

Manuel d'utilisation OGT

Universal NGS Workflow Solution V2

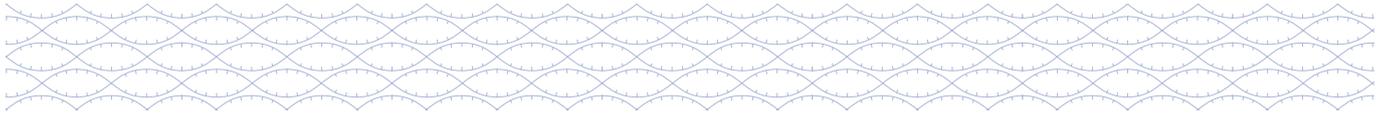
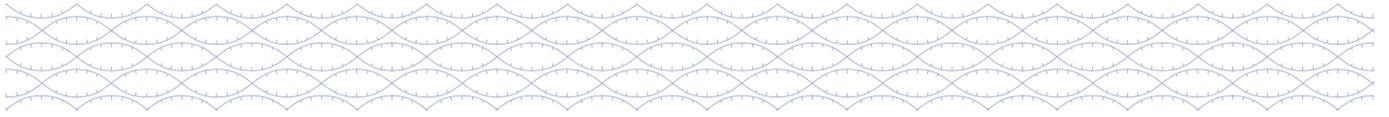
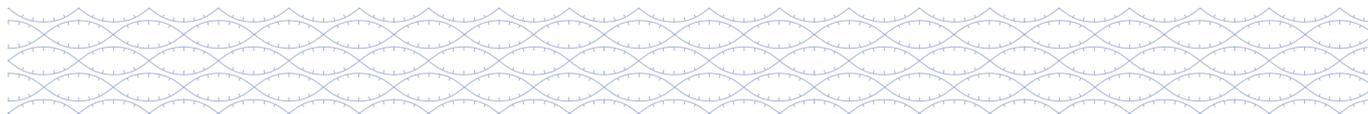


Table des matières





Introduction

La Universal NGS Workflow Solution V2 a été développée et optimisée pour être utilisée avec les amorces pour panels de gènes SureSeq™ et CytoSure® conçus par Oxford Gene Technology (OGT) pour permettre une détection précise d'une large gamme de variants.

La gamme OGT de séquençage de nouvelle génération (NGS) est compatible avec les chimies Illumina MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ et NovaSeq™.

Le kit de 24 réactions contient suffisamment de réactifs pour traiter un ensemble de 8 échantillons à trois reprises. Le kit de 96 réactions contient suffisamment de réactifs pour traiter un ensemble de 24 échantillons à quatre reprises.

Réactifs, consommables et équipements

Réactifs fournis par OGT

| Contenu | Conditions d'expédition/de stockage | N° de catégorie (24 réactions) | N° de catégorie (96 réactions) |
|---------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Universal Library Preparation Kit | Expédition à -20 °C, conservation à -20 °C | 770100-24 | 770100-96 |
| Universal Index Adapters | Expédition à -20 °C, conservation à -20 °C | 770200-24 | 770200-96 |
| Universal Hybridisation & Wash Kit V2 | Expédition à -20 °C, conservation à -20 °C | 770410-24 | 770410-96 |
| Pre-PCR Universal Bead Kit | Expédition à 4 °C, conservation à 4 °C | 770310-24 | 770310-96 |
| Post-PCR Universal Bead Kit | Expédition à 4 °C, conservation à 4 °C | 770315-24 | 770315-96 |
| Panel SureSeq CLL-CNV V3 | | | |
| SureSeq Reference DNA | Expédition à -20 °C, conservation à 4 °C | 770600 | - |

Universal Library Preparation Kit
770100-24 et 770100-96



Universal Index Adapters
770200-24 et 770200-96



Universal Hybridisation & Wash Kit V2
770410-24 et 770410-96



Pre-PCR Universal Bead Kit
770310-24 et 770310-96

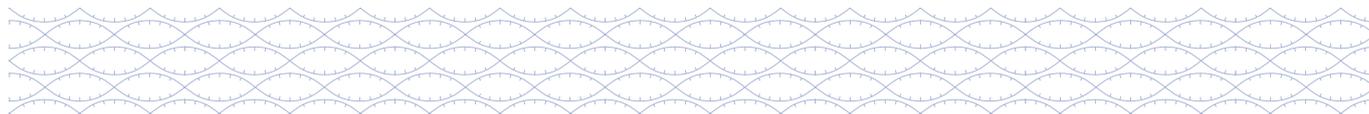


Post-PCR Universal Bead Kit
770315-24 et 770315-96



SureSeq Reference DNA
770600





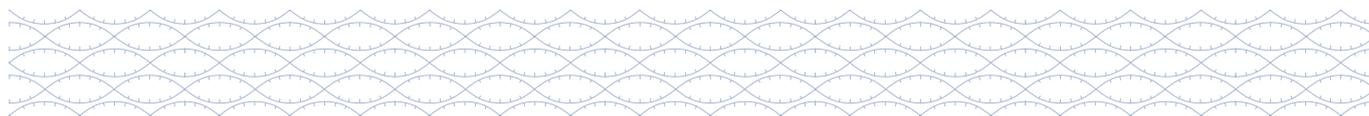
Réactifs, consommables et équipements

Réactifs fournis par l'utilisateur

| Composant | Fournisseur suggéré | N° de catégorie* |
|--|-------------------------------------|------------------|
| Éthanol 100 % de qualité biologie moléculaire | Fournisseur général de laboratoires | – |
| Eau de qualité biologie moléculaire | Fournisseur général de laboratoires | – |
| Solution d'hydroxyde de sodium 5,0 M de qualité biologie moléculaire | Fournisseur général de laboratoires | – |
| Qubit® dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit | Thermo Fisher Scientific | Q32854 |
| Qubit dsDNA Broad Range (BR) Assay Kit | Thermo Fisher Scientific | Q32853 |
| D1000 ScreenTape | Agilent Technologies | 5067-5582 |
| D1000 Reagents | Agilent Technologies | 5067-5583 |
| High Sensitivity D1000 ScreenTape | Agilent Technologies | 5067-5584 |
| High Sensitivity D1000 Reagents | Agilent Technologies | 5067-5585 |
| MiSeq Reagent Kit V2 (300-cycles) | Illumina [†] | MS-102-2002 |
| MiSeq Reagent Kit V3 (600-cycles) | Illumina [†] | MS-102-3003 |
| NextSeq 500/550 Mid-Output Kit v2.5 (300 cycles) | Illumina [†] | 20024905 |
| NextSeq 500/550 High-Output Kit v2.5 (300 cycles) | Illumina [†] | 20024908 |
| <i>Facultatif : Genomic DNA ScreenTape</i> | <i>Agilent Technologies</i> | <i>5067-5365</i> |
| <i>Facultatif : Genomic DNA Reagents</i> | <i>Agilent Technologies</i> | <i>5067-5366</i> |

* Les numéros de catalogue sont corrects pour le Royaume-Uni ; ils peuvent varier dans d'autres territoires. Pour plus d'informations, veuillez contacter support@ogt.com

[†] Selon le dispositif de séquençage utilisé.



Réactifs, consommables et équipements

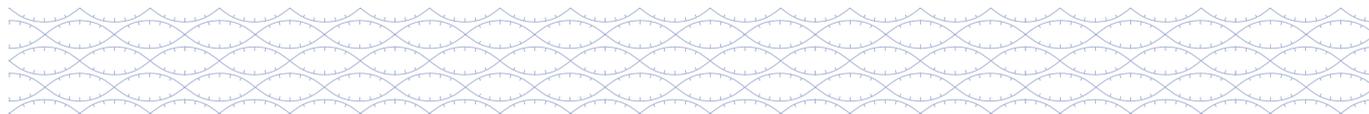
Consommables fournis par l'utilisateur

| Composant | Fournisseur suggéré | N° de catégorie* |
|---|--|------------------|
| Tubes pour dosage Qubit | Thermo Fisher Scientific | Q32856 |
| Tubes DNA LoBind® 1.5 ml | Eppendorf | 22431021 |
| Barrettes de tubes PCR et bouchons attachés | Starlab | A1402-3700 |
| Pointes de pipette stériles résistants aux aérosols avec filtres 2, 10, 20, 200, 1 000 µl | Fournisseur général de laboratoires | - |
| <i>Facultatif : tubes de 15 ml ou 50 ml</i> | <i>Fournisseur général de laboratoires</i> | - |
| <i>Facultatif : Réservoirs de réactifs à usage unique</i> | <i>Fournisseur général de laboratoires</i> | - |

Équipements fournis par l'utilisateur

| Composant | Étape requise | Fournisseur suggéré | N° de catégorie* |
|--|---------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Agilent® 4200 TapeStation® | Post-PCR | Agilent Technologies | G2991BA |
| 2 x thermocycleurs (96 puits) avec couvercle chauffant | Pré-PCR et post-PCR | Fournisseurs généraux de laboratoire | - |
| Mélangeur vortex de laboratoire - OGT recommande IKA™ MS 3 Digital Vortex Mixer | Pré-PCR et post-PCR | IKA | IKA 0003319000 |
| Adaptateur de plaque pour mélangeur vortex - OGT recommande IKA MS 3.4 Microtiter Attachment | Post-PCR | IKA | IKA 0003426400 |
| Microfuge pour tubes standard de 1,5 ml et barrettes de 8 tubes PCR | Pré-PCR et post-PCR | Fournisseur général de laboratoires | - |
| Aimant pour plaque à 96 micro-puits - OGT recommande DynaMag™-96 Side Magnet | Pré-PCR et post-PCR | Thermo Fisher Scientific | 12331D |
| Aimant pour tubes de 1,5 ml - OGT recommande DynaMag-2 Magnet | Post-PCR | Thermo Fisher Scientific | 12321D |
| Fluoromètre (Qubit 4) | Pré-PCR et post-PCR | Thermo Fisher Scientific | Q33238 |
| NanoDrop™ (One Spectrophotomètre UV-visible à microvolume) | Pré-PCR | Thermo Fisher Scientific | ND-ONE-W |
| Pipette 20–200 µl et 1–10 µl à 8 canaux | Pré-PCR et post-PCR | Fournisseur général de laboratoires | - |
| Illumina MiniSeq, MiSeq, NextSeq ou NovaSeq | Post-PCR | Illumina | - |

* Les numéros de catalogue sont corrects pour le Royaume-Uni ; ils peuvent varier dans d'autres territoires. Pour plus d'informations, veuillez contacter support@ogt.com



Lignes directrices générales

Recommandations avant usage



Pour de meilleurs résultats, OGT recommande que toutes les étapes soient effectuées dans des barrettes de tubes PCR avec bouchons attachés.

Il est fortement recommandé de tester les conditions d'hybridation (thermocycleur et consommables en plastique) afin de s'assurer qu'une évaporation minimale se produit lors de l'incubation pendant la nuit :

- Pour le test, ajoutez 17 µl d'eau exempte de nucléase (sans ADN) dans chaque puits que vous pourriez utiliser et utilisez les réglages du thermocycleur indiqués dans le Tableau 9.
- Vérifiez après l'incubation pendant la nuit que l'évaporation ne dépasse pas 1 à 2 µl par tube.
- Si nécessaire, ajustez le réglage des couvercles des thermocycleurs et/ou utilisez des entretoises adaptées au modèle de thermocycleur.

Utilisez une nouvelle solution d'éthanol à 80 % tout au long du processus en utilisant de l'éthanol de qualité biologie moléculaire et de l'eau de qualité biologie moléculaire.

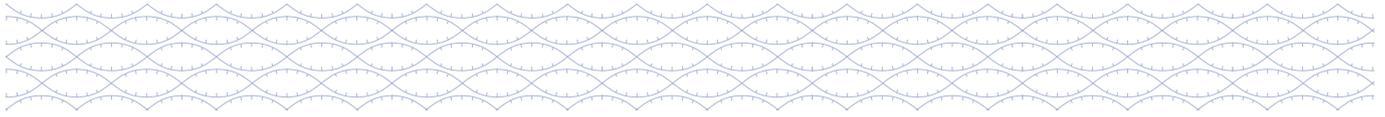
Le cas échéant, laissez les billes Mag-Bind® TotalPure NGS et les billes magnétiques de streptavidine Dynabeads™ M-270 s'équilibrer à température ambiante en les sortant de leurs emballages au moins 30 min avant utilisation.

Conservation et manipulation

Le kit doit être utilisé avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette du kit.

Le Universal Library Preparation Kit, les Universal Index Adapters, les SureSeq and NGS Constitutional Panels et le Universal Hybridisation & Wash Kit V2 doivent être conservés à -20 °C.

Le SureSeq Reference DNA et les Pre-PCR and Post-PCR Universal Bead Kits doivent être conservés à 4 °C.



Lignes directrices générales

Sécurité

La manipulation des amorces du panel OGT doit être effectuée par du personnel de laboratoire formé, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, en utilisant l'équipement de protection approprié, tel que des blouses de laboratoire, des lunettes de sécurité et des gants.

Le Universal Hybridisation & Wash Kit V2 contient des produits chimiques potentiellement dangereux en cas de mauvaise manipulation. Une attention particulière doit être portée au Formamide et au Hybridisation Buffer.

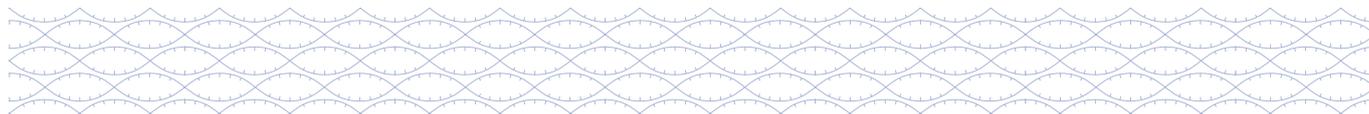
Assurez-vous que tous les opérateurs sont familiarisés avec les fiches de données de sécurité (FDS) et les évaluations des risques pertinentes avant de poursuivre le protocole.

Symboles principaux

| Symbole | Définition |
|---|---|
|  | Informations importantes : il est particulièrement important de lire, de comprendre et de suivre avec précision ces remarques. |
|  | Astuce pour gagner du temps : suggestion facultative pour améliorer l'efficacité du protocole. |
|  | Étape à froid : gardez tous les composants sur de la glace pour ces étapes. |
|  | Étape sur aimant : gardez tous les tubes sur l'aimant pendant ces étapes. |
|  | Informations spécifiques au séquençage : il est particulièrement important de lire ces notes, de les comprendre et de les suivre avec précision afin de charger de manière optimale le cycle de séquençage. |
|  | Point d'arrêt de sécurité : les échantillons peuvent être stockés en toute sécurité à ce stade sans que les résultats n'en soient affectés. |

Utilisation prévue

Ces produits sont destinés à la recherche uniquement. La solution universelle de flux de travail NGS est conçue pour être utilisée par un personnel dûment formé, à partir d'ADN extrait d'une variété de tissus, y compris le sang et la moelle osseuse.



Logiciel d'analyse de séquençage nouvelle génération Interpret

Les fichiers FASTQ de données brutes générés par les séquenceurs Illumina peuvent être analysés à l'aide du logiciel d'analyse de séquençage nouvelle génération Interpret et transformés en rapports d'analyse interactifs pour le séquençage nouvelle génération. Le logiciel est un puissant progiciel autonome d'analyse des données d'OGT, fourni avec le kit.

Vue d'ensemble du flux de travail

Pour avoir des informations sur les produits d'OGT, visitez le site www.ogt.com.

La section suivante contient des instructions pour la production de librairie d'échantillons spécifiques à la plate-forme de séquençage Illumina. Pour chaque échantillon, une librairie individuelle est préparée. Chaque échantillon est marqué d'une séquence d'index (code-barres), ainsi que d'un identifiant moléculaire unique (IMU) pour la correction des erreurs et l'amélioration de la précision lors du séquençage. Les échantillons sont amplifiés puis regroupés en ensembles de huit. Chaque pool est hybridé avec des amorces spécifiques, puis capturé et amplifié avant d'être séquençé.

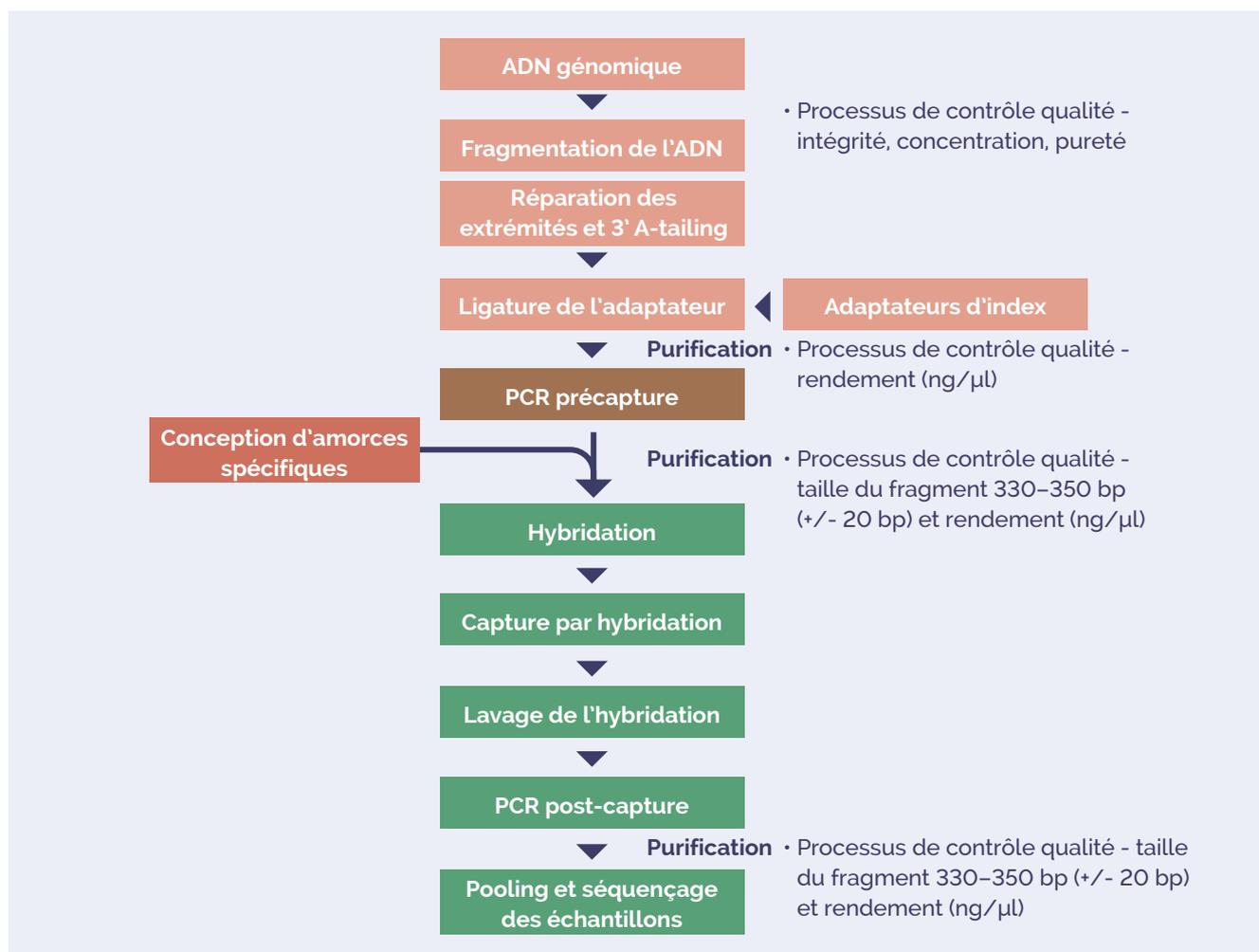
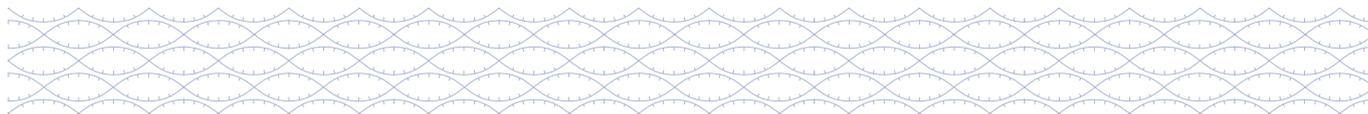


Figure 1 : Flux de travail de la préparation d'une librairie d'échantillons indiquant la taille du fragment d'ADN attendu à chaque étape de la procédure.



