizzano materiali consumabili e attrezzature alternative.

Materialie consumabile	Fornitore/N. in catalogo
Acqua pura-PCR	Sigma-Aldrich, W3500
Etanolo assoluto per la biologia molecolare	Fornitore generico per laboratori
Kit saggio Qubit™ dsDNA BR	Thermo Fisher Scientific, Q32850 oppure Q32853
Provette di Saggio Qubit™	Thermo Fisher Scientific, Q32856

Materiale consumabile	Fornitore/N. in catalogo
D1000 ScreenTape (opzionale)	Agilent Technologies, 5067-5584
Reagenti D1000 (opzionali)	Agilent Technologies, 5067-5585
Piastre Campione a 96 Pozzetti (opzionale)	Agilent Technologies, 5067-5150
Rivestimento Sigillante della Piastra a 96 pozzetti (opzionale)	Agilent Technologies, 5067-5154
Strisce ottiche della provetta (8 x strisce) (opzionale)	Agilent Technologies, 401428
Tappi delle strisce ottiche della provetta (8 x strisce) (opzionale)	Agilent Technologies, 401425
È necessario disporre di uno dei seguenti kit di reagenti di sequenziamento:	
<ul style="list-style-type: none"> • MiSeq V2 Standard (300 cicli) • MiSeq V2 Micro (300-cicli) • MiSeq V2 Nano (300-cicli) • MiniSeq Mid Output Kit (300-cicli) • Reagente iSeq 100 i1 v2 (300 cicli) 	<ul style="list-style-type: none"> • Illumina, MS-102-2002 • Illumina, MS-103-1002 • Illumina, MS-103-1001 • Illumina, FC-420-1004 • Illumina, 20031371
PhiX Control v3	Illumina, FC-110-3001
Puntali per pipette con barriera 20 µl	Fornitore generico per laboratori
Puntali per pipette con barriera 200 µl	Fornitore generico per laboratori
Puntali per pipette con barriera 1000 µl	Fornitore generico per laboratori
Provette da microcentrifuga da 1,5 ml	Fornitore generico per laboratori
Provette 5 ml	Fornitore generico per laboratori
Provette coniche per centrifuga da 15 ml	Fornitore generico per laboratori
Serbatoi reagenti da 25 ml	Fornitore generico per laboratori
Strip da 8 provette PCR da 0,2 ml con tappi	Fornitore generico per laboratori
Piastre PCR a 96 pozzetti	Fornitore generico per laboratori
Sigillanti adesivi Microseal "B"	Bio-Rad, MSB1001
Abgene™ 96 Well 0,8 ml Polypropylene Deepwell Storage Plate (piastra MIDI, solo flusso di lavoro Original)	Thermo Fisher, AB0859 oppure AB0765
Ipoclorito di sodio (NaOCl) per il lavaggio post-corsa del sequenziamento (opzionale)	Sigma, 239305
Attrezzatura	
Pipette da 20 µl	Fornitore generico per laboratori
Pipette da 200 µl	Fornitore generico per laboratori
Pipette da 1000 µl	Fornitore generico per laboratori
Pipette multicanale da 20 µl	Fornitore generico per laboratori
Pipette multicanale da 200 µl	Fornitore generico per laboratori
Microcentrifuga	Fornitore generico per laboratori
Centrifuga per micropiastre	Fornitore generico per laboratori
Agitatore Vortex	Fornitore generico per laboratori
Rotolo di pellicola sigillante	Fornitore generico per laboratori
Piastra di Fissazione Indice	Illumina, FC-130-1005
Uno dei seguenti rack magnetici:	
<ul style="list-style-type: none"> • DynaMag™-2 Magnet • MagJET Separation Rack, 2 x provette da1,5 ml 	Thermo Fisher, 12321D Thermo Fisher, MR01
Magnetic Stand-96	Thermo Fisher, AM10027
BioShake iQ oppure BioShake XP	BioShake iQ, 1808-0506 BioShake XP, 1808-0505
Agilent 2200 TapeStation System (opzionale)	Agilent Technologies
Fluorimetro Qubit	Thermo Fisher
Uno dei seguenti termociclatori a 96 pozzetti:	
<ul style="list-style-type: none"> • Veriti™ 96-Well Thermal Cyclers • Eppendorf Thermo Cyclers 	Thermo Fisher, 4375786 Eppendorf, 6325000560
Sistema Hybex	SciGene, 1057-30-2

Materiale consumabile**Fornitore/N. in catalogo**

Blocco provette da 1,5 ml Hybex (provette 32 x 1,5 ml).	SciGene, 1057-34-0
Uno dei seguenti sequenziatori:	
• Illumina MiSeq	Illumina, SY-410-1003
• Illumina MiniSeq	Illumina, SY-420-1001
• Illumina iSeq	Illumina, 20021532

