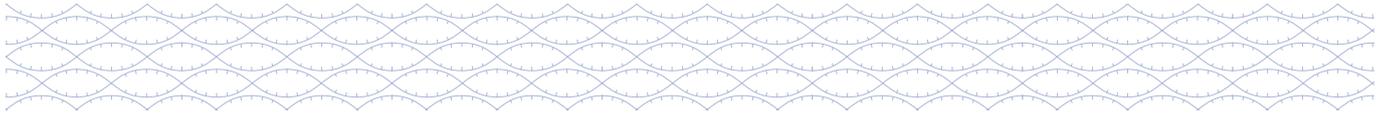
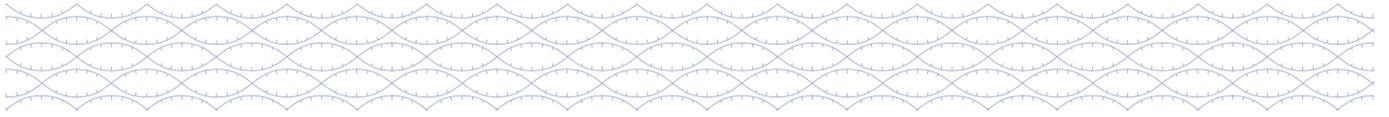


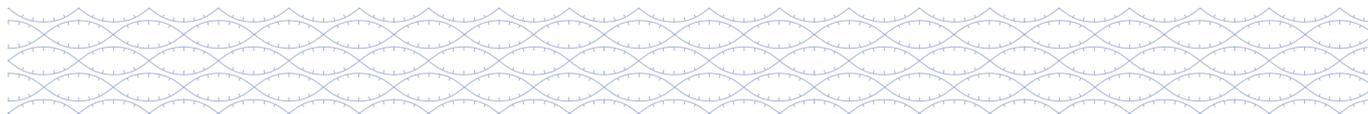
Manual de OGT

Universal NGS Workflow Solution V2



Índice





Introducción

Universal NGS Workflow Solution V2 se ha desarrollado y optimizado para su uso con cebadores de paneles genéticos SureSeq™ y CytoSure® diseñados por Oxford Gene Technology (OGT) para ofrecer una detección precisa de un amplio conjunto de variantes.

La gama de secuenciación de última generación (NGS) de OGT es compatible con los procesos químicos de los sistemas MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ y NovaSeq™ de Illumina.

El kit de 24 reacciones contiene suficientes reactivos como para procesar un conjunto de 8 muestras en tres ocasiones. En el caso del kit de 96 reacciones, incluye suficientes reactivos como para procesar un conjunto de 24 muestras en cuatro ocasiones.

Reactivos, consumibles y equipos

Reactivos suministrados por OGT

Contenido	Condiciones de transporte/conservación	N.º cat. (24 reacciones)	N.º cat. (96 reacciones)
Universal Library Preparation Kit	Transporte a -20 °C; conservación a -20 °C	770100-24	770100-96
Universal Index Adapters	Transporte a -20 °C; conservación a -20 °C	770200-24	770200-96
Universal Hybridisation & Wash Kit V2	Transporte a -20 °C; conservación a -20 °C	770410-24	770410-96
Pre-PCR Universal Bead Kit	Transporte a 4 °C; conservación a 4 °C	770310-24	770310-96
Post-PCR Universal Bead Kit	Transporte a 4 °C; conservación a 4 °C	770315-24	770315-96
SureSeq CLL-CNV V3 Panel			
SureSeq Reference DNA	Transporte a -20 °C; conservación a 4 °C	770600	-