Exigences en matière d'échantillons

Exigences en matière d'échantillons

ADN : le protocole a été optimisé pour des quantités d'ADN de 200 à 500 ng.

Pour le panel SureSeq CLL + CNV V3 : intégrez 500 ng de Human Reference DNA Female et 500 ng de Human Reference DNA Male du SureSeq Reference DNA Kit. Un échantillon de référence est nécessaire par pool d'hybridation, soit deux au total pour une série de 16 échantillons MiSeq.



La modification de la quantité d'entrée d'ADN recommandée aura un impact sur les résultats du séquençage en aval.

ADN - préparation des échantillons

La détermination de la concentration de l'échantillon d'ADN est obligatoire pour tous les échantillons avant de commencer le protocole.

L'évaluation de l'intégrité et de la pureté de l'ADN est facultative, mais recommandée.

Nous recommandons les tests suivants pour évaluer l'intégrité, la concentration et la pureté de l'échantillon :

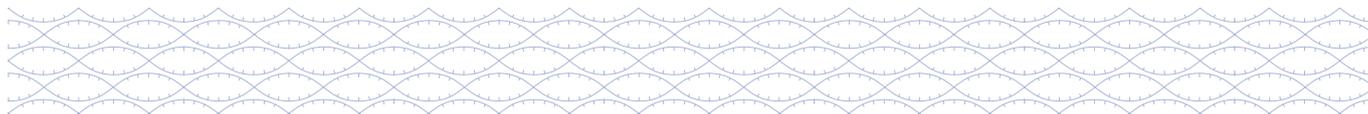
- Concentration : Thermo Fisher Scientific Qubit
- Intégrité de l'ADN : Agilent 4200 TapeStation
- Pureté : Thermo Scientific NanoDrop

Concentration d'ADN - Qubit dsDNA HS Assay Kit

Reportez-vous au guide d'utilisation du Thermo Fisher Scientific Qubit.

Les principales étapes sont décrites ci-dessous :

1. Préparez la solution de travail Qubit en diluant le réactif Qubit à 1:200 dans le tampon Qubit.
2. Ajoutez une aliquote de 190 µl de solution de travail Qubit pour les deux étalons.
3. Ajoutez 10 µl de chaque étalon Qubit dans le tube approprié.
4. Ajoutez une aliquote de 199 µl de solution de travail Qubit pour chaque échantillon évalué.
5. Ajoutez 1 µl d'échantillon dans le tube approprié.



Exigences en matière d'échantillons



Les échantillons ayant une concentration initiale d'ADN >100 ng/μl doivent être prédilué à 20–100 ng/μl avec un tampon TE (fourni dans le kit). Confirmez la concentration d'ADN à l'aide du Qubit dsDNA HS Assay Kit. La quantification précise de l'ADN introduit est essentielle pour obtenir des résultats de fragmentation reproductibles.

6. Mélangez au vortex pendant 2 à 3 secondes, en veillant à ne pas créer de bulles.
7. Incubez les tubes à température ambiante pendant 2 minutes.
8. Mesurez et enregistrez les concentrations d'ADN en suivant les instructions à l'écran.

Intégrité de l'ADN - ScreenTape d'ADN génomique

Facultatif : cette étape est importante pour évaluer le niveau, le cas échéant, de dégradation de l'ADN.

Reportez-vous au guide d'utilisation du fabricant de l'Agilent 4200 TapeStation. Les principales étapes sont décrites ci-dessous :

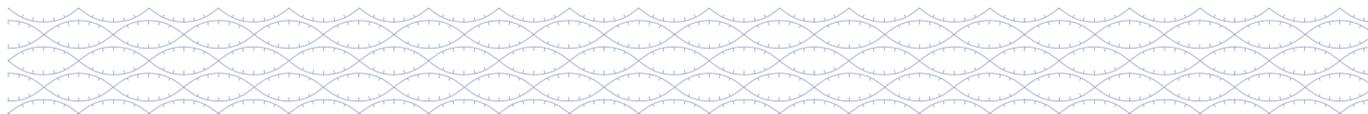
1. Préparez le marqueur de poids moléculaire en mélangeant 10 μl de tampon d'échantillon d'ADN génomique avec 1 μl de marqueur d'ADN génomique dans le premier tube/puits de la barrette ou de la plaque.

Remarque : un marqueur de poids moléculaire est nécessaire pour chaque cycle. Aucun marqueur électronique n'est disponible pour l'analyse de l'ADN génomique

2. Pour chaque échantillon évalué, ajoutez 1 μl d'échantillon d'ADN à 10 μl de tampon d'échantillon.
3. Fermez tous les tubes/puits.
4. Mélangez au vortex les tubes ou la plaque pendant 1 minute à 2 000 tr/min, puis centrifugez-les brièvement pour recueillir le liquide au fond.
5. Centrifugez brièvement pour recueillir l'échantillon au fond des tubes/puits.
6. Chargez la barrette de tubes ou la plaque dans Agilent 4200 TapeStation.

Remarque : si vous utilisez des barrettes de tubes, n'oubliez pas d'enlever les bouchons.

7. Sélectionnez les échantillons requis sur l'écran du logiciel et indiquez les noms des échantillons sur la feuille d'échantillons.
8. Indiquez un nom de fichier dans le champ « Préfixe » de l'écran du logiciel pour enregistrer vos résultats et sélectionnez « Démarrer ».



Exigences en matière d'échantillons

9. Vérifiez que l'électrophérogramme montre que l'intégrité de l'ADNg est intacte, avec une distribution régulière et une taille de pic maximale >5000 bp.
10. Après l'électrophorèse de l'ADN à l'aide de Agilent 4200 TapeStation, un numéro d'intégrité de l'ADN (DIN) est généré. Un DIN >7 indique la présence d'ADN intact, tandis qu'un DIN <7 indique que l'ADN est dégradé. Si un échantillon présente un DIN <7, contactez votre FAS local.

Pureté - NanoDrop

Facultatif : Cette étape est importante pour évaluer la pureté de l'échantillon d'ADN.

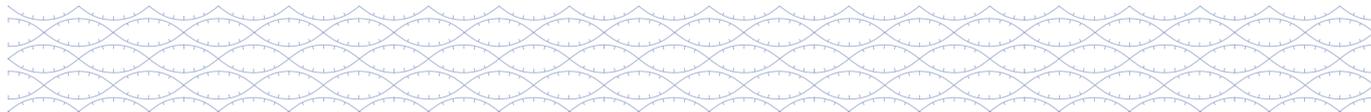
Reportez-vous au mode d'emploi du fabricant du NanoDrop.

Les principales étapes sont décrites ci-dessous :

1. Utilisez les paramètres « Acide nucléique » et « ADN-50 ».
2. Nettoyez le socle avec de l'eau exempte de nucléase.
3. Chargez 1 à 2 µl de tampon d'échantillon ou de solution de blanc.
4. Cliquez sur « Mesurer le blanc ».
5. Nettoyez le socle avec une lingette non pelucheuse.
6. Déposez 1 à 2 µl de chaque échantillon sur le socle.
7. Cliquez sur « Mesurer ».
8. Enregistrez les valeurs 260/230, 260/280 et la concentration (ng/µl).

Un rapport OD 260/280 de 1,8 à 2,0 et un rapport OD 260/230 de 2,0 à 2,2 sont recommandés. L'utilisation d'échantillons d'ADN avec des rapports inférieurs peut entraîner de mauvaises performances.

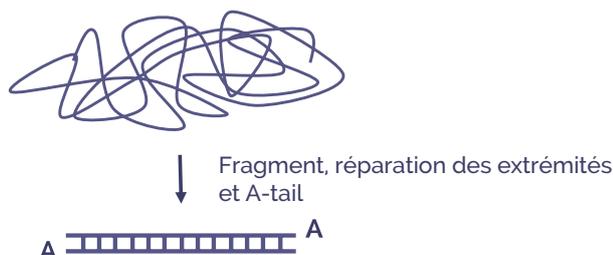
Contactez votre ingénieur d'application OGT local (FAS) si vous avez besoin de conseils sur la qualité de vos échantillons.



Préparation de la librairie : Étape 1

Fragmentation de l'ADN, réparation des extrémités et 3' A-tailing

ADN génomique



Vue d'ensemble

L'ADN génomique est fragmenté par voie enzymatique. L'ADNdb fragmenté est réparé par les enzymes du mélange de fragmentation et de réparation de l'extrémité (ER) pour créer des extrémités franches. En même temps, un excédent d'adénine 3' est créé pour préparer la ligature de l'adaptateur.

Avant de commencer :

- ❄ Retirez le tampon TE (couvercle bleu ; ●) de son emballage (-15 °C à -25 °C). Laissez décongeler à température ambiante puis placez sur de la glace.

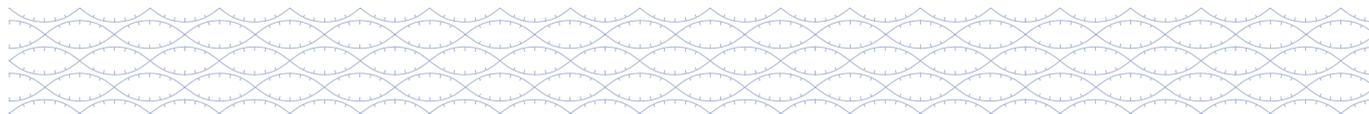


Utilisez uniquement le tampon TE (couvercle bleu ; ●) fourni dans le kit pour la préparation des échantillons d'ADN (10 mM Tris, 1 mM EDTA). L'utilisation d'autres formulations de TE (par exemple, 0,1 x TE) ou d'eau peut affecter les résultats de la fragmentation.

- ❄ Retirez « Étape 1 : Tampon Frag + ER (couvercle orange ; ●) » de son emballage (-15 °C à -25 °C). Laissez décongeler à température ambiante et placez sur de la glace. Assurez-vous que tous les composants du tampon sont dissous.

Il n'est pas rare de voir des précipités dans le tampon. Si cela se produit, pipetez le tampon plusieurs fois pour rompre le précipité, puis mélangez rapidement au vortex jusqu'à dissolution. S'il reste un précipité, évitez de pipeter les précipités dans le mélange réactionnel.

- ❄ Retirez « Étape 1 : Enzyme Frag + ER (couvercle orange ; ●) » de son emballage (-15 °C à -25 °C) et le placer sur la glace.
- Assurez-vous que le ou les échantillons d'ADN sont pré-dilués à 20–100 ng/μl avec le tampon TE (couvercle bleu ; ●).



Préparation de la librairie : Étape 1

Effectuez l'étape 1 : Fragmentation de l'ADN, réparation des extrémités et 3' A-tailing

Durée estimée : 1,25 heure pour 8 à 24 échantillons. Temps de manipulation : 15 min.

1. Programmez le thermocycleur en utilisant les paramètres indiqués dans le Tableau 1. Enregistrez le programme sous le nom « Fragmentation OGT ».

| Étape | Température (°C) | Durée |
|-------|------------------|----------|
| 1 | 37 | 20 min |
| 2 | 65 | 30 min |
| 3 | 4 | Maintien |

Tableau 1 : Profil d'incubation du programme « Fragmentation OGT ».

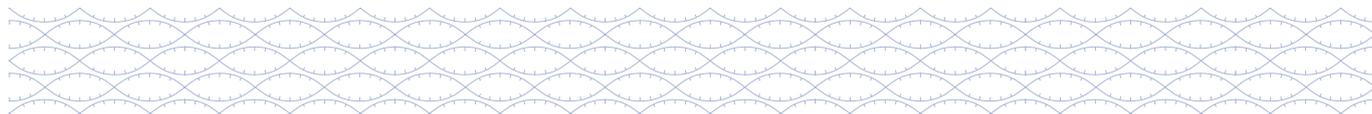
2. **Préchauffez** le thermocycleur à 37 °C. Dans la mesure du possible, réglez le couvercle chauffant à 75 °C, ou activez le couvercle chauffant pré-réglé.
3. Dans des barrettes de tubes PCR, diluez **200–500 ng** d'échantillon d'ADN avec le tampon TE réfrigéré (couvercle bleu ; ●) fourni pour un volume total de **26,5 µl**. Mélangez au vortex pendant **3 à 5 s**, centrifugez par pulsation pour recueillir le contenu et placez-le sur de la glace.

Pour SureSeq CLL + CNV V3 : Préparez 1 x 500 ng de Human Reference DNA Female et 1 x 500 ng de Human Reference DNA Male dans un volume total de **26,5 µl** pour chaque série de 16 échantillons. Traitez les deux échantillons de référence en parallèle avec les 14 échantillons de test.

4. Identifiez un nouveau jeu de barrettes de tubes PCR pour l'échantillon et placez-le sur de la glace.
5. Mélangez « Étape 1 : Tampon Frag + ER » et « Étape 1 : Enzyme Frag + ER » sur un mélangeur à vortex pendant **5 à 8 s**. Centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu et placez-le sur de la glace.



Il est essentiel de bien mélanger l'enzyme Frag + ER pour une performance optimale.



Préparation de la librairie : Étape 1

- ❄️ 6. Préparez le Master Mix Frag + ER conformément au Tableau 2 dans un nouveau tube LoBind de 1,5 ml et placez-le sur de la glace.

| Réactif | 1 x librairie (µl) | 8 x librairie (µl) (comprend 2 excédents) | 16 x librairie (µl) (comprend 2 excédents) | 24 x librairie (µl) (comprend 3 excédents) |
|--|--------------------|--|---|---|
| Échantillon d'ADN | 26,5 | - | - | - |
| Étape 1 : Tampon Frag + ER (couvercle orange ; ●) | 7 | 70 | 126 | 189 |
| Étape 1 : Enzyme Frag + ER (couvercle orange ; ●) | 1,5 | 15 | 27 | 40,5 |
| TOTAL | 35 | 85 | 153 | 229,5 |

Tableau 2 : Master Mix Frag + ER.

- ❄️ 7. Mélangez le Master Mix Frag + ER à l'aide d'un mélangeur à vortex pendant **3 à 5 s**, centrifugez par pulsation pour recueillir le contenu et conservez-le sur de la glace.
- ❄️ 8. Ajoutez **8,5 µl** de Master Mix Frag + ER dans chacun des tubes vides préparés à l'étape 4 et conservez-les sur de la glace.
- ❄️ 9. À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez **26,5 µl** d'échantillon d'ADN de l'étape 3 dans les tubes de l'étape 4.



Procédez rapidement pour éviter une fragmentation excessive, car l'enzyme est active à température ambiante. Conservez les échantillons sur de la glace lorsqu'ils ne sont pas vortexés ou centrifugés.

10. Mélangez **immédiatement** à l'aide d'un mélangeur à vortex pendant **3 s**.
11. Centrifugez par impulsion pour collecter le contenu et transférez **immédiatement** dans le thermocycleur **préchauffé**. Lancez le programme « Fragmentation OGT ».

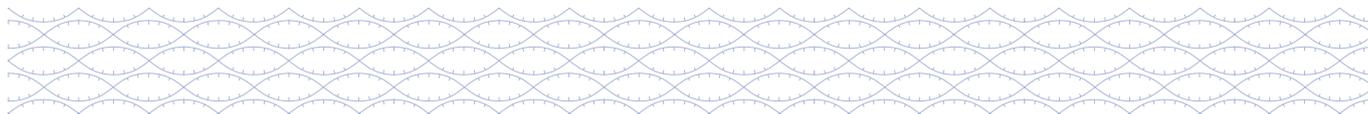


Recommandation : préparez la ligation du mélange réactionnel pendant les 10 dernières minutes du programme du thermocycleur.

12. Lorsque le programme est terminé et que le thermocycleur a atteint 4 °C, retirez les échantillons et placez-les sur de la glace jusqu'à ce que vous soyez prêt à procéder à la ligation de l'adaptateur.



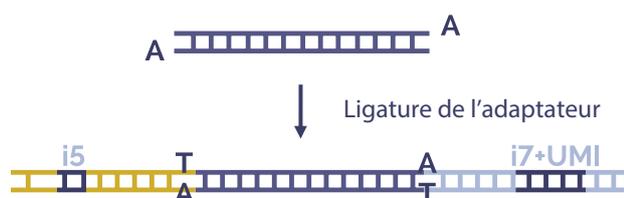
Nous vous recommandons de passer immédiatement à l'étape suivante « Étape 2 : Ligation et purification de l'adaptateur ». Si nécessaire, les échantillons peuvent être conservés à -20 °C ; cependant, une perte de rendement (~20 %) peut être observée.