10. Contatti

Produttore:

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

Distribuito da:

Asia Pacifica (APAC)
CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Australia, 6160.
Tel: +61-8-9336-4212
E-mail: orders-aus@caredx.com
Sito Web: <http://www.caredx.com>

Europa, Medio Oriente e Africa (EMEA)
CareDx AB,
Franzégatan 5, SE-112 51 Stoccolma, Svezia.
Tel: +46-8-508 939 00
Fax: +46-8-717 88 18
E-mail: orders-se@caredx.com
Website: <http://www.caredx.com/>

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

Assistenza tecnica:

E-mail: techsupport-global@caredx.com

Per ottenere ulteriori informazioni si rimanda al sito Web di CareDx (<https://www.caredx.com/contact-us/>).

Prodotti correlati:

IVD a marcatura CE:
Assegnazione AlloSeq

11. Bibliografia

1. Informazioni tecniche Illumina. **Nextera XT library prep: tips and troubleshooting** (06/29/18)
2. Informazioni tecniche Illumina. **DNA/RNA isolation considerations for Illumina library preparation kits.** (21/12/2018)
3. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. **PCR inhibitors – occurrence, properties and removal.** 2012 J Appl Micro. 113:1014-26 (consultare anche le citazioni contenute)
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 (consultare anche le citazioni contenute)
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.

Cronologia della procedura

Versione	Data	Modifica	Autorizzata da
1.0	19 feb 2020	Prima versione dell'AlloSeq Tx IFU CE. Rilasciata da E. Naughton il 19 febbraio 2020	L. Westwood
1.1	28 apr 2020	Aggiunto il saggio AlloSeq Tx che sequenzia frammenti di DNA con una dimensione media di 700 bp, il che significa che i polimorfismi superiori a 700 bp non possono essere scaglionati; ciò può causare ambiguità eterozigoti per la sezione limitazioni. Pubblicato da E. Naughton il 29 aprile 2020	L. Westwood
1.2	08 mag 2020	Aggiornamento relativo alle sostanze interferenti. Ripubblicato da E. Naughton l'8 maggio 2020	L. Westwood
1.3	13 maggio 2020	Aggiunta Biotina alla tabella delle sostanze interferenti. Aggiunte informazioni sul campione di controllo alla sezione 1.9. Ripubblicato da E. Naughton il 14 maggio 2020	L. Westwood
1.4	20 mag 2020	Aggiornata la sezione 1.4 dei Contenuti del kit AlloSeq Tx e requisiti di conservazione con le seguenti correzioni: 2x provette per Tagmentation Wash Buffer, 2x provette per Capture Wash Buffer. Ripubblicato da E. Naughton il 20 Maggio 2020	L. Westwood
1.5	05 giu 2020	Apportate le seguenti modifiche: - Corretto H714 nella tabella dei reagenti nella sezione 2.2, - Corretto il riferimento alla Cattura ibrida nella sezione 3.0, - Aggiunto il riferimento al controllo interno PhiX nei materiali consumabili. - Aggiunto il riferimento ai fogli di lavoro relativi ai punti 3.1.5 e 3.2.5. Ripubblicato da E. Naughton il 5 giugno 2020	L. Westwood
1.6	20 ott 2020	Aggiunta una nota sull'impiego di NaOH. Ripubblicato da E. Naughton il 20 ottobre 2020	H. Hogan
2.0	26Mar21	Distributore aggiornato da Vienna a Stoccolma nella sezione 8.0 come da CR 2020-097. Aggiornato il reagente iSeq v1 come discontinuo e sostituito con v2 nella sezione 7.0 come da CR 2020-077. Corretto da 25 a 12 cicli di congelamento e scongelamento nella sezione 1.4. Ripubblicato da S. Antony il 9 Apr 2021	S. Carnachan
3.0	6May21	Aggiornato quanto segue: <ul style="list-style-type: none"> Sezione 1: Sezione dei fogli di lavoro di supporto trasferita alla sezione 9; aggiunto IFU095-5. Inclusa la spiegazione relativa al flusso di lavoro Original rispetto a Early Pooling. Aggiunto contenuto genico mirato ASTX17.1(24)-B-IVD. Aggiornata formattazione della tabella dei contenuti del kit Tx. Aggiunto il riferimento al tampone buccale (RUO) Corretto il limite di rilevazione affinché indichi il DNA e non la concentrazione di DNA. Aggiunta l'avvertenza H318 per 2N NaOH, le avvertenze di pericolo H351 e H373 per le Capture Beads, l'avvertenza H351 per l'Hybridisation Buffer 1; aggiunte alla tabella le informazioni sulla sicurezza dello Stop Buffer. Sezione 2 – aggiunta la sezione Preparazione della Libreria (flusso di lavoro Early Pooling) Sezione 3 – aggiunta la sezione Cattura Ibrida (flusso di lavoro Early Pooling) Sezione 4.1 – descrizione aggiornata della preparazione del campione in modo tale da allinearsi al foglio di lavoro Sezione 4.2 – aggiunti gli indici Set B nella tabella, aggiornata la stima del tempo da 2 ore e 45 minuti a 1 ora e 50 minuti, cambiato il passaggio della centrifuga da 280 x g per 30 secondi a 100 x g per 10 secondi passaggio 9, 21f, cambiato il passaggio della centrifuga da 280 x g per 1 minuto a 100 x g per 10 secondi passaggio 29, cambiato il 	S. Carnachan