Universal Library Preparation Kit
770100-24 y 770100-96



Universal Index Adapters
770200-24 y 770200-96



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



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

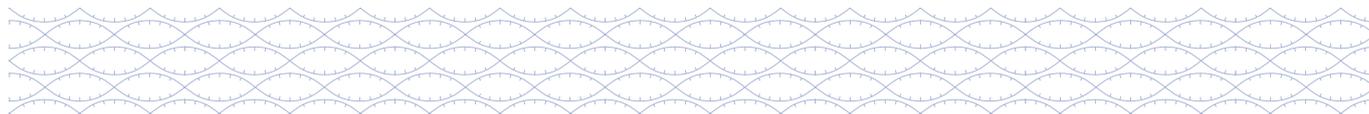


Post-PCR Universal Bead Kit
770315-24 y 770315-96



SureSeq Reference DNA
770600





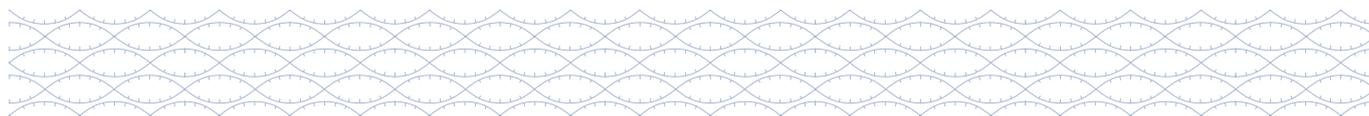
Reactivos, consumibles y equipos

Reactivos suministrados por el usuario

Componente	Proveedor recomendado	N.º cat.*
Etanol al 100 % de calidad para biología molecular	Proveedor general de productos de laboratorio	-
Agua de calidad para biología molecular	Proveedor general de productos de laboratorio	-
Solución de hidróxido de sodio 5,0 M de calidad para biología molecular	Proveedor general de productos de laboratorio	-
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 ciclos)	Illumina [†]	MS-102-2002
MiSeq Reagent Kit V3 (600 ciclos)	Illumina [†]	MS-102-3003
NextSeq 500/550 Mid-Output Kit v2.5 (300 ciclos)	Illumina [†]	20024905
NextSeq 500/550 High-Output Kit v2.5 (300 ciclos)	Illumina [†]	20024908
<i>Opcional: Genomic DNA ScreenTape</i>	<i>Agilent Technologies</i>	<i>5067-5365</i>
<i>Opcional: Genomic DNA Reagents</i>	<i>Agilent Technologies</i>	<i>5067-5366</i>

* Los números de catálogo corresponden al Reino Unido; podrían ser distintos en otros países. Para obtener más información, póngase en contacto con support@ogt.com.

[†] En función del dispositivo de secuenciación utilizado.



Reactivos, consumibles y equipos

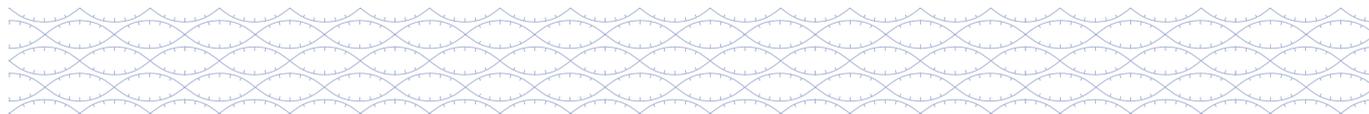
Consumibles suministrados por el usuario

Componente	Proveedor recomendado	N.º cat.*
Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific	Q32856
DNA 1,5 mL LoBind® Tubes	Eppendorf	22431021
Tiras de PCR con tapones	Starlab	A1402-3700
Puntas de pipeta estériles y resistentes a los aerosoles con filtros de 2, 10, 20, 200 y 1.000 µL	Proveedor general de productos de laboratorio	-
<i>Opcional: Tubos de 15 o 50 mL</i>	<i>Proveedor general de productos de laboratorio</i>	-
<i>Opcional: Depósitos de reactivos desechables</i>	<i>Proveedor general de productos de laboratorio</i>	-

Equipos suministrados por el usuario

Componente	Etapas en la que es necesario	Proveedor recomendado	N.º cat.*
Agilent® 4200 TapeStation®	Después de la PCR	Agilent Technologies	G2991BA
2 termocicladores (96 pocillos) con tapa calefactada	Antes y después de la PCR	Proveedores generales de productos de laboratorio	-
Vórtex de laboratorio (OGT recomienda la IKA™ MS 3 Digital Vortex Mixer)	Antes y después de la PCR	IKA	IKA 0003319000
Adaptador de placas para vórtex (OGT recomienda el IKA MS 3.4 Microtiter Attachment)	Después de la PCR	IKA	IKA 0003426400
Microcentrífuga para tubos estándar de 1,5 mL y tiras de 8 tubos de PCR	Antes y después de la PCR	Proveedor general de productos de laboratorio	-
Imán para placa de 96 micropocillos (OGT recomienda el DynaMag™-96 Side Magnet)	Antes y después de la PCR	Thermo Fisher Scientific	12331D
Imán para tubos de 1,5 mL (OGT recomienda el DynaMag-2 Magnet)	Después de la PCR	Thermo Fisher Scientific	12321D
Fluorómetro (Qubit 4)	Antes y después de la PCR	Thermo Fisher Scientific	Q33238
NanoDrop™ (espectrofotómetro UV-vis de un microvolumen)	Antes de la PCR	Thermo Fisher Scientific	ND-ONE-W
Pipeta de 8 canales de 20-200 y 1-10 µL	Antes y después de la PCR	Proveedor general de productos de laboratorio	-
Illumina MiniSeq, MiSeq, NextSeq o NovaSeq	Después de la PCR	Illumina	-

* Los números de catálogo corresponden al Reino Unido; podrían ser distintos en otros países. Para obtener más información, póngase en contacto con support@ogt.com.