Préparation de la librairie : Étape 2

Ligature et purification de l'adaptateur

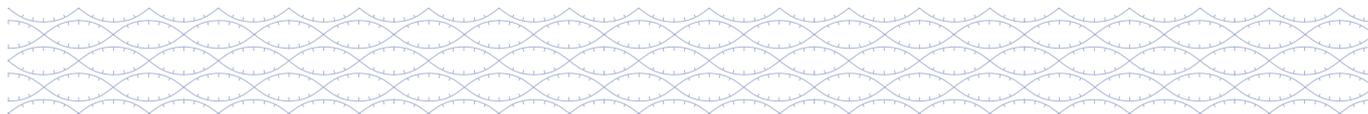
Vue d'ensemble



En utilisant l'excédent 3' créé lors de la réparation des extrémités/A-tailing et l'ADN ligase, les séquences d'adaptateurs compatibles Illumina sont ligaturées sur les fragments d'ADNdb. Les adaptateurs contiennent des séquences d'identification moléculaire unique (UMI) et des index d'échantillons uniques.

Avant de commencer :

- Sortez les billes Mag-Bind TotalPure NGS du Pre-PCR Universal Bead Kit du réfrigérateur au moins **30 minutes avant l'utilisation** pour leur permettre de s'équilibrer à température ambiante.
- Préparez une nouvelle solution d'éthanol à 80 % en utilisant de l'éthanol de qualité biologie moléculaire et de l'eau de qualité biologie moléculaire.
- Retirez « Étape 2 : Tampon de ligation (couverture jaune ; ●) » de son emballage (-15 °C à -25 °C) et laissez décongeler à température ambiante. Assurez-vous que tous les composants du tampon de ligation sont dissous. Si nécessaire, incubez à 37 °C jusqu'à dissolution.
- ❄ • Retirez « Étape 2 : Ligase (couverture jaune ; ●) » de son emballage (-15 °C à -25 °C) et placez sur de la glace.
- ❄ • Retirez la plaque d'adaptateur d'index universel de son emballage (-15 °C à -25 °C) et laissez-la décongeler sur de la glace pendant **5 à 10 min avant utilisation**. Centrifugez la plaque d'adaptateur pour en recueillir le contenu. Gardez en permanence la plaque sur de la glace. Ne pas faire chauffer au-dessus de la température ambiante.
- Les adaptateurs d'index sont à usage unique. Si vous n'utilisez qu'une partie de la plaque, couvrez les puits des adaptateurs utilisés pour éviter de répandre l'excès des adaptateurs d'index. Les adaptateurs non utilisés peuvent également être aliquotés dans des barrettes de tubes et décongelés immédiatement avant l'utilisation.



Préparation de la librairie : Étape 2

- Attribuez un adaptateur d'index différent à chaque échantillon. Consultez les figures 2 et 3 pour voir l'emplacement des adaptateurs d'index sur la plaque.
- OGT recommande de traiter les échantillons par lots de huit, chaque pool contenant une colonne complète de la plaque d'index.

Étape 2 de réalisation : Ligature

Durée estimée : 35 min pour 8 à 24 échantillons. Temps de manipulation : 15 min.

1. Programmez le thermocycleur en utilisant les paramètres indiqués dans le Tableau 3. Enregistrez le programme sous le nom de « Ligature OGT ».

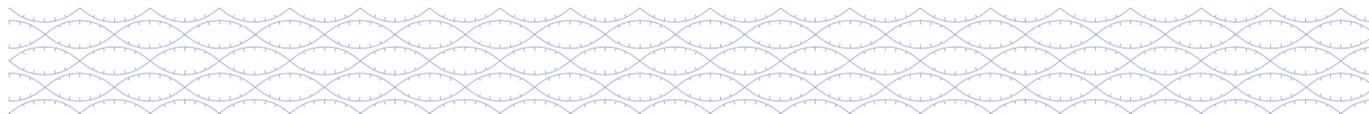


Ne pas utiliser de couvercle chauffant. Si le couvercle chauffant ne peut pas être éteint, laissez le couvercle ouvert.

| Étape | Température (°C) | Durée |
|-------|------------------|----------|
| 1 | 20 | 20 min |
| 2 | 4 | Maintien |

Tableau 3 : Profil d'incubation du programme « Ligature OGT ».

- ❄ 2. Mélangez « Étape 2 : Tampon ligase » sur un mélangeur à vortex pendant **3 à 5 s**, centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu et placez-le sur de la glace.
- ❄ 3. Mélangez « Étape 2 : Ligase », centrifugez pour recueillir le contenu et placez sur de la glace.



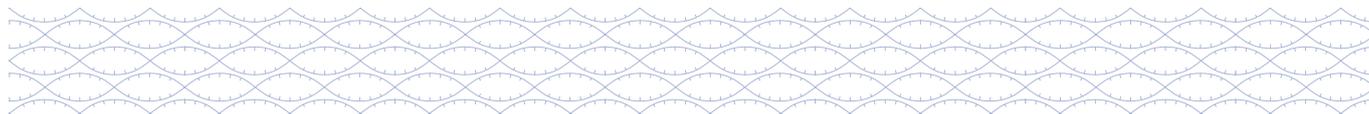
Préparation de la librairie : Étape 2

- ❄ 4. Préparez le mélange réactionnel de ligature conformément au Tableau 4 dans un nouveau tube LoBind de 1,5 ml et placez-le sur de la glace.

| Réactif | 1 x librairie (µl) | 8 x librairie (µl) (comprend 2 excédents) | 16 x librairie (µl) (comprend 2 excédents) | 24 x librairie (µl) (comprend 3 excédents) |
|---|--------------------|--|---|---|
| Échantillon d'ADN | 35 | - | - | - |
| Adaptateur d'index | 2,5 | - | - | - |
| Étape 2 : Tampon de ligase (couvercle jaune ; ●) | 9 | 90 | 162 | 243 |
| Étape 2 : Ligase (couvercle jaune ; ●) | 2 | 20 | 36 | 54 |
| TOTAL | 48,5 | 110 | 198 | 297 |

Tableau 4 : Mélange réactionnel de ligature.

- ❄ 5. Mélangez le mélange réactionnel de ligature à l'aide d'un mélangeur à vortex pendant **3 à 5 s**, centrifugez par pulsation pour recueillir le contenu et conservez sur de la glace.
- ❄ 6. Ajoutez **11 µl** du mélange réactionnel de ligature à chaque tube d'échantillon d'ADN refroidi contenant le(s) produit(s) fragmenté(s).
7. Ajoutez **2,5 µl** d'adaptateur d'index à chaque tube d'échantillon d'ADN de l'étape 6.
8. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pendant **3 à 5 s** et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
9. Transférez **immédiatement** dans le thermocycleur et lancez le programme « Ligature OGT ».
10. Lorsque le programme est terminé et que le thermocycleur a atteint 4 °C, retirez les échantillons et procédez immédiatement à l'analyse **et passez immédiatement** à « Purification de la librairie ligaturée ».



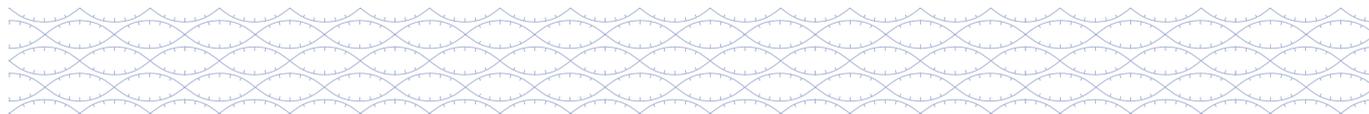
Préparation de la librairie : Étape 2

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|----|----|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 1 | 9 | 17 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| B | 2 | 10 | 18 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| C | 3 | 11 | 19 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| D | 4 | 12 | 20 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| E | 5 | 13 | 21 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| F | 6 | 14 | 22 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| G | 7 | 15 | 23 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| H | 8 | 16 | 24 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |

Figure 2 : Disposition de la Universal Index Adapter Plate (1–24). X : puits vide.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A | 1 | 9 | 17 | 25 | 33 | 41 | 49 | 57 | 65 | 73 | 81 | 89 |
| B | 2 | 10 | 18 | 26 | 34 | 42 | 50 | 58 | 66 | 74 | 82 | 90 |
| C | 3 | 11 | 19 | 27 | 35 | 43 | 51 | 59 | 67 | 75 | 83 | 91 |
| D | 4 | 12 | 20 | 28 | 36 | 44 | 52 | 60 | 68 | 76 | 84 | 92 |
| E | 5 | 13 | 21 | 29 | 37 | 45 | 53 | 61 | 69 | 77 | 85 | 93 |
| F | 6 | 14 | 22 | 30 | 38 | 46 | 54 | 62 | 70 | 78 | 86 | 94 |
| G | 7 | 15 | 23 | 31 | 39 | 47 | 55 | 63 | 71 | 79 | 87 | 95 |
| H | 8 | 16 | 24 | 32 | 40 | 48 | 56 | 64 | 72 | 80 | 88 | 96 |

Figure 3 : Disposition de la Universal Index Adapter Plate (1–96).



Préparation de la librairie : Étape 2

Purification des librairies ligaturées

Temps d'intervention estimé : 50 min pour 8 à 24 échantillons.



Avant utilisation, mélangez les billes au vortex pendant au moins 1 minute ou jusqu'à ce que la solution de billes apparaisse homogène et de couleur constante.

Avant de commencer :

1. Préparez une **nouvelle** barrette de tubes PCR pour chaque barrette d'échantillons.
2. Ajoutez **29 µl** de billes Mag-Bind TotalPure NGS homogènes, à température ambiante, provenant du Pre-PCR Universal Bead Kit, à chaque **tube** vide et les mettre de côté jusqu'à l'étape 6.

Dans les tubes d'échantillon d'ADN :

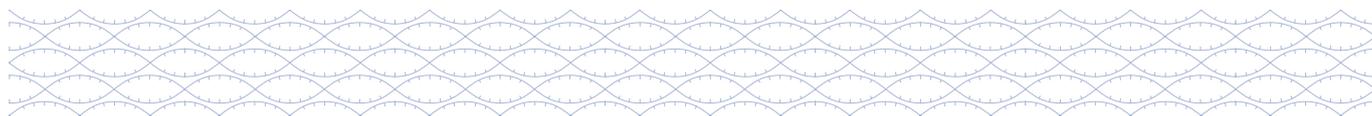
3. Ajoutez **11 µl** de billes Mag-Bind TotalPure NGS homogènes, à température ambiante, provenant du Pre-PCR Universal Bead Kit, dans chaque tube d'échantillon d'ADN. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pour remettre les billes en suspension et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
4. Incubez à température ambiante pendant **5 minutes**.



5. Placez les tubes dans le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (env. **3 à 5 min**).
6. Transférez **60 µl** de **surnageant clarifié contenant l'échantillon d'ADN** dans les tubes contenant les billes préparées à l'étape 2. Les culots de billes peuvent être jetés.
7. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pour remettre les billes en suspension et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
8. Incubez à température ambiante pendant **5 minutes**.



9. Placez les tubes dans le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (env. **3 à 5 min**).
10. En évitant le culot de billes, retirez et jetez le surnageant clarifié (**~88 µl**). **Conservez les billes contenant l'échantillon d'ADN.**
11. Ajoutez **200 µl** d'éthanol à 80 % dans chaque tube sans remettre en suspension le culot de billes.
12. Incubez pendant **30 s**, puis retirez l'éthanol.



Préparation de la librairie : Étape 2

- 13. Répétez le lavage (étapes 11 et 12) une fois, pour un total de **deux** lavages.
- 14. Fermez les tubes et centrifugez par impulsion pour recueillir l'éthanol résiduel. Remettez les tubes sur le support magnétique. Éliminez l'éthanol résiduel à l'aide d'une pipette P20.
- 15. Séchez les culots de billes à température ambiante pendant **1 à 2 min**.



Ne pas trop sécher, car cela diminue le rendement. Le culot de billes est sec lorsque l'aspect de la surface passe du brillant au mat. Un séchage excessif entraîne des fissures dans le culot de billes.

- 16. Retirez du support magnétique et ajoutez **34 µl** d'eau exempte de nucléase directement au culot de billes pour éluer l'échantillon d'ADN. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pour remettre les billes en suspension et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
- 17. Incubez pendant **5 minutes** à température ambiante.



Recommandation : Si vous passez immédiatement à « Étape 3 : PCR précapture », « Étape 3 : Mélange d'amorces » et « Étape 3 : Tampon PCR » peuvent être retirés de leur emballage pour être décongelés à température ambiante.

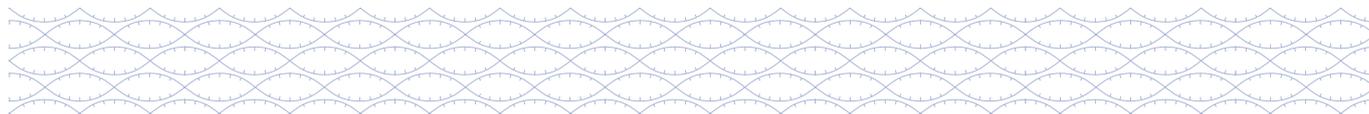
- 18. Identifiez un nouveau jeu de barrettes de tubes PCR pour les échantillons et mettez-le de côté jusqu'à ce qu'il soit nécessaire à l'étape 20.



- 19. Placez les tubes sur le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (env. **2 à 3 min**).
- 20. Transférez **32 µl** de l'éluat contenant les produits ligaturés purifiés dans les tubes de l'étape 18. Les tubes contenant les billes peuvent être éliminés à ce stade.
- 21. Évaluez le rendement en utilisant **1 µl** de produit ligaturé avec Qubit dsDNA HS Kit selon les instructions du fabricant. Le rendement attendu est de >2 ng/µl.



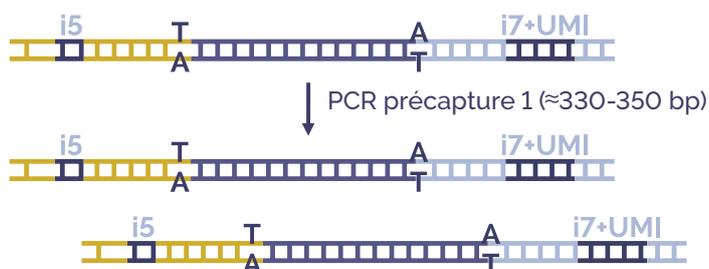
POINT D'ARRÊT FACULTATIF : Si les échantillons ne sont pas utilisés immédiatement, conservez-les à -20 °C. Si vous continuez, passez à « PCR précapture ».



Préparation de la librairie : Étape 3

PCR précapture

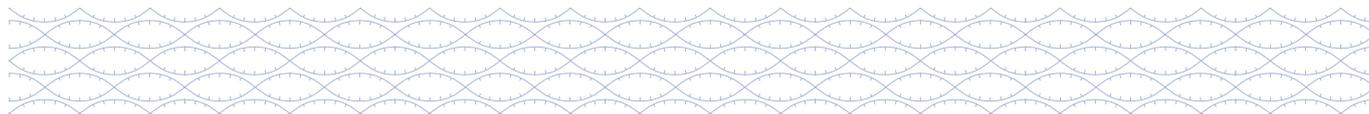
Vue d'ensemble



La PCR haute fidélité est utilisée pour amplifier la librairie d'ADN avant l'hybridation et la capture de la cible. Le nombre de cycles PCR est réduit au minimum afin de diminuer le nombre de duplications (copies PCR du même fragment d'ADN original) dans les données de séquençage.

Avant de commencer :

- Retirez « Étape 3 : Mélange d'amorces (couverture rouge ; ●) » et « Étape 3 : Tampon PCR (couverture rouge ; ●) » de son emballage (-15 °C à -25 °C) et laissez décongeler à température ambiante.
- Assurez-vous que tous les composants du tampon PCR sont bien dissous. Si nécessaire, mélangez au vortex et/ou incubez à 37 °C jusqu'à dissolution.
- ❄ • Retirez « Étape 3 : Polymérase PCR (couverture rouge ; ●) » de son emballage (-15 °C à -25 °C) et placez sur de la glace.



Préparation de la librairie : Étape 3

Effectuez l'étape 3 : PCR précapture

Durée estimée : 45 min pour 8 à 24 échantillons. Temps de manipulation : 15 min.

1. Programmez le thermocycleur en utilisant les paramètres indiqués dans les Tableaux 5 et 6. Sauvegardez le programme sous le nom « PCR1 OGT ». Dans la mesure du possible, réglez le couvercle chauffant à 105 °C, ou activez le couvercle chauffant pré-réglé.

| Étape | Température (°C) | Durée |
|-------|--|----------|
| 1 | 98 | 3 min |
| 2 | 98 | 30 s |
| 3 | 65 | 30 s |
| 4 | 72 | 1 min |
| 5 | Répétez les étapes 2 à 4 selon le nombre de cycles indiqué dans le Tableau 6 | |
| 6 | 72 | 10 min |
| 7 | 4 | Maintien |

Tableau 5 : Profil d'incubation du programme « PCR1 OGT ».

| Quantité d'entrée d'ADN | Nombre total de cycles PCR |
|-------------------------|----------------------------|
| 200–350 ng | 6 |
| 351–500 ng | 5 |

Tableau 6 : Nombre total de cycles PCR pour la gamme recommandée d'entrées d'ADN.

2. Mélangez au vortex « Étape 3 : Mélange d'amorces » et « Étape 3 : Tampon PCR » pendant **3 à 5 s** et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
- ❄ 3. Mélangez « Étape 3 : Polymérase PCR », centrifugez pour recueillir le contenu et conservez sur de la glace.

Préparation de la librairie : Étape 3

4. Préparez le Pre-capture PCR Master Mix conformément au Tableau 7 dans un nouveau tube LoBind de 1,5 ml.

| Réactif | 1 x librairie (µl) | 8 x librairie (µl) (comprend 2 excédents) | 16 x librairie (µl) (comprend 2 excédents) | 24 x librairie (µl) (comprend 3 excédents) |
|---|--------------------|--|---|---|
| Échantillon d'ADN lié à l'adaptateur | 31 | - | - | - |
| Eau exempte de nucléase (couvercle transparent ; ○) | 9,5 | 95 | 171 | 256,5 |
| Étape 3 : Tampon PCR (couvercle rouge ; ●) | 5 | 50 | 90 | 135 |
| Étape 3 : Mélange d'amorces (couvercle rouge ; ●) | 2,5 | 25 | 45 | 67,5 |
| Étape 3 : Polymérase PCR (couvercle rouge ; ●) | 2 | 20 | 36 | 54 |
| TOTAL | 50 | 190 | 342 | 513 |

Tableau 7 : Pre-capture PCR Master Mix.