Versione	Data	Modifica	Autorizzata da
		<p>passaggio della centrifuga da 280 x g per 10 secondi a 100 x g per 10 secondi, passaggio 36, aggiunto il commento "ripetere l'agitazione come al passaggio 35" al passaggio 36</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sezioni 4.4/5.7 – incluso il chiarimento del Broad Range (BR) in tutte le tabelle dei reagenti Qubit • Sezione 5.3 – Incluso il commento di chiarimento, "Sospensione (non superare le 18 ore a 62 °C, incluso il passaggio n. 4)" nella tabella del programma di ibridazione • Sezione 5.8 – corretti i riferimenti piastra/sigillatura TapeStation a provette/tappi • Sezione 6.0 – tabella rimossa. Questa tabella compare nella Sezione 1.1 • Sezione 6.2 – volume totale MiSeq desiderato modificato da 100 uL a 30 uL per conformarsi al foglio di lavoro • Sezione 6.4 – commento volto a puntualizzare che solo 20 ul di 100 ul di pool diluito viene caricato su iSeq • Sezione 9 – aggiunto il disclaimer "solo flusso di lavoro Original" sulla piastra MIDI, aggiunto ipoclorito di sodio (NaOCl) per il lavaggio post-corsa di sequenziamento • Sezione 9 – Cambiati i nomi dei reagenti MiSeq al fine di conformarsi ai dati di ordinazione Illumina. Aggiunto il kit di reagenti MiSeq v3 (600 cicli) per AlloSeq Tx 8, aggiunto il tubo Qubit e le informazioni di ordinabilità della/del provetta/tappo/piastra/rivestimento TapeStation <p>In generale: Aggiunto ASTX17.1(24)-B-IVD sulla pagina iniziale. Aggiunto "Riporre per la conservazione dopo l'uso in vista dei passaggi successivi." Suggestivi per i reagenti che devono essere conservati per i passaggi successivi, piccoli errori di formattazione, grammatica, punteggiatura e ortografia corretti in tutto il documento. Aggiunta una guida aggiuntiva per "vortexare accuratamente" tutte le istanze di utilizzo delle Purification Bead pulite in seguito al feedback del team sul campo. Corrette tutte le istanze di "hybex" in "Hybex" e "QuBit" in "Qubit" e "centrifugare a impulsi" in "centrifugare-a-impulsi". Aggiornata Sezione 2.2 e 4.2 nella tabella per lo Stop Buffer e corretta Preparazione Richiesta a "Nessuna preparazione richiesta". Aggiunto "importato da" e il simbolo conformemente a ISO 15223-1-2021 e IVDR. Riedito da L.Langley il 13 ottobre 2021</p>	
4.0	28Jan22	Grammatica corretta. Corretta la dichiarazione delle limitazioni sulla quantificazione dei controlli. Corrette le caratteristiche di prestazione per farle coincidere con il foglietto illustrativo. Correzioni effettuate in risposta a ZD-2445. Sulla base della valutazione sommativa, la sezione 2.3 fasi 8, 12, 18 e la sezione 4.3 fase 7 sono state aggiornate aggiungendo maggiori dettagli relativi alla miscelazione delle Tagmentation beads e delle Purification beads. Aggiornato il contenuto della scatola per rispecchiare la configurazione aggiornata del kit CR2020-096 (SCN 2021-08-13).	K. Hunter
5,0	31Mar22	Aggiunto Tx 17 (96) Set A e B ai codici prodotto, Contenuto Genico Mirato, Contenuto Kit. Aggiunto un approfondimento in tutta l'IFU per istruire all'uso dell'indice pre-piastrato, in particolare le sezioni 2.2 e 4.2. Rilasciata da E. Naughton il 27 aprile 2022	K. Hunter