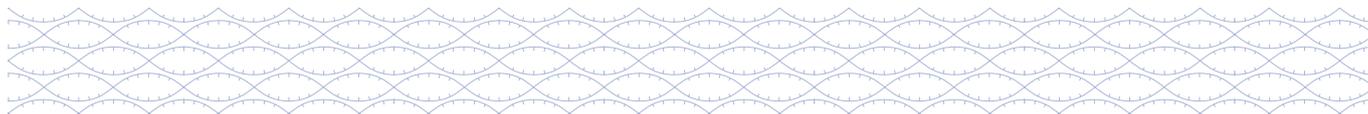
5. Mélangez le Pre-capture PCR Master Mix à l'aide d'un mélangeur à vortex pendant **3 à 5 s** et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
6. Ajoutez **19 µl** du Pre-capture PCR Master Mix à chaque tube d'échantillon d'ADN contenant les produits ligaturés.
7. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pendant **3 à 5 s** et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
8. Transférez dans le thermocycleur et lancez le programme « OGT PCR1 ».

Réalisez une purification PCR précapture

Temps d'intervention estimé : 40 min pour 8 à 24 échantillons.



Avant utilisation, mélangez les billes au vortex pendant au moins 1 minute ou jusqu'à ce que la solution de billes apparaisse homogène et de couleur constante.



Préparation de la librairie : Étape 3

Dans les tubes d'échantillon d'ADN :

1. Ajoutez **45 µl** de billes Mag-Bind TotalPure NGS homogènes, à température ambiante, provenant du Post-PCR Universal Bead Kit, dans chaque tube d'échantillon d'ADN. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pour remettre les billes en suspension et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
2. Incubez à température ambiante pendant **5 minutes**.
-  3. Placez les tubes dans le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (env. **3 à 5 min**).
4. En évitant le culot de billes, retirez et jetez le surnageant clarifié (~**90 µl**). **Conservez les billes contenant l'échantillon d'ADN.**
5. Ajoutez **200 µl** d'éthanol à 80 % dans chaque tube sans remettre en suspension le culot de billes.
6. Incubez pendant **30 secondes** puis retirez l'éthanol.
7. Répétez le lavage (étapes 5 et 6) une fois, pour un total de deux lavages.
8. Fermez les tubes et centrifugez par impulsion pour recueillir l'éthanol résiduel. Remettez les tubes sur le support magnétique. Éliminez l'éthanol résiduel à l'aide d'une pipette P20.
9. Séchez les culots de billes à température ambiante pendant **1 à 2 min**.



Ne pas trop sécher, car cela diminue le rendement. Le culot de billes est sec lorsque l'aspect de la surface passe du brillant au mat. Un séchage excessif entraîne des fissures dans le culot de billes.

10. Retirez du support magnétique et ajoutez **25 µl** d'eau exempte de nucléase directement au culot de billes pour éluer l'échantillon d'ADN. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pour remettre les billes en suspension et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
11. Incubez pendant **5 minutes** à température ambiante.
12. Identifiez un nouveau jeu de barrettes de tubes PCR pour les échantillons et mettez-le de côté jusqu'à ce qu'il soit nécessaire à l'étape 14.
-  13. Placez les tubes sur le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (env. **2 à 3 min**).
14. Transférez **24 µl** de l'éluat contenant les produits amplifiés purifiés dans les tubes de l'étape 12. Les tubes contenant les billes peuvent être éliminés à ce stade.

Préparation de la librairie : Étape 3

15. Évaluez la taille du produit amplifié à l'aide du Agilent D1000 ScreenTape System. L'électrophérogramme doit montrer un pic de 330–350 bp (+/- 20 bp) (Figure 4). Installez l'instrument et préparez la cassette, les échantillons et l'échelle en suivant les instructions du fabricant.

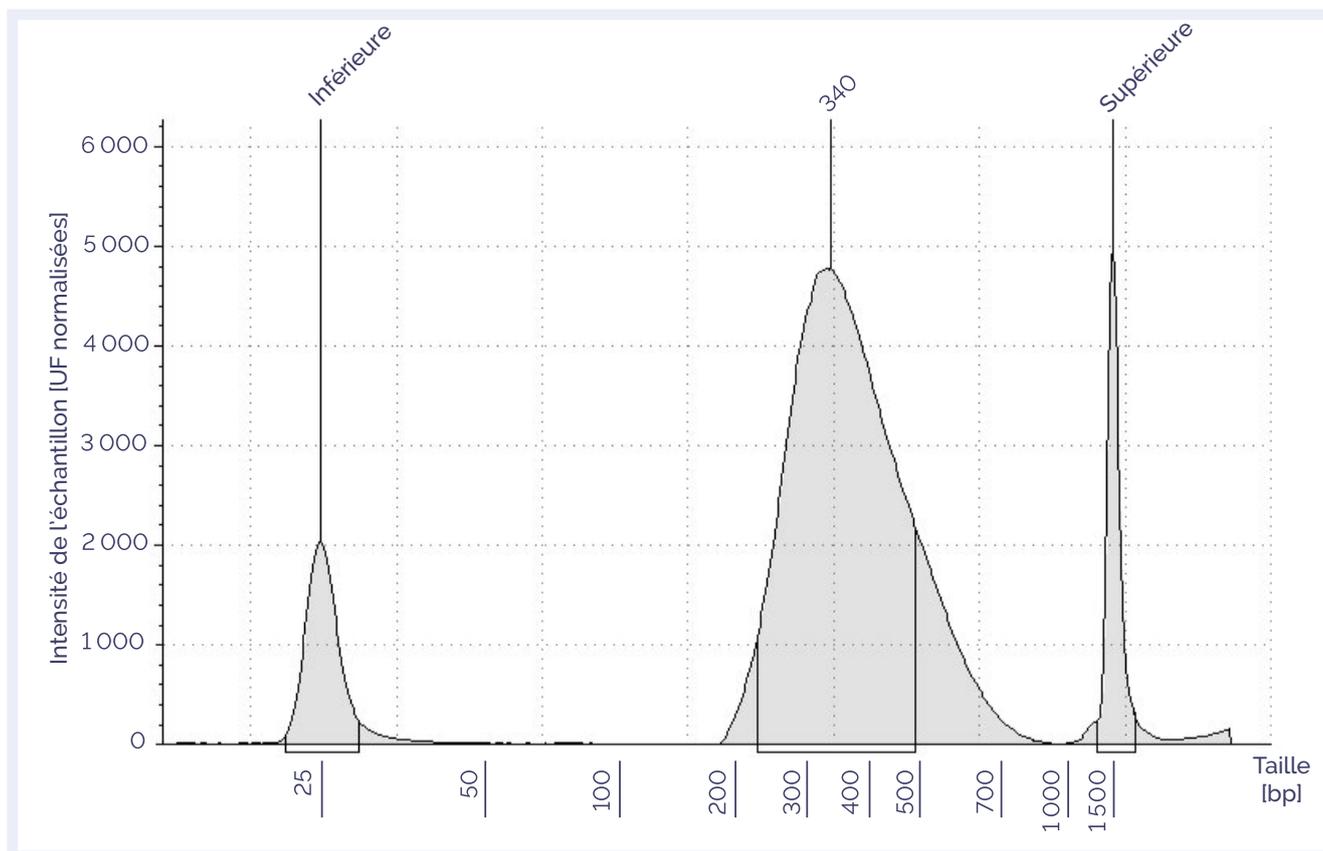


Figure 4 : Electrophérogramme du produit PCR précapture purifié généré à l'aide du Agilent D1000 ScreenTape. L'électrophérogramme montre un pic maximal dans la gamme de taille d'environ 330–350 bp (+/- 20 bp).



La taille des fragments en dehors de cette fourchette peut réduire la qualité des données de séquençage. Contactez votre ingénieur d'application (FAS) si vous avez besoin de plus d'informations.

16. Évaluez le rendement en utilisant **1 µl** de produit amplifié avec le Qubit dsDNA HS Kit selon les instructions du fabricant.

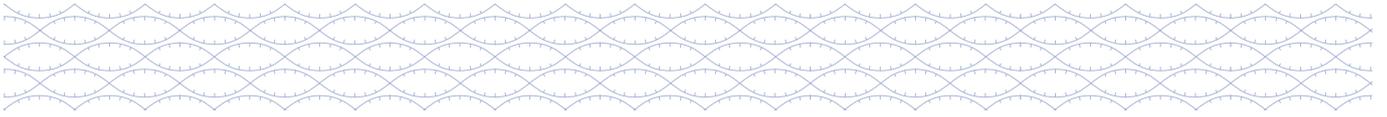
Le rendement attendu est de >18 ng/µl (~400 ng par librairie).



Il est recommandé d'utiliser une pipette monocanal et de s'assurer qu'il n'y a pas d'excès de liquide sur le côté de l'embout afin d'éviter des lectures inexactes qui pourraient affecter le pooling.



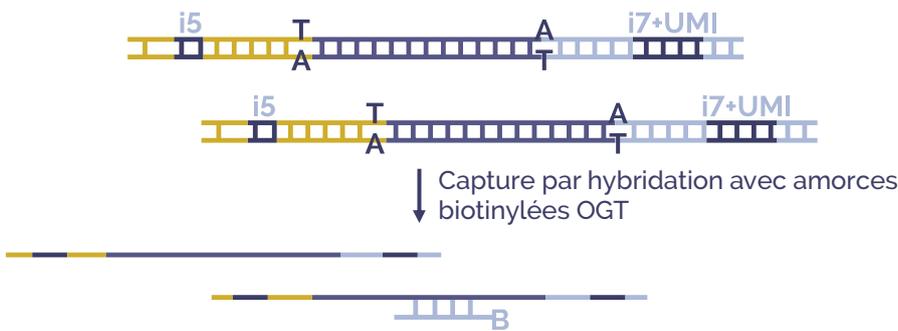
POINT D'ARRÊT FACULTATIF : Si les échantillons ne sont pas utilisés immédiatement, conservez-les à 4 °C pendant la nuit ou à -20 °C pour un stockage à long terme. Si vous continuez, passez au point « Hybridation universelle ».



Préparation de la librairie : Hybridation universelle

Hybridation universelle

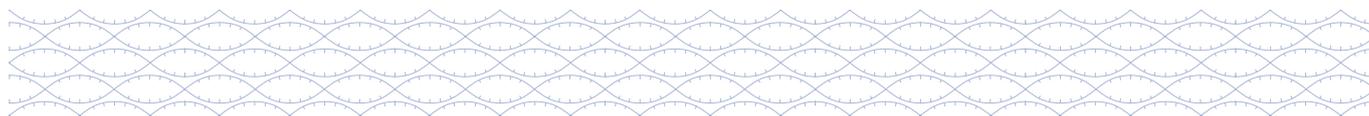
Vue d'ensemble



La librairie amplifiée est dénaturée et capturée par les amorces SureSeq ou CytoSure NGS (biotinylées).

Avant de commencer :

- Sortez les billes Mag-Bind TotalPure NGS du Post-PCR Universal Bead Kit du réfrigérateur au moins **30 minutes avant l'utilisation** pour leur permettre de se réchauffer à la température ambiante.
- Préparez une nouvelle solution d'éthanol à 80 % en utilisant de l'éthanol de qualité biologie moléculaire et de l'eau de qualité biologie moléculaire.
- Retirez le Hybridisation Buffer (couvercle rouge ; ●), le Formamide (couvercle jaune ; ●), le Cot Human DNA (couvercle vert ; ●), les Index Blockers (couvercle bleu ; ●) et la Nuclease-free Water (couvercle transparent ; ○) de leur lieu de stockage (-15 °C à -25 °C) et laissez-les décongeler à température ambiante.
- Retirez les amorces SureSeq ou CytoSure de leur lieu de stockage (-15 °C à -25 °C) et laissez-les décongeler à température ambiante.
- Assurez-vous que tous les composants du Hybridisation Buffer sont bien dissous. Si nécessaire, incubez à 37 °C jusqu'à dissolution.



Préparation de la librairie : Hybridation universelle

Préparation du mélange réactionnel d'hybridation

Durée estimée : 5 min pour 8 à 24 échantillons. Temps de manipulation : 5 min.

1. Mélangez au vortex le Hybridisation Buffer, le Formamide, le Cot Human DNA, les Panel-specific Baits et les Index Blockers pendant **3 à 5 s** et centrifugez-les par impulsion pour recueillir le contenu.
2. Préparez le mélange réactionnel d'hybridation conformément au Tableau 8 dans un nouveau tube LoBind de 1,5 ml.

| Réactif | 1 x pool (µl) | 2 x pool (µl) (y compris 0,5 excédent) | 3 x pool (µl) (y compris 0,5 excédent) |
|--|---------------|---|---|
| Nuclease-free Water (couvercle transparent ; ○) | 2,5 | 6,25 | 8,75 |
| Hybridisation Buffer (couvercle rouge ; ●) | 7,5 | 18,75 | 26,25 |
| Formamide (couvercle jaune ; ●) | 3,5 | 8,75 | 12,25 |
| TOTAL | 13,5 | 33,75 | 47,25 |

Tableau 8 : Mélange réactionnel d'hybridation.

3. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
4. **Passez immédiatement** à la section « Pooling des échantillons et hybridation avec les amorces de capture ».

Pooling des échantillons et hybridation avec des amorces de capture

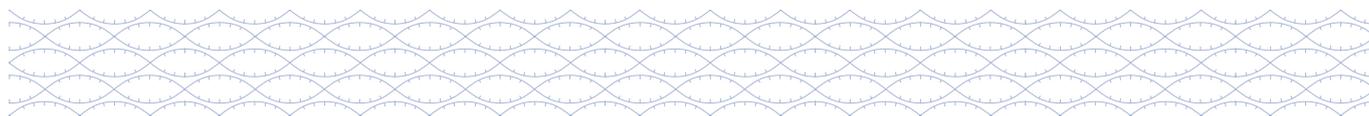
Durée estimée : 40 min pour 8 à 24 échantillons.

La réaction d'hybridation exige que des quantités égales d'ADN provenant de chaque échantillon soient combinées en un pool de 8 échantillons. Pour chaque groupe, effectuez une capture par hybridation. L'hybridation est réalisée de manière optimale avec la quantité maximale possible par échantillon, jusqu'à 500 ng. Pour les librairies dont le rendement est inférieur à 500 ng, ajustez l'entrée de tous les échantillons jusqu'au rendement le plus faible du pool d'hybridation.

1. Calculez les volumes de produit PCR précapture nécessaires pour combiner huit librairies et former un pool d'hybridation.



N'utilisez pas d'intrants inférieurs à 300 ng par échantillon ; contactez l'[Assistance OGT](#) pour obtenir de l'aide.



Préparation de la librairie : Hybridation universelle

2. Poolez une quantité égale de produit amplifié purifié de l'étape 3 (**300 ng-500 ng**) de chacune des huit librairies dans un tube LoBind de 1,5 ml.
Pour le panel SureSeq CLL+CNV V3 : Comprend 1 x librairie de référence SureSeq par pool, ainsi que 7 autres librairies. 1 x SureSeq Reference Female et 1 x SureSeq Reference Male – un total de 2 échantillons de référence doit être inclus dans un cycle de séquençage de 16 échantillons.
3. Ajoutez **10 µl** de Cot Human DNA (couvercle vert ; ●) à chaque pool.
4. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.



Avant utilisation, mélangez les billes au vortex pendant au moins 1 minute ou jusqu'à ce que la solution de billes apparaisse homogène et de couleur constante.

5. Ajoutez **2 x** volume de billes Mag-Bind TotalPure NGS du Post-PCR Universal Bead Kit à chaque pool.
Exemple : Dans un pool d'hybridation de 60 µl (+ 10 µl de Cot Human DNA), ajoutez 140 µl de billes.
6. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
7. Incubez à température ambiante pendant **5 minutes**.



8. Placez le(s) tube(s) dans le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (env. **3 à 5 min**).
9. En évitant le culot de billes, retirez et jetez le surnageant clarifié.
Conservez les billes contenant l'échantillon d'ADN.
10. Ajoutez **500 µl** d'éthanol à 80 % dans chaque tube sans remettre en suspension le culot de billes.
11. Incubez pendant **30 s**, puis retirez l'éthanol.
12. Séchez le culot pendant **environ 5 min** ou jusqu'à ce que l'éthanol résiduel s'évapore complètement.

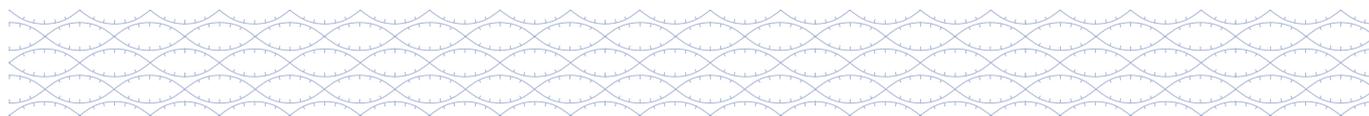


Ne pas trop sécher, car cela diminue le rendement. Le culot de billes est sec lorsque l'aspect de la surface passe du brillant au mat. Un séchage excessif entraîne des fissures dans le culot de billes.

13. Retirez le(s) tube(s) du support magnétique et ajoutez **13,5 µl** du mélange réactionnel d'hybridation directement au culot de billes pour éluer les librairies d'ADN poolées. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pour remettre les billes en suspension et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.



Assurez-vous que les billes sont bien remises en suspension. Pour des volumes plus importants de billes, il peut être nécessaire de mélanger au vortex plus longtemps pour assurer une remise en suspension complète.



Préparation de la librairie : Hybridation universelle

14. Incubez pendant **5 minutes** à température ambiante.
15. Identifiez un nouveau jeu de barrettes tubes PCR pour le(s) pool(s) et le mettre de côté jusqu'à ce qu'il soit nécessaire à l'étape 17.



Recommandation : Programmez le thermocycleur en utilisant les paramètres indiqués dans le Tableau 9. Enregistrez le programme sous le nom « Hybridation OGT ».



16. Placez le(s) tube(s) sur le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (env. **2 à 3 min**).
17. Transférez **13 µl** de l'éluat dans les tubes vides de l'étape 15. Les tubes contenant les billes peuvent être éliminés à ce stade.
18. Ajoutez **2 µl** de Index Blockers (couvercle bleu ; ●) au(x) pool(s).
19. Ajoutez **2 µl** de Panel-specific Baits dans le(s) pool(s).
20. Fermez les tubes, mélangez-les sur un agitateur à vortex et centrifugez-les pour en recueillir le contenu. Le volume final doit être de **17 µl**.
21. Veillez à ce que tous les bouchons soient bien fermés.
22. Placez les tubes dans le thermocycleur et exécutez le programme « Hybridation OGT » indiqué dans le Tableau 9. Dans la mesure du possible, réglez le couvercle chauffant à 105 °C, ou activez le couvercle chauffant pré-réglé.

| Étape | Température (°C) | Durée |
|-------|------------------|----------|
| 1 | 95 | 5 min |
| 2 | 65 | Maintien |

Tableau 9 : Profil d'incubation du programme « Hybridation OGT ».

23. Incubez le mélange d'hybridation pendant la nuit (**16 à 20 h**) à 65 °C.

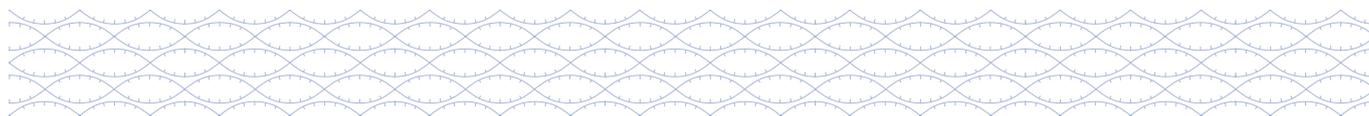


Évitez de dépasser 24 heures, car cela augmente le risque d'évaporation.

24. Continuez avec « Capture et lavage universels ».



Retirez le Hyb Wash Buffer (point bleu ; ●) et le Bead Priming Buffer (couvercle/point orange ; ●) de leur lieu de stockage (-15 °C à -25 °C) et laissez-les décongeler à température ambiante. Ils peuvent être laissés sur la paillasse pendant la nuit pour les laisser décongeler.



Préparation de la librairie : Capture et lavage universels

Capture et lavage universels

Vue d'ensemble



Les cibles hybridées sont liées à des billes de streptavidine et lavées pour éliminer tout ADN hors cible.

Durée estimée : 1,25 heure pour 8 à 24 échantillons. Temps de manipulation : 45 min.

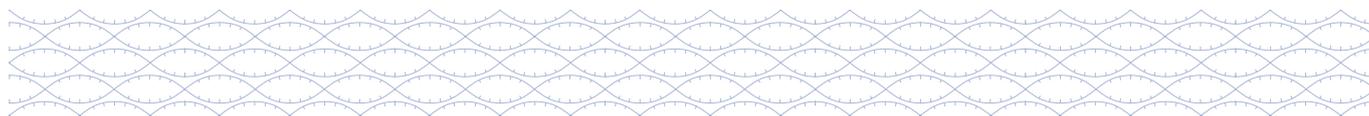
Avant de commencer :

- Préchauffez un thermocycleur à 65 °C pendant au moins **30 min avant l'utilisation.**
- Préchauffez un thermocycleur à 35 °C pendant au moins **30 min avant l'utilisation.**



Il est important de maintenir une température correcte ; il est recommandé de vérifier la température à l'aide d'un thermomètre calibré.

- Sortez les billes magnétiques Dynabeads M-270 Streptavidine du Post-PCR Universal Bead Kit du réfrigérateur au moins **30 minutes avant l'utilisation** pour leur permettre de se réchauffer à la température ambiante.
- Retirez le Hyb Wash Buffer (point bleu ; ●) et le Bead Priming Buffer (couverture/point orange ; ●) de leur lieu de stockage (-15 °C à -25 °C) et laissez-les décongeler à température ambiante. Ils peuvent être laissés sur la paille pendant la nuit pour les laisser décongeler.



Préparation de la librairie : Capture et lavage universels

Préparez le Hyb Wash Buffer pour une utilisation avec le CytoSure Constitutional NGS Panel uniquement

- Le CytoSure Constitutional NGS Panel nécessite l'ajout du composant A (couvercle marron ; ●) aux flacons de Hyb Wash Buffer.



Le composant A n'est **pas** requis pour les SureSeq Cancer Panels

- Retirez le composant A (couvercle brun ; ●) de son lieu de stockage (-15 °C à -25 °C) et laissez-le décongeler à température ambiante.
- Suivez le Tableau 10 pour connaître le volume requis en fonction de la taille du kit.

| Taille du kit | Volume du composant A à ajouter au flacon de Hyb Wash Buffer (µl) |
|---------------|---|
| 24 réactions | 100 |
| 96 réactions | 180 (par flacon de Hyb Wash Buffer) |

Tableau 10 : Volume du composant A à ajouter au flacon de Hyb Wash Buffer.

- Identifiez le flacon pour indiquer que le composant A a été ajouté.
- Inversez le flacon 10 fois après l'ajout du composant A.

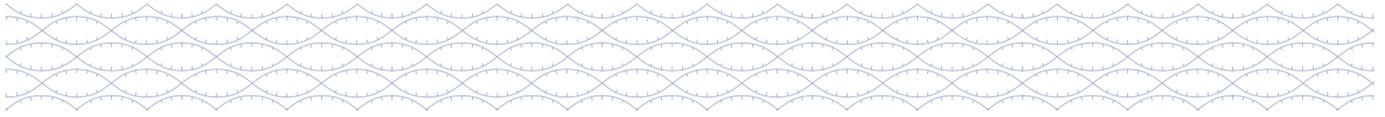
Préparez les sequence capture et les bead wash buffers

- Assurez-vous que le Hyb Wash Buffer et le Bead Priming Buffer sont entièrement décongelés.



Incubez à 37 °C pendant 5 à 10 minutes pour remettre en suspension les éventuels précipités. Il est possible de décongeler ces tampons à température ambiante pendant la nuit d'incubation.

- Ajoutez une aliquote de **6 x 200 µl** de Hyb Wash Buffer par pool d'hybridation dans des barrettes de tubes PCR comme indiqué dans la Figure 5 pour un pool d'hybridation.



Préparation de la librairie : Capture et lavage universels

3. Préchauffez les aliquotes aux températures suivantes dans un bloc thermique pendant au moins **30 minutes avant l'utilisation** :
 - 3 x 200 µl à 65 °C/pool
 - 3 x 200 µl à 35 °C/pool

| Pool 1 | Pool 1 |
|-----------------|-----------------|
| W1 ● | W1 ● |
| W2 ● | W2 ● |
| W3 ● | W3 ● |
| Lavages à 65 °C | Lavages à 35 °C |

Figure 5 : Préparation des aliquotes de Hyb Wash Buffer pour un pool d'hybridation.

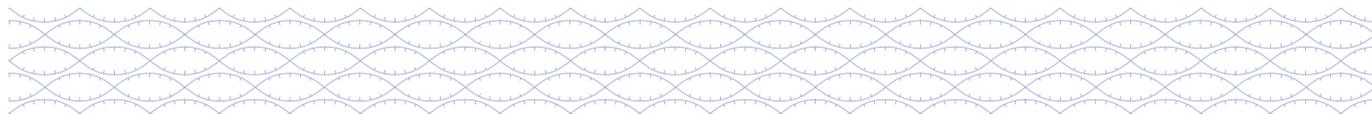
Préparation des billes magnétiques

1. Vortexez le puits de billes magnétiques de streptavidine Dynabeads M-270 pendant **1 min** en changeant l'orientation du tube **toutes les 15 secondes**.



Veillez à ce que les billes soient complètement dégagées du fond ou des parois du tube, car l'ajout d'un excès de billes aura un impact négatif sur les processus en aval. Ne pas centrifuger les billes magnétiques après le mélange.

2. Immédiatement avant l'utilisation, remettez en suspension les billes magnétiques de streptavidine Dynabeads M-270 à température ambiante à l'aide d'une pipette de **200 µl** réglée sur **100 µl** et en mélangeant de haut en bas au moins **10 fois**.



Préparation de la librairie : Capture et lavage universels

- Ajoutez **100 µl** de billes magnétiques de streptavidine Dynabeads M-270 dans un nouveau tube PCR ; une par pool d'hybridation.



Alternativement : Jusqu'à 400 µl de billes (pour quatre pools d'hybridation) peuvent être lavés en une seule fois dans un tube LoBind de 1,5 ml.



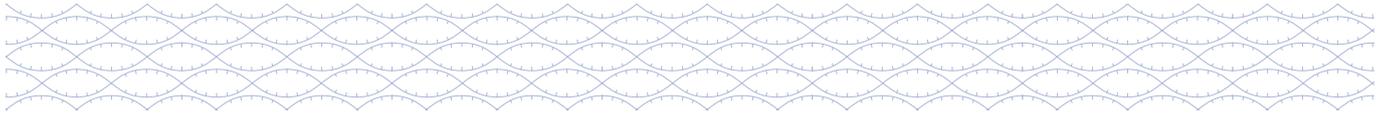
- Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (env. **10 s**).
- En évitant le culot de billes, retirez et jetez le surnageant clarifié (~**100 µl**).
- Ajoutez **200 µl** de 1 x Bead Priming Buffer par **100 µl** de billes. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
- Replacez le(s) tube(s) sur le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (env. **10 s**).
- En évitant le culot de billes, retirez et jetez le surnageant clarifié (~**200 µl**).
- Répétez les étapes 6 à 8 une fois, pour un total de **deux** lavages.
- Retirez du support magnétique et ajoutez le volume original de Bead Priming Buffer (c'est-à-dire que pour 100 µl de billes, ajoutez 100 µl de Bead Priming Buffer), mélangez sur un mélangeur à vortex et centrifugez par impulsion pour collecter le contenu.
- Si on lave plus de **100 µl** de billes par tube, identifiez un nouveau jeu de barrettes de tubes PCR et transférez les billes dans le(s) nouveau(x) tube(s) PCR (100 µl/pool).



- Placez le(s) tube(s) sur un support magnétique, laissez les billes se séparer du surnageant, puis retirez et jetez soigneusement le surnageant.



Passez immédiatement à l'étape « Effectuer une capture par hybridation ». Ne laissez pas les billes se dessécher. De petites quantités de Bead Priming Buffer résiduel n'interfèrent pas avec la liaison en aval de l'ADN aux billes magnétiques de streptavidine Dynabeads M-270.



Préparation de la librairie : Capture et lavage universels

Effectuer une capture par hybridation

1. Après l'incubation d'une nuit, conservez les échantillons hybridés sur le thermocycleur et transférez tous les échantillons hybridés (~17 µl de volume) sur les billes de streptavidine préparées.
2. Mélangez soigneusement à l'aide d'un mélangeur à vortex pendant **3 à 5 s** et assurez-vous que les billes sont remises en suspension. La centrifugation par impulsion permet d'en recueillir le contenu.
3. Remettez le(s) tube(s) dans le thermocycleur en maintenant le programme « Hybridation OGT » pendant **45 min**.
4. **Toutes les 15 minutes**, mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pendant **3 s** suivi d'une brève centrifugation pour recueillir le contenu. Les billes restent ainsi en suspension. Remplacez le(s) tube(s) dans un thermocycleur avec le programme « Hybridation OGT ».
5. Après 45 minutes d'incubation, retirez le(s) tube(s) du thermocycleur et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu. **Passez immédiatement** à l'étape suivante « Laver les billes de streptavidine pour éliminer l'ADN non lié ».



Maintenez le programme du thermocycleur « Hybridation OGT » en cours.

Lavez les billes de streptavidine pour éliminer l'ADN non lié



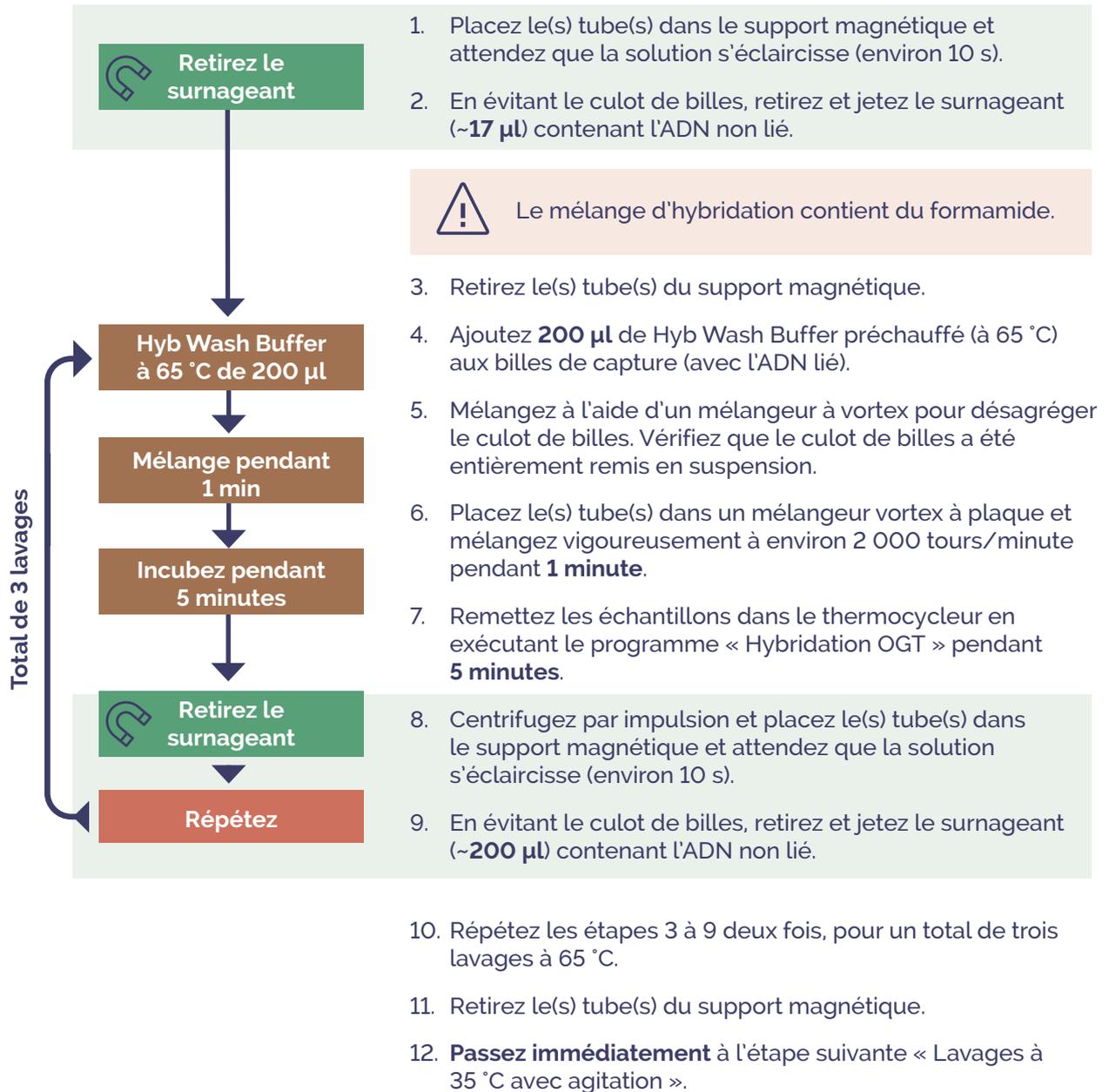
Travaillez rapidement pour vous assurer que la température ne descende pas en dessous de 65 °C. Pour ce faire, nous recommandons d'effectuer tous les lavages dans des barrettes de tubes PCR et d'utiliser une pipette multicanaux.



Après l'ajout d'un nouveau tampon, assurez-vous que le culot a été entièrement remis en suspension par un bref mélange au vortex suivi d'un contrôle visuel. N'utilisez pas de pipette pour le mélange.

Préparation de la librairie : Capture et lavage universels

Lavage à chaud à 65 °C



Préparation de la librairie : Capture et lavage universels

Lavages à 35 °C avec agitation

Hyb Wash Buffer
35 °C de 200 µl

Mélangez pendant
2 min

 Retirez le
surnageant

Hyb Wash Buffer
35 °C de 200 µl

Mélangez pendant
1 min

 Retirez le
surnageant

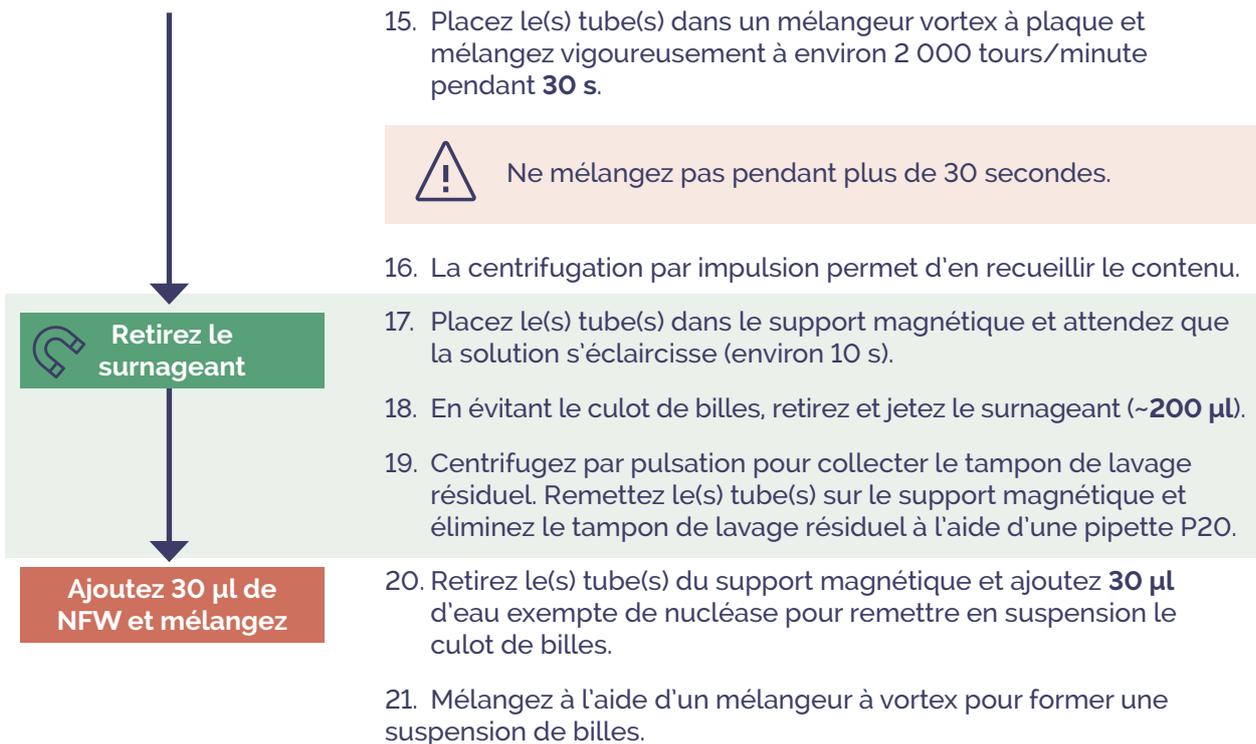
Hyb Wash Buffer
35 °C de 200 µl

Mélangez pendant
30 secondes

1. Ajoutez **200 µl** de Hyb Wash Buffer préchauffé (à 35 °C) aux billes de capture.
2. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pour désagréger le culot de billes. Vérifiez que le culot de billes a été entièrement remis en suspension.
3. Placez le(s) tube(s) dans un mélangeur vortex à plaque et mélangez vigoureusement à environ 2 000 tours/minute pendant **2 minutes**.
4. La centrifugation par impulsion permet d'en recueillir le contenu.
5. Placez le(s) tube(s) dans le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (environ 10 s).
6. En évitant le culot de billes, enlevez et jetez le surnageant contenant l'ADN non lié (~**200 µl**).
7. Ajoutez **200 µl** de Hyb Wash Buffer préchauffé (à 35 °C) aux billes de capture.
8. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pour désagréger le culot de billes. Vérifiez que le culot de billes a été entièrement remis en suspension.
9. Placez le(s) tube(s) dans un mélangeur vortex à plaque et mélangez vigoureusement à environ 2 000 tours/minute pendant **1 minute**.
10. La centrifugation par impulsion permet d'en recueillir le contenu.
11. Placez le(s) tube(s) dans le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (environ 10 s).
12. En évitant le culot de billes, enlevez et jetez le surnageant contenant l'ADN non lié (~**200 µl**).
13. Ajoutez **200 µl** de Hyb Wash Buffer préchauffé (à 35 °C) aux billes de capture.
14. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pour désagréger le culot de billes. Vérifiez que le culot de billes a été entièrement remis en suspension.

Préparation de la librairie : Capture et lavage universels

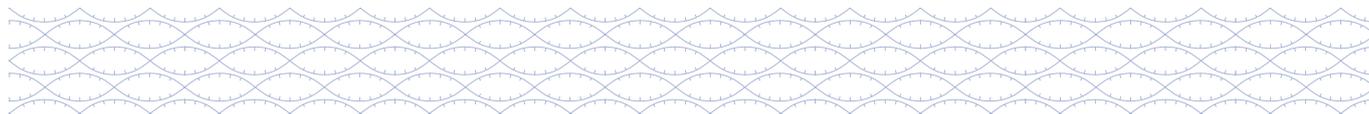
Lavages à 35 °C avec agitation (suite)



Recommandation : Si vous passez immédiatement à « Étape 4 : PCR précapture », « Étape 4 : Mélange d'amorces » et « Étape 4 : Tampon PCR » peuvent être retirés de leur emballage pour être décongelés à température ambiante.



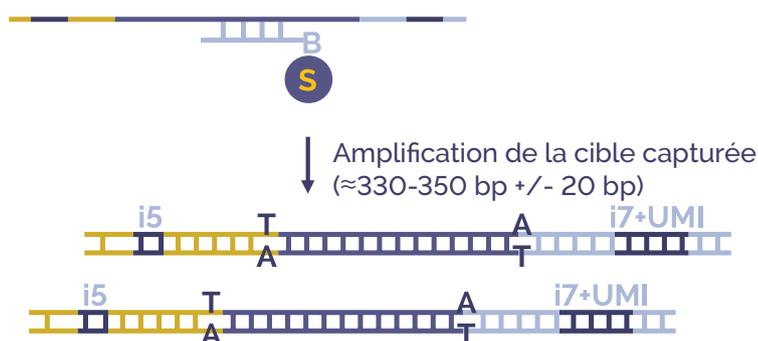
POINT D'ARRÊT FACULTATIF : Si les échantillons ne sont pas utilisés immédiatement, conservez la suspension de billes à 4 °C. Ne pas congeler la suspension de billes. Si vous continuez, passez à la section « PCR post-capture ».



Préparation de la librairie : Étape 4

PCR post-capture

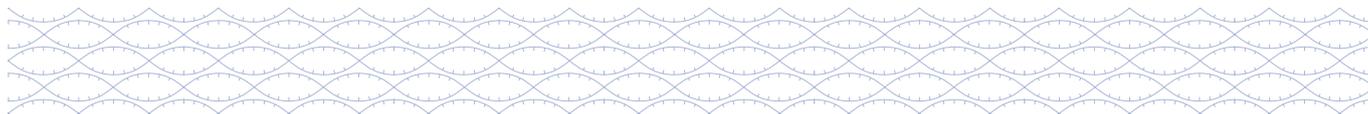
Vue d'ensemble



Après la capture des fragments cibles, l'ADNss lié aux billes de streptavidine est amplifié.

Avant de commencer :

- Sortez les billes Mag-Bind TotalPure NGS du Post-PCR Universal Bead Kit du réfrigérateur au moins **30 minutes avant l'utilisation** pour leur permettre de se réchauffer à la température ambiante.
- Préparez une nouvelle solution d'éthanol à 80 % en utilisant de l'éthanol de qualité biologie moléculaire et de l'eau de qualité biologie moléculaire.
- Retirez « Étape 4 : Primer Mix (couverture violet ; ●) » et « Étape 4 : PCR Buffer (couverture violet ; ●) » du stockage (-15 °C à -25 °C) et laissez-les décongeler à température ambiante.
- Assurez-vous que tous les composants du tampon PCR sont dissous. Si nécessaire, mélangez au vortex et/ou incubiez à 37 °C jusqu'à dissolution.
- ❄ Retirez « Étape 4 : Polymérase PCR (couverture violet ; ●) » de son emballage (-15 °C à -25 °C) et placez sur de la glace.



Préparation de la librairie : Étape 4

Effectuez l'étape 4 : PCR post-capture

Durée estimée : 1,25 heure pour 8 à 24 échantillons. Temps de manipulation : 15 min.

1. Programmez le thermocycleur en utilisant les paramètres indiqués dans les Tableaux 11 et 12. Sauvegardez le programme sous le nom de « OGT PCR2 ». Dans la mesure du possible, réglez le couvercle chauffant à 105 °C, ou activez le couvercle chauffant préréglé.

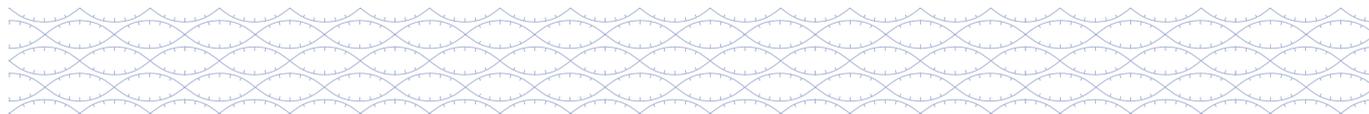
| Étape | Température (°C) | Durée |
|-------|---|----------|
| 1 | 98 | 3 min |
| 2 | 98 | 30 s |
| 3 | 65 | 30 s |
| 4 | 72 | 1 min |
| 5 | Répétez les étapes 2 à 4 pour un nombre total de cycles tel que spécifié dans le Tableau 12 | |
| 6 | 72 | 10 min |
| 7 | 4 | Maintien |

Tableau 11 : Profil d'incubation du programme « OGT PCR2 ».

| Nombre total de cycles PCR | Panel |
|----------------------------|--|
| 18 | 770001 - Core MPN |
| 16 | 770002 - Myeloid plus |
| | 770027 - CLL + CNV V3 |
| | 770005 - Germline Breast Cancer + CNV |
| | 770007 - Comprehensive FH |
| 15 | 770003 - Pan-Myeloid |
| 10 | 502003 - CytoSure Constitutional NGS Panel |

Tableau 12 : Nombre total de cycles PCR pour les différents panels OGT NGS. Remarque : si vous utilisez un MyPanel personnalisé, veuillez contacter votre FAS pour connaître le nombre de cycles PCR.

2. Mélangez « Étape 4 : Mélange d'amorces » et « Étape 4 : Tampon PCR » pendant **3 à 5 s** et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
- ❄ 3. Mélangez « Étape 4 : Polymérase PCR », centrifugez pour recueillir le contenu et conservez sur de la glace.



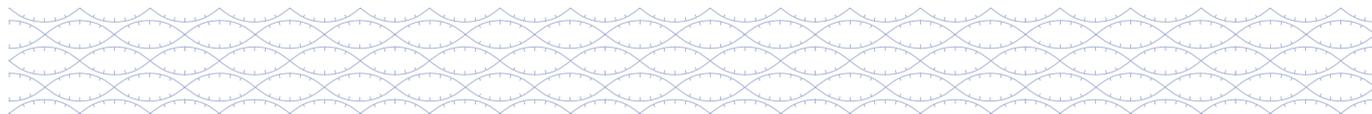
Préparation de la librairie : Étape 4

- Pour plusieurs pools, préparez le Post-capture PCR Master Mix conformément au Tableau 13 dans un nouveau tube LoBind de 1,5 ml.

| Réactif | 1 x pool (µl) | 2 x pool (µl) (y compris 0,5 excédent) | 3 x pool (µl) (y compris 0,5 excédent) |
|--|---------------|---|---|
| Captured cDNA in bead slurry | 14 | – | – |
| Nuclease-free Water (couvercle transparent ; ○) | 26,5 | 66,25 | 92,75 |
| Étape 4 : PCR Buffer (couvercle violet ; ●) | 5 | 12,5 | 17,5 |
| Étape 4 : Primer Mix (couvercle violet ; ●) | 2,5 | 6,25 | 8,75 |
| Étape 4 : PCR Polymerase (couvercle violet ; ●) | 2 | 5 | 7 |
| TOTAL | 50 | 90 | 126 |

Tableau 13 : Master Mix PCR Post-capture.

- Mélangez le mélange réactionnel de PCR post-capture à l'aide d'un mélangeur à vortex pendant **3 à 5 s** et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
- Identifiez un nouveau jeu de barrettes de tubes PCR pour chaque réaction PCR.
- Ajoutez **36 µl** de mélange réactionnel de PCR post-capture dans le(s) tube(s) de l'étape 5.
- Remettez en suspension les billes en mélangeant à la pipette de haut en bas au moins 10 fois pour s'assurer que les billes sont homogènes. Ajoutez **immédiatement 14 µl** de suspension de billes bien mélangée dans chaque tube.
- Mélangez à la pipette au moins 10 fois.
- Transférez dans le thermocycleur et lancez le programme « OGT PCR2 ».



Préparation de la librairie : Étape 4

Réalisez une purification PCR post-capture

Durée estimée : 40 min pour 8 à 24 échantillons.



Avant utilisation, mélangez les billes au vortex pendant au moins 1 minute ou jusqu'à ce que la solution de billes apparaisse homogène et de couleur constante.

Dans les tubes d'échantillon d'ADN :

1. Ajoutez **45 µl** de billes Mag-Bind TotalPure NGS homogènes, à température ambiante, provenant du Post-PCR Universal Bead Kit, dans chaque tube d'échantillon d'ADN. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex pour remettre les billes en suspension et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
2. Incubez à température ambiante pendant **5 minutes**.



3. Placez le(s) tube(s) dans le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (env. **3 à 5 min**).
4. En évitant le culot de billes, retirez et jetez le surnageant clarifié (**~95 µl**). **Conservez les billes contenant l'échantillon d'ADN.**
5. Ajoutez **200 µl** d'éthanol à 80 % dans chaque tube sans remettre en suspension le culot de billes.
6. Incubez pendant **30 secondes** puis retirez l'éthanol.
7. Répétez le lavage (étapes 5 et 6) une fois, pour un total de deux lavages.
8. Fermez le(s) tube(s) et centrifugez par impulsion pour recueillir l'éthanol résiduel. Remettez le(s) tube(s) sur le support magnétique pendant **30 s**. Éliminez l'éthanol résiduel à l'aide d'une pipette P20.
9. Séchez le(s) culot(s) de billes à température ambiante pendant **1 à 2 min**.



Ne pas trop sécher, car cela diminue le rendement. Le culot de billes est sec lorsque l'aspect de la surface passe du brillant au mat. Un séchage excessif entraîne des fissures dans le culot de billes.

10. Retirez du support magnétique et ajoutez **32 µl** d'eau exempte de nucléase directement au culot de billes pour éluer l'échantillon d'ADN. Mélangez à l'aide d'un mélangeur à vortex et centrifugez par impulsion pour recueillir le contenu.
11. Incubez pendant **5 minutes** à température ambiante.

Préparation de la librairie : Étape 4

12. Identifiez un nouveau jeu de barrettes de tubes PCR pour le(s) éluat(s) et le(s) mettre de côté jusqu'à ce qu'il(s) soit/soient requis à l'étape 14.

 13. Placez le(s) tube(s) sur le support magnétique et attendez que la solution s'éclaircisse (env. **2 à 3 min**).

14. Transférez **30 µl** d'éluat contenant le(s) produit(s) PCR post-capture purifié(s) dans le(s) tube(s) de l'étape 12. Le(s) tube(s) contenant les billes peut/peuvent être jeté(s) à ce moment-là.

15. Évaluez la taille du produit amplifié à l'aide du Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System. L'électrophérogramme doit montrer un pic de 330–350 bp (+/- 20 bp) (Figure 6). Installez l'instrument et préparez la cassette, les échantillons et l'échelle en suivant les instructions du fabricant.

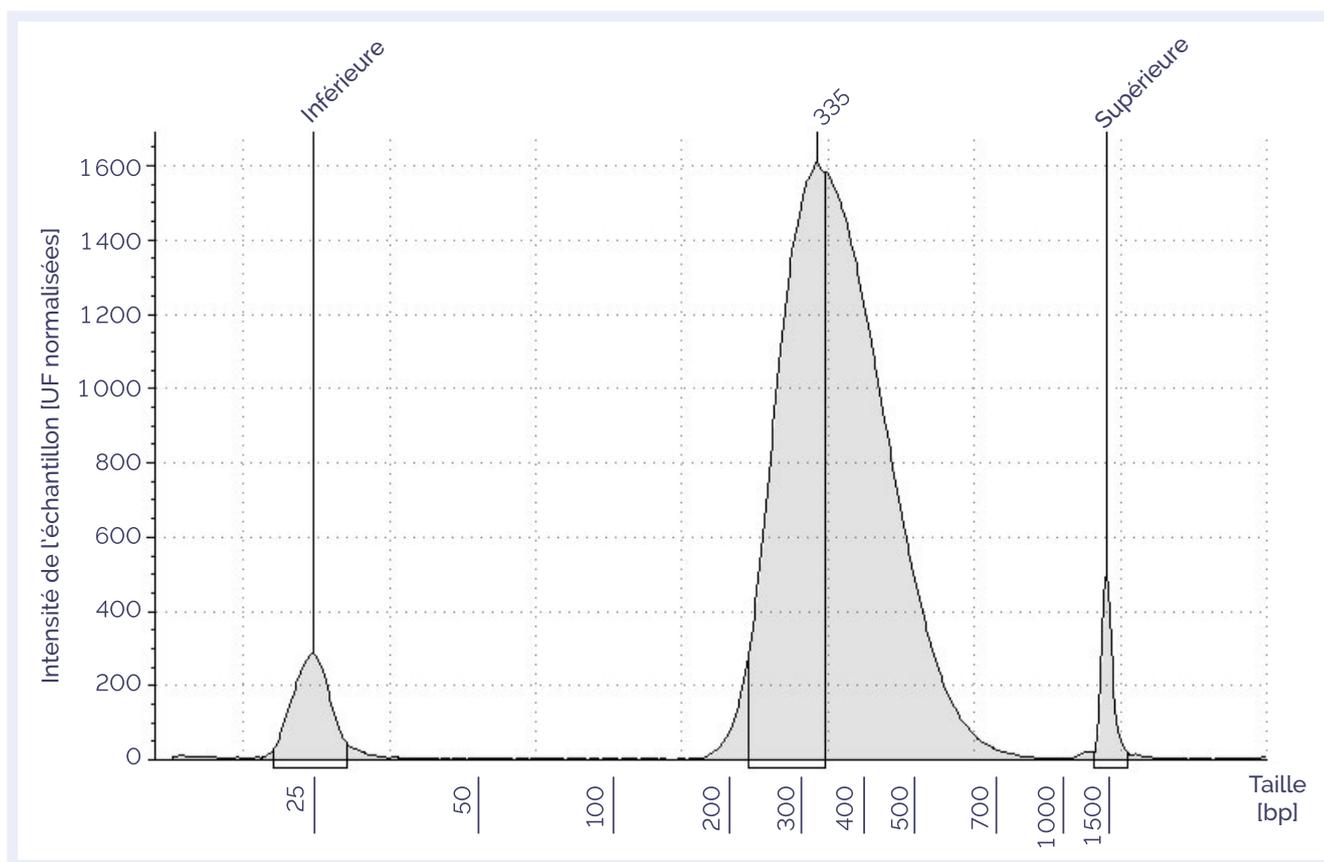
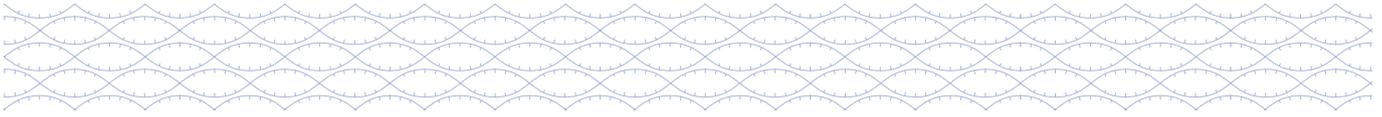


Figure 6 : Electrophérogramme du produit PCR post-capture purifié généré à l'aide du Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape. L'électrophérogramme montre un pic maximal dans la gamme de taille d'environ 330–350 bp (+/- 20 bp).



La taille des fragments en dehors de cette fourchette peut réduire la qualité des données de séquençage. Contactez votre ingénieur d'application (FAS) pour plus d'informations.



Préparation de la librairie : Étape 4

- Évaluez le rendement en utilisant **1 µl** de produit amplifié avec le Qubit dsDNA HS Kit, conformément aux instructions du fabricant. Le rendement attendu dépend du panel et se situe entre 1 et 10 ng/µl. Contactez votre ingénieur d'application (FAS) pour plus d'informations.



POINT D'ARRÊT FACULTATIF : Si les échantillons ne sont pas utilisés immédiatement, conservez-les à 4 °C pendant la nuit ou à -20 °C pour un stockage à long terme. Si vous continuez, passez à la section « Séquençage ».

Séquençage

Séquençage

Vue d'ensemble

Les pools de capture d'ADN préparés dans la section précédente (PCR post-capture) doivent être combinés de manière à ce que chaque pool soit présent en quantités équimolaires lorsqu'il est chargé sur le séquenceur. Cela nécessite à la fois une détermination précise de la taille du pic (bp), fournie par Agilent TapeStation (High Sensitivity Kit), et une détermination précise de la concentration de l'échantillon (ng/µl), fournie par le dosage Thermo Fisher Scientific Qubit (High Sensitivity).

Préparation du pool de séquençage



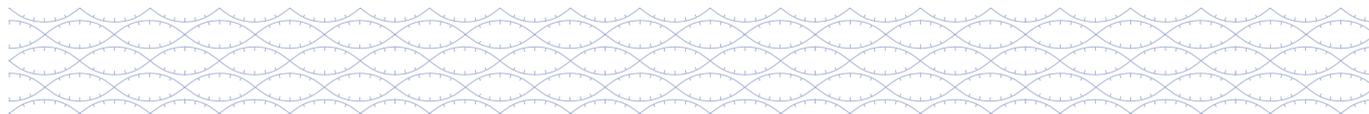
Une feuille de travail peut être créée en utilisant le modèle « OGT_ULPK_Worksheet » fourni par OGT. Vous pouvez également utiliser les formules ci-dessous.

- Utilisez votre feuille de calcul décrite ci-dessus ou les formules ci-dessous pour déterminer le volume (µl) de chaque pool de capture d'ADN nécessaire pour générer le pool de séquençage de 4 nM.



Ce protocole a été validé avec des lectures de 150 bases en paired-end à l'aide du MiSeq Reagent Kit v2 300 cycle (Illumina cat.° MS-102-2002) et du NextSeq 550 High-Output Kit 2 x 150 bp (Illumina cat.° 20024908).

- Complétez les tableaux « Paramètres de pool de séquençage » et « Échantillons » dans l'onglet « PCR2 » du modèle de pooling. Les cellules en vert doivent être modifiées manuellement si nécessaire ; les paramètres marqués d'un astérisque (*) doivent être fournis.



Séquençage

3. Ajoutez le volume approprié de chaque pool de séquençage indexé dans un nouveau tube LoBind de 1,5 ml nommé « Pool de séquençage de 4 nM » ; les volumes sont indiqués dans la colonne intitulée « Volume de produit PCR2 à pipeter » dans les onglets « Volumes à pipeter ».
4. Ajustez le volume final du pool de séquençage avec de l'eau exempte de nucléase à la concentration finale souhaitée (4 nM). Il se trouve dans la colonne B des onglets « Volumes à pipeter » à côté de « Volume d'eau exempte de nucléase à pipeter ».
5. Validation de la concentration du pool de séquençage : Évaluez la distribution de la taille des pics du pool de séquençage à l'aide du Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System et évaluez le rendement à l'aide du Qubit dsDNA HS Kit. Complétez l'onglet « Validation et dilution du pool » pour déterminer la concentration molaire du pool de séquençage.
6. Le pool de séquençage est prêt à être chargé sur le séquenceur.



POINT D'ARRÊT FACULTATIF : Si le pool de séquençage n'est pas utilisé immédiatement, conservez-le à -20 °C pour une conservation à long terme. Si vous continuez, passez à la section « Préparation de la feuille d'échantillons ».

Formule 1 - nM de chaque échantillon

$$nM = \frac{[Concentration\ de\ l'échantillon\ (ng/\mu l)] \times 10^6}{([Taille\ de\ l'échantillon\ en\ bp] \times 660) + 157,9}$$

Formule 2 - volume de chaque échantillon d'ADN indexé

$$\text{Volume de l'échantillon indexé} = \frac{\text{Pool de séquençage } (\mu l) \times \text{concentration du pool (4 nM)}}{\text{Nombre d'échantillons dans le pool} \times \text{concentration nM de l'échantillon}}$$

Séquençage

Préparation de la feuille d'échantillons



Une feuille d'échantillons MiSeq peut être créée à l'aide du guide de pool MiSeq fourni par OGT.

1. Ouvrez la feuille de travail complétée et cliquez sur l'onglet « Sample Sheet » correspondant.

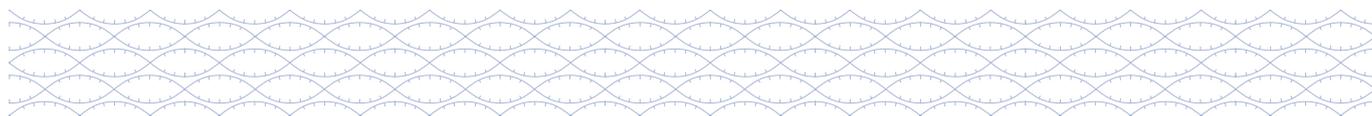


Cette feuille sera automatiquement remplie avec les paramètres et les données d'échantillons introduits dans les feuilles « PCR1 » et « PCR2 ».

2. Surlignez toutes les cellules contenant du texte, comme indiqué dans la Figure 7. Ajustez le nombre de lignes surlignées comme il convient.

| [Header] | | | | | | | | | | |
|------------|-------------------|---------------------|--------------|-------------|-------------|------------------|-------------|----------|---------------------|-------------|
| 1 | [Header] | | | | | | | | | |
| 2 | IEMFileVersion | 4 | | | | | | | | |
| 3 | Investigator Name | 0 | | | | | | | | |
| 4 | Project Name | Example Samplesheet | | | | | | | | |
| 5 | Experiment Name | Example Samplesheet | | | | | | | | |
| 6 | Date | 19/12/2023 | | | | | | | | |
| 7 | Workflow | GenerateFASTQ | | | | | | | | |
| 8 | Application | FASTQ Only | | | | | | | | |
| 9 | Assay | OGT_enrichment | | | | | | | | |
| 10 | Description | | | | | | | | | |
| 11 | Chemistry | Amplicon | | | | | | | | |
| 12 | | | | | | | | | | |
| [Reads] | | | | | | | | | | |
| 14 | | 150 | | | | | | | | |
| 15 | | 150 | | | | | | | | |
| 16 | | | | | | | | | | |
| [Settings] | | | | | | | | | | |
| 18 | ReverseComplement | 0 | | | | | | | | |
| 19 | | | | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | | | | |
| 21 | | | | | | | | | | |
| 22 | | | | | | | | | | |
| [Data] | | | | | | | | | | |
| 24 | Sample_ID | Sample_Name | Sample_Plate | Sample_Well | I7_Index_ID | index | I5_Index_ID | index2 | Sample_Project | Description |
| 25 | Sample01 | Sample01 | | | 1 | CTGATCGTNNNNNNNN | 501 | ATATGCGC | Example Samplesheet | |
| 26 | Sample02 | Sample02 | | | 2 | ACTCTCGANNNNNNNN | 502 | TGGTACAG | Example Samplesheet | |
| 27 | Sample03 | Sample03 | | | 3 | TGAGCTAGNNNNNNNN | 503 | AACCGTTC | Example Samplesheet | |
| 28 | Sample04 | Sample04 | | | 4 | GAGACGATNNNNNNNN | 504 | TAACCGGT | Example Samplesheet | |
| 29 | Sample05 | Sample05 | | | 5 | CTTGTGANNNNNNNN | 505 | GAACATCG | Example Samplesheet | |
| 30 | Sample06 | Sample06 | | | 6 | TTCCAAGNNNNNNNN | 506 | CCTGTGAG | Example Samplesheet | |
| 31 | Sample07 | Sample07 | | | 7 | CGCATGATNNNNNNNN | 507 | TCAGGCTT | Example Samplesheet | |
| 32 | Sample08 | Sample08 | | | 8 | ACGGACANNNNNNNN | 508 | GTTCTCGT | Example Samplesheet | |
| 33 | Sample09 | Sample09 | | | 9 | CGGCTAATNNNNNNNN | 509 | AGAACGAG | Example Samplesheet | |
| 34 | Sample10 | Sample10 | | | 10 | ATGATGCTNNNNNNNN | 510 | TGCTTCCA | Example Samplesheet | |
| 35 | Sample11 | Sample11 | | | 11 | GCAAGATCNNNNNNNN | 511 | CTTCGACT | Example Samplesheet | |
| 36 | Sample12 | Sample12 | | | 12 | GCTATCCTNNNNNNNN | 512 | CACCTGTT | Example Samplesheet | |
| 37 | Sample13 | Sample13 | | | 13 | TACGGTACNNNNNNNN | 513 | ATCACACG | Example Samplesheet | |
| 38 | Sample14 | Sample14 | | | 14 | TGGACTCTNNNNNNNN | 514 | CCGTAAAG | Example Samplesheet | |
| 39 | Sample15 | Sample15 | | | 15 | AGAGTAGCNNNNNNNN | 515 | TACGCTTT | Example Samplesheet | |
| 40 | Sample16 | Sample16 | | | 16 | ATCCAGAGNNNNNNNN | 516 | CGACGTTA | Example Samplesheet | |

Figure 7 : Exemple de feuille d'échantillons sur le modèle de pooling MiSeq.



Séquençage

3. Copiez les cellules surlignées et collez-les dans un nouveau fichier Excel.



Le texte en rouge est destiné à l'utilisateur et aux informations spécifiques à l'échantillon. Tout le texte en noir est nécessaire pour que le séquenceur reconnaisse le fichier.

4. Enregistrez la nouvelle feuille sous forme de fichier CSV (délimité par des virgules).
5. La feuille d'échantillons peut maintenant être téléchargée dans le séquenceur par « Chargement manuel de la feuille d'échantillons ».



POINT D'ARRÊT FACULTATIF : Si le pool de séquençage n'est pas utilisé immédiatement, conservez-le à -20 °C pour une conservation à long terme. Si vous continuez, passez à la section « Dénaturation et chargement du pool de séquençage » ou reportez-vous au protocole Illumina approprié.

Dénaturation et chargement du pool de séquençage

1. Suivez le protocole Illumina approprié pour dénaturer le pool de séquençage.



Si le séquenceur n'a qu'une seule étape de dilution, suivez le protocole Illumina pour le chargement. Si le séquenceur nécessite une étape de dilution secondaire, par exemple la dilution du pool dénaturé de 20 pM au pool de chargement de 12 pM sur un MiSeq, passez à l'étape 2.



2. Après dénaturation, augmentez le volume du pool à 1 ml avec du HT1 glacé pour diluer votre pool dénaturé à ~20 pM et conservez-le sur de la glace.



Les volumes de HT1 nécessaires varient en fonction du volume de pool dénaturé, dicté par le type de séquenceur. La concentration réelle du pool de ~20 pM est indiquée dans l'onglet « Validation et dilution du pool » de la feuille de travail et dépend de la concentration du pool de séquençage.

3. Entrez la concentration de chargement du séquenceur requise dans l'onglet « Validation et dilution du pool » de votre feuille de calcul.

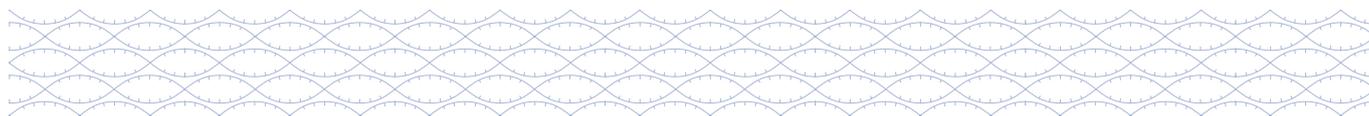


La densité des clusters peut varier d'une machine à l'autre. Nous recommandons de charger une concentration finale de 8 à 12 pM si vous utilisez un MiSeq V2 300 cycle kit et de 1,4 pM si vous utilisez un NextSeq 500/550 High-Output Kit.

4. Diluez le pool dénaturé de 20 pM à cette concentration de chargement en pipettant les volumes indiqués dans l'onglet « Validation et dilution du pool » de votre feuille de travail.



En cas d'utilisation d'un NextSeq, le pool de séquençage doit être combiné avec 5 % de PhiX dénaturé avant le run, conformément au protocole d'Illumina.



Séquençage

5. Pipettez le pool de chargement dans la cartouche du séquenceur et configurez le séquençage conformément au protocole d'Illumina.
6. Si vous utilisez BaseSpace, sélectionnez « + Kit de préparation de librairie personnalisée » dans le menu déroulant Kit de préparation de librairie.
7. Utilisez les informations du Tableau 14 et du Tableau 15 de l'annexe pour créer le « Universal NGS Library Preparation Kit ».
8. Le « Universal NGS Library Preparation Kit » sera désormais disponible pour le séquençage.

Annexe

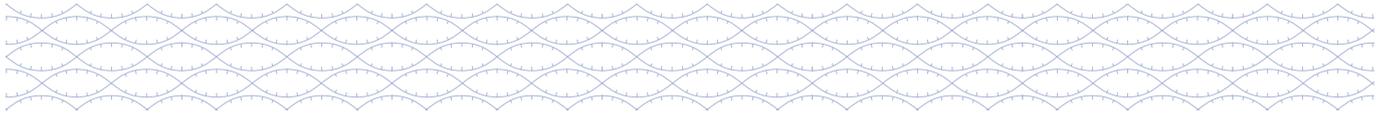
Séquences d'adaptateurs

| Adaptateur | Séquence |
|------------|-----------------------------------|
| 1 | AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA |
| 2 | AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT |

Tableau 14 : Séquences d'adaptateurs - configuration en amont. Veuillez noter que certains instruments de séquençage Illumina nécessitent le complément inverse de la séquence de l'adaptateur Index 2 (i5).

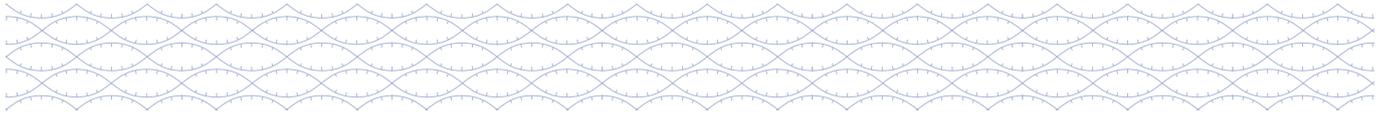
Séquences d'index

| I7_Index_ID | Séquence de l'index 1 | I5_Index_ID | Séquence de l'index 2 |
|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|
| 1 | CTGATCGTNNNNNNNN | 501 | ATATGCGC |
| 2 | ACTCTCGANNNNNNNNN | 502 | TGGTACAG |
| 3 | TGAGCTAGNNNNNNNNNN | 503 | AACCGTTC |
| 4 | GAGACGATNNNNNNNN | 504 | TAACCGGT |
| 5 | CTTGTCGANNNNNNNNN | 505 | GAACATCG |
| 6 | TTCCAAGGNNNNNNNNN | 506 | CCTTGTAG |
| 7 | CGCATGATNNNNNNNN | 507 | TCAGGCTT |



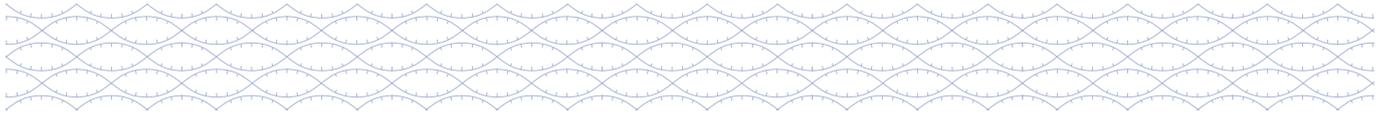
Annexe

| I7_Index_ID | Séquence de l'index 1 | I5_Index_ID | Séquence de l'index 2 |
|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|
| 8 | ACGGAACANNNNNNNN | 508 | GTTCTCGT |
| 9 | CGGCTAATNNNNNNN | 509 | AGAACGAG |
| 10 | ATCGATCGNNNNNNNN | 510 | TGCTTCCA |
| 11 | GCAAGATCNNNNNNNN | 511 | CTTCGACT |
| 12 | GCTATCCTNNNNNNNN | 512 | CACCTGTT |
| 13 | TACGCTACNNNNNNN | 513 | ATCACACG |
| 14 | TGGACTCTNNNNNNNN | 514 | CCGTAAGA |
| 15 | AGAGTAGCNNNNNNNN | 515 | TACGCCTT |
| 16 | ATCCAGAGNNNNNNNN | 516 | CGACGTTA |
| 17 | GACGATCTNNNNNNN | 517 | ATGCACGA |
| 18 | AACTGAGCNNNNNNNN | 518 | CCTGATTG |
| 19 | CTTAGGACNNNNNNNN | 519 | GTAGGAGT |
| 20 | GTGCCATANNNNNNNN | 520 | ACTAGGAG |
| 21 | GAATCCGANNNNNNNN | 521 | CACTAGCT |
| 22 | TCGCTGTTNNNNNNNN | 522 | ACGACTTG |
| 23 | TTCGTTGGNNNNNNNN | 523 | CGTGTGTA |
| 24 | AAGCACTGNNNNNNNN | 524 | GTTGACCT |
| 25 | CCTTGATCNNNNNNNN | 525 | ACTCCATC |
| 26 | GTCGAAGANNNNNNNN | 526 | CAATGTGG |
| 27 | ACCACGATNNNNNNNN | 527 | TTGCAGAC |
| 28 | GATTACCGNNNNNNNN | 528 | CAGTCCAA |
| 29 | GCACAACNNNNNNNN | 529 | ACGTTCCAG |
| 30 | GCGTCATTNNNNNNNN | 530 | AACGTCTG |
| 31 | ATCCGGTANNNNNNNN | 531 | TATCGGTC |



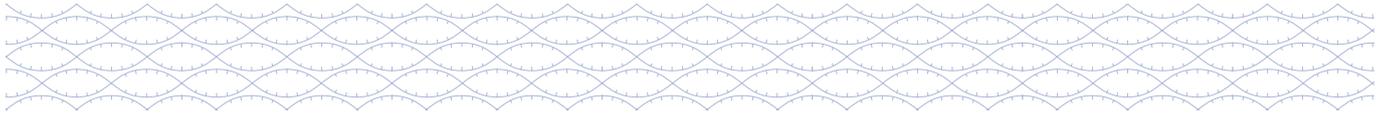
Annexe

| I7_Index_ID | Séquence de l'index 1 | I5_Index_ID | Séquence de l'index 2 |
|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|
| 32 | CGTTGCAANNNNNNNN | 532 | CGCTCTAT |
| 33 | GTGAAGTGNNNNNNNNN | 533 | GATTGCTC |
| 34 | CATGGCTANNNNNNNNN | 534 | GATGTGTG |
| 35 | ATGCCTGTNNNNNNNN | 535 | CGCAATCT |
| 36 | CAACACCTNNNNNNNN | 536 | TGGTAGCT |
| 37 | TGTGACTGNNNNNNNNN | 537 | GATAGGCT |
| 38 | GTCATCGANNNNNNNNN | 538 | AGTGGATC |
| 39 | AGCACTTCNNNNNNNNN | 539 | TTGGACGT |
| 40 | GAAGGAAGNNNNNNNNN | 540 | ATGACGTC |
| 41 | GTTGTTTCGNNNNNNNNN | 541 | GAAGTTGG |
| 42 | CGGTTGTTNNNNNNNN | 542 | CATACCAC |
| 43 | ACTGAGGTNNNNNNNNN | 543 | CTGTTGAC |
| 44 | TGAAGACGNNNNNNNNN | 544 | TGGCATGT |
| 45 | GTTACGCANNNNNNNN | 545 | ATCGCCAT |
| 46 | AGCGTGTTNNNNNNNN | 546 | TTGCGAAG |
| 47 | GATCGAGTNNNNNNNN | 547 | AGTTCGTC |
| 48 | ACAGCTCANNNNNNNN | 548 | GAGCAGTA |
| 49 | GAGCAGTANNNNNNNN | 549 | ACAGCTCA |
| 50 | AGTTCGTCNNNNNNNNN | 550 | GATCGAGT |
| 51 | TTGCGAAGNNNNNNNNN | 551 | AGCGTGTT |
| 52 | ATCGCCATNNNNNNNN | 552 | GTTACGCA |
| 53 | TGGCATGTNNNNNNNNN | 553 | TGAAGACG |
| 54 | CTGTTGACNNNNNNNN | 554 | ACTGAGGT |
| 55 | CATACCACNNNNNNNNN | 555 | CGGTTGTT |



Annexe

| I7_Index_ID | Séquence de l'index 1 | I5_Index_ID | Séquence de l'index 2 |
|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|
| 56 | GAAGTTGGNNNNNNNN | 556 | GTTGTTCCG |
| 57 | ATGACGTCNNNNNNNN | 557 | GAAGGAAG |
| 58 | TTGGACGTNNNNNNNN | 558 | AGCACTTC |
| 59 | AGTGGATCNNNNNNNN | 559 | GTCATCGA |
| 60 | GATAGGCTNNNNNNNN | 560 | TGTGACTG |
| 61 | TGGTAGCTNNNNNNNNNN | 561 | CAACACCT |
| 62 | CGCAATCTNNNNNNNN | 562 | ATGCCTGT |
| 63 | GATGTGTGNNNNNNNNNN | 563 | CATGGCTA |
| 64 | GATTGCTCNNNNNNNNNN | 564 | GTGAAGTG |
| 65 | CGCTCTATNNNNNNNN | 565 | CGTTGCAA |
| 66 | TATCGGTCNNNNNNNNNN | 566 | ATCCGGTA |
| 67 | AACGTCTGNNNNNNNN | 567 | GCGTCATT |
| 68 | ACGTTCAAGNNNNNNNN | 568 | GCACAAC |
| 69 | CAGTCCAANNNNNNNN | 569 | GATTACCG |
| 70 | TTGCAGACNNNNNNNN | 570 | ACCACGAT |
| 71 | CAATGTGGNNNNNNNN | 571 | GTCGAAGA |
| 72 | ACTCCATCNNNNNNNNNN | 572 | CCTTGATC |
| 73 | GTTGACCTNNNNNNNN | 573 | AAGCACTG |
| 74 | CGTGTGTANNNNNNNNNN | 574 | TTCGTTGG |
| 75 | ACGACTTGNNNNNNNNNN | 575 | TCGCTGTT |
| 76 | CACTAGCTNNNNNNNNNN | 576 | GAATCCGA |
| 77 | ACTAGGAGNNNNNNNNNN | 577 | GTGCCATA |
| 78 | GTAGGAGTNNNNNNNNNN | 578 | CTTAGGAC |
| 79 | CCTGATTGNNNNNNNNNN | 579 | AACTGAGC |



Annexe

| I7_Index_ID | Séquence de l'index 1 | I5_Index_ID | Séquence de l'index 2 |
|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|
| 80 | ATGCACGANNNNNNNNNN | 580 | GACGATCT |
| 81 | CGACGTTANNNNNNNNNN | 581 | ATCCAGAG |
| 82 | TACGCCTTNNNNNNNNNN | 582 | AGAGTAGC |
| 83 | CCGTAAGANNNNNNNNNN | 583 | TGGACTCT |
| 84 | ATCACACGNNNNNNNNNN | 584 | TACGCTAC |
| 85 | CACCTGTTNNNNNNNNNN | 585 | GCTATCCT |
| 86 | CTTCGACTNNNNNNNNNN | 586 | GCAAGATC |
| 87 | TGCTTCCANNNNNNNNNN | 587 | ATCGATCG |
| 88 | AGAACGAGNNNNNNNNNN | 588 | CGGCTAAT |
| 89 | GTTCTCGTNNNNNNNNNN | 589 | ACGGAACA |
| 90 | TCAGGCTTNNNNNNNNNN | 590 | CGCATGAT |
| 91 | CCTTGTAGNNNNNNNNNN | 591 | TTCCAAGG |
| 92 | GAACATCGNNNNNNNNNN | 592 | CTTGTCGA |
| 93 | TAACCGGTNNNNNNNNNN | 593 | GAGACGAT |
| 94 | AACCGTTCNNNNNNNNNN | 594 | TGAGCTAG |
| 95 | TGGTACAGNNNNNNNNNN | 595 | ACTCTCGA |
| 96 | ATATGCGCNNNNNNNNNN | 596 | CTGATCGT |

Tableau 15 : Séquences d'index. N désigne l'UMI. Veuillez noter que certains instruments de séquençage Illumina nécessitent le complément inverse de la séquence de l'adaptateur Index 2 (i5).

Annexe

Lignes directrices recommandées pour le séquençage

| Panel | Plate-forme de séquençage recommandée | Nombre d'échantillons par cycle de séquençage | Proposition relative à la taille du pool | Taille recommandée pour l'achat du kit | Nombre de cycles en fonction de la taille du kit acheté |
|---|---------------------------------------|---|--|---|---|
| 770001 - CoreMPN | MiSeq 300 V2 | 48 | 6 x 8-plex | 2 x 24 réactions | 1 cycle |
| | | | | 1 x 96 réactions | 2 cycles |
| 770002 - Myeloid Plus | MiSeq 300 V2 | 16 | 2 x 8-plex | 2 x 24 réactions | 3 cycles |
| | | | | 1 x 96 réactions | 6 cycles |
| 770027 - CLL+CNV v3 | MiSeq 300 V2 | 16 | 2 x 8-plex | 2 x 24 réactions | 3 cycles |
| | | | | 1 x 96 réactions | 6 cycles |
| 770003 - Pan Myeloid | MiSeq 300 V2 | 8 | 1 x 8-plex | 1 x 24 réactions | 3 cycles |
| | MiSeq 600 V3 | 16 | 2 x 8-plex | 2 x 24 réactions | 3 cycles |
| | | | | 1 x 96 réactions | 6 cycles |
| | NextSeq Mid-Output | 48 | 6 x 8-plex | 2 x 24 réactions | 1 cycle |
| 1 x 96 réactions | | | | 2 cycles | |
| 502003 - CytoSure Constitutional NGS | NextSeq High-Output | 24 | 3 x 8-plex | 1 x 24 réactions | 1 cycle |
| 770007 - CytoSure Comprehensive Familial Hypercholesterolaemia (FH) NGS | MiSeq 300 V2 | 16 | 3 x 8-plex | 2 x 24 réactions et 1 x 96 réactions | 3 et 6 cycles |

Tableau 16 : Lignes directrices recommandées pour le séquençage.

Annexe

Emplacement des tubes de réactifs

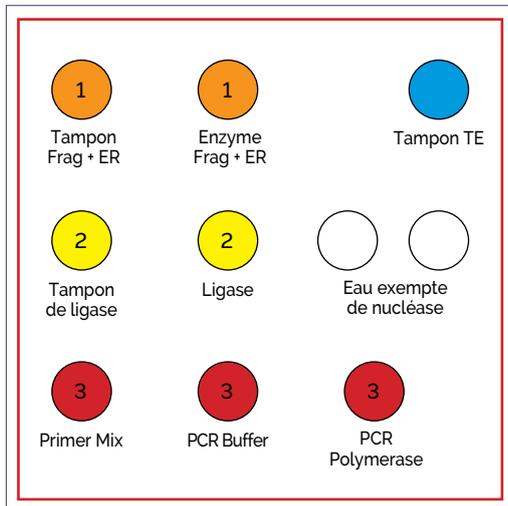


Figure 8 : Emplacement des tubes dans le 24 réaction Library Preparation Kit (770100-24).

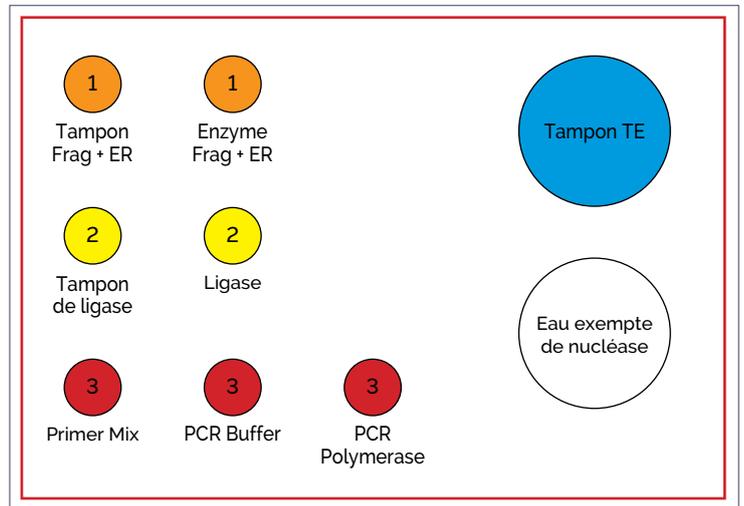


Figure 10 : Emplacement des tubes dans le 96 réaction Library Preparation Kit (770100-96).

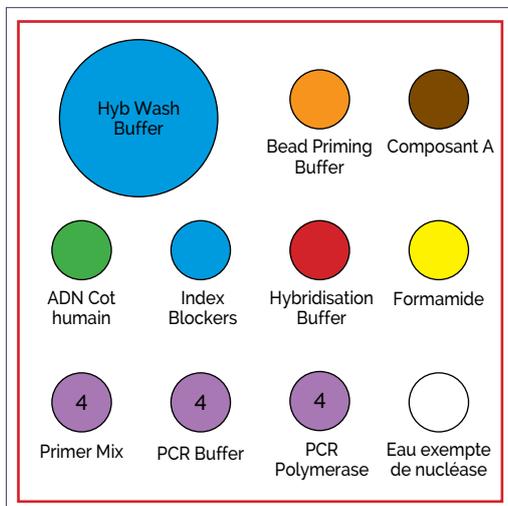


Figure 9 : Emplacement des tubes dans le 24 réaction Hybridisation & Wash Kit V2 (770410-24).

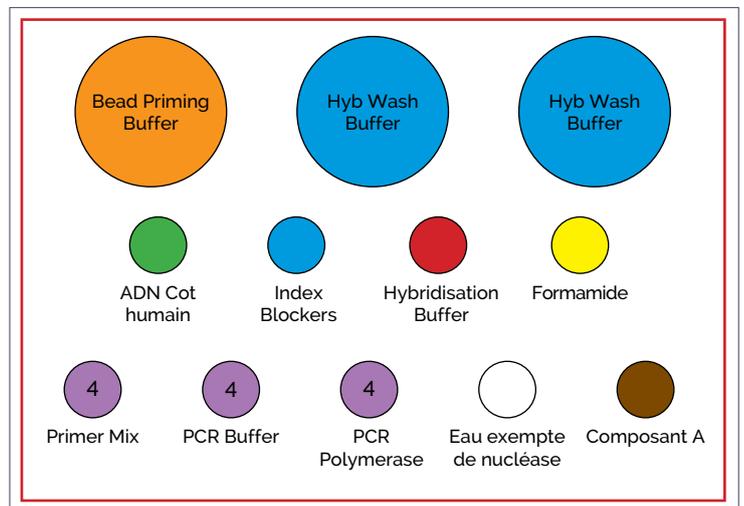
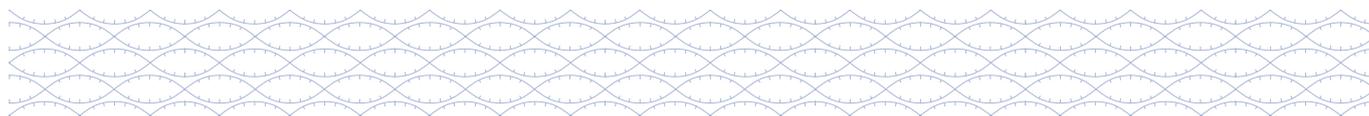


Figure 11 : Emplacement des tubes dans le 96 réaction Hybridisation & Wash Kit V2 (770410-96).



Informations juridiques

Ce manuel et son contenu appartiennent à © Oxford Gene Technology (Operations) Limited 2024. Tous droits réservés. La reproduction de l'ensemble ou d'une partie substantielle de son contenu sous quelque forme que ce soit est interdite, à l'exception des utilisateurs individuels qui peuvent imprimer ou sauvegarder des parties du protocole pour leur usage personnel. Cette licence ne permet pas aux utilisateurs d'incorporer le matériel ou une partie substantielle de celui-ci dans tout autre travail ou toute autre publication, que ce soit sous format papier ou électronique ou sous toute autre forme. En particulier (mais sans limitation), aucune partie substantielle du manuel ne peut être distribuée ou copiée à des fins commerciales.

Préparation de librairie NGS

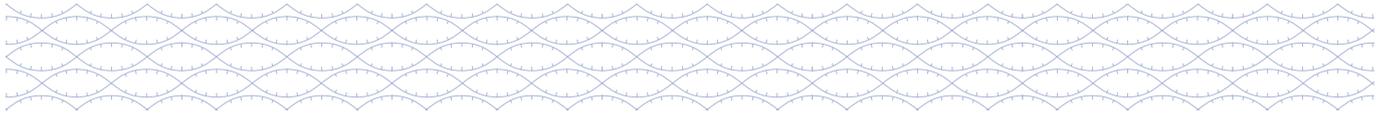
Le Universal NGS Library Preparation Kit a été développé par Oxford Gene Technology. L'acheteur a le droit non transférable d'utiliser et de consommer le produit à des fins de RECHERCHE UNIQUEMENT ET NON POUR DES PROCÉDURES DE DIAGNOSTIC. Il n'est pas destiné à être utilisé, et ne doit pas l'être, pour le diagnostic, la prévention, la surveillance, le traitement ou le soulagement d'une maladie ou d'un état, ou pour l'étude d'un processus physiologique, chez un être humain identifiable, ou à toute autre fin médicale.

Marques déposées

OGT™, SureSeq™, CytoSure® (Oxford Gene Technology) ; Agilent®, TapeStation® (Agilent Technologies Inc.) ; MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™, NovaSeq™ (Illumina Inc.) ; Dynabeads™, DynaMag™, NanoDrop™, Qubit® (Thermo Fisher Scientific) ; IKA™, Mag-Bind® (Omega Bio-tek, Inc) ; LoBind® (Eppendorf SE).

Obligations du client

Le client reconnaît qu'Oxford Gene Technology (Operations) Limited (ou les sociétés de son groupe) détient tous les droits de propriété intellectuelle relatifs à la conception du produit, y compris le choix et la configuration des séquences d'oligonucléotides utilisées dans le produit. Le produit ne peut être reproduit ou fabriqué que par Oxford Gene Technology (Operations) Limited ou avec son autorisation.



Informations de commande

| Produit | Contenu | N° de catégorie |
|------------------------------------|--|------------------------|
| Universal NGS Workflow Solution V2 | Lot de 1 x Universal Library Preparation Kit, 1 x Universal Index Adapters, 1 x Universal Hybridisation & Wash Kit, 1 x Universal Bead Kit | 770510-24 770510-96 |

Tableau 17 : Informations de commande.

Pour obtenir une liste de produits à jour et les dernières informations sur les produits, visitez le site suivant ogt.com

Contact

Royaume-Uni +44 (0) 1865 856826

États-Unis +1 914 467 5285

Support technique : support@ogt.com

contact@ogt.com

ogt.com

Oxford Gene Technology Ltd.

Unit 5, Oxford Technology Park, 4A Technology Drive, Kidlington, Oxfordshire, OX5 1GN,

Royaume-Uni



A Sysmex Group Company

**What binds us,
makes us.**

SureSeq™ et CytoSure® : Pour la recherche uniquement ; pas pour les procédures de diagnostic. Ce document et son contenu appartiennent à © Oxford Gene Technology IP Limited - 2024. Tous droits réservés. OGT™, CytoSure® et SureSeq™ sont des marques commerciales d'Oxford Gene Technology IP Limited.

Oxford Gene Technology (Operations) Ltd. Enregistré en Angleterre N° : 03845432 Unit 5, Oxford Technology Park, 4A Technology Drive, Kidlington, Oxfordshire, OX5 1GN, Royaume-Uni

990370 09/24