Directrices generales

Recomendaciones previas



Para obtener unos resultados óptimos, OGT recomienda realizar todos los pasos en tiras de tubos de PCR con tapones.

Se recomienda encarecidamente probar las condiciones de hibridación (termociclador y material plástico) para garantizar una evaporación mínima durante la incubación nocturna:

- Para realizar la prueba, añada 17 μL de Nuclease-free Water (sin ADN) en cada pocillo que pueda usar y utilice los ajustes del termociclador indicados en la Tabla 9.
- Tras la incubación nocturna, compruebe que la evaporación no es superior a 1-2 μL por tubo.
- En caso necesario, cambie el ajuste de las tapas del termociclador y/o utilice espaciadores adecuados según el modelo de termociclador.

Utilice una solución nueva de etanol al 80 % en todo el flujo de trabajo; para prepararla, use etanol y agua de calidad para biología molecular.

Cuando proceda, deje que las microesferas Mag-Bind[®] TotalPure NGS y las microesferas magnéticas Dynabeads[™] M-270 Streptavidin se equilibren a temperatura ambiente; para ello, sáquelas del lugar de conservación al menos 30 min antes de usarlas.

Conservación y manipulación

El kit debe utilizarse antes de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.

Ciertos productos (Universal Library Preparation Kit, Universal Index Adapters, SureSeq Panel, Constitutional NGS Panel y Universal Hybridisation & Wash Kit V2) deben conservarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ciertos kits (SureSeq Reference DNA, Pre-PCR Universal Bead Kit y Post-PCR Universal Bead Kit) deben conservarse a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Directrices generales

Seguridad

La manipulación de los cebadores de los paneles de OGT debe realizarla personal de laboratorio cualificado de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, utilizando equipos de protección adecuados, como batas de laboratorio, gafas de seguridad y guantes.

El Universal Hybridisation & Wash Kit V2 contiene productos químicos potencialmente peligrosos si se manipulan de forma incorrecta. Deben extremarse las precauciones al manipular formamida y Hybridisation Buffer.

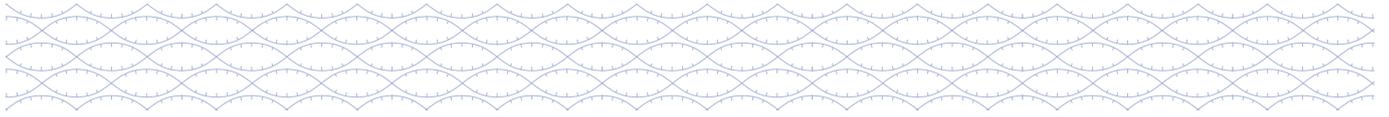
Asegúrese de que todos los operadores estén familiarizados con las fichas de datos de seguridad (FDS) y las evaluaciones de riesgos pertinentes antes de proceder a ejecutar el protocolo.

Clave de símbolos

Símbolo	Definición
	Información importante: Es especialmente importante leer, comprender y seguir con precisión estas notas.
	Consejo para ahorrar tiempo: Sugerencia opcional para mejorar la eficiencia del protocolo.
	Paso en frío: Mantenga todos los componentes en hielo para realizar estos pasos.
	Paso con imán: Mantenga todos los tubos sobre un imán durante estos pasos.
	Información específica de secuenciación: Es especialmente importante leer, comprender y seguir con precisión estas notas para cargar de forma óptima el ciclo de secuenciación.
	Punto seguro de parada: Las muestras pueden almacenarse con seguridad en esta etapa sin que ello afecte a los resultados.

Uso previsto

Estos productos están destinados a ensayos de uso exclusivo en investigación. La Universal NGS Workflow Solution está diseñada para su uso por parte de personal debidamente cualificado, empleando ADN extraído de diversos tejidos, como sangre y médula ósea.



Software Interpret NGS Analysis

Los archivos FASTQ de datos sin procesar generados por los secuenciadores Illumina pueden analizarse mediante el software Interpret NGS Analysis y convertirse en informes interactivos de análisis de NGS. El software es un potente paquete independiente de análisis de datos de OGT que se suministra con el kit.

Resumen del flujo de trabajo

Para acceder a información para realizar pedidos de productos de OGT, visite www.ogt.com.

La siguiente sección contiene instrucciones para la obtención de librerías de muestras específicas para la plataforma de secuenciación Illumina. Para cada muestra, se realiza una preparación individual de una librería. Cada muestra se marca con una secuencia índice (código de barras), así como con un identificador molecular único (UMI) para corregir errores y aumentar la precisión durante la secuenciación. Las muestras se amplifican y se agrupan en conjuntos de ocho unidades. Cada grupo se hibrida con cebadores diseñados específicamente, que se capturan y, a continuación, se amplifican para su secuenciación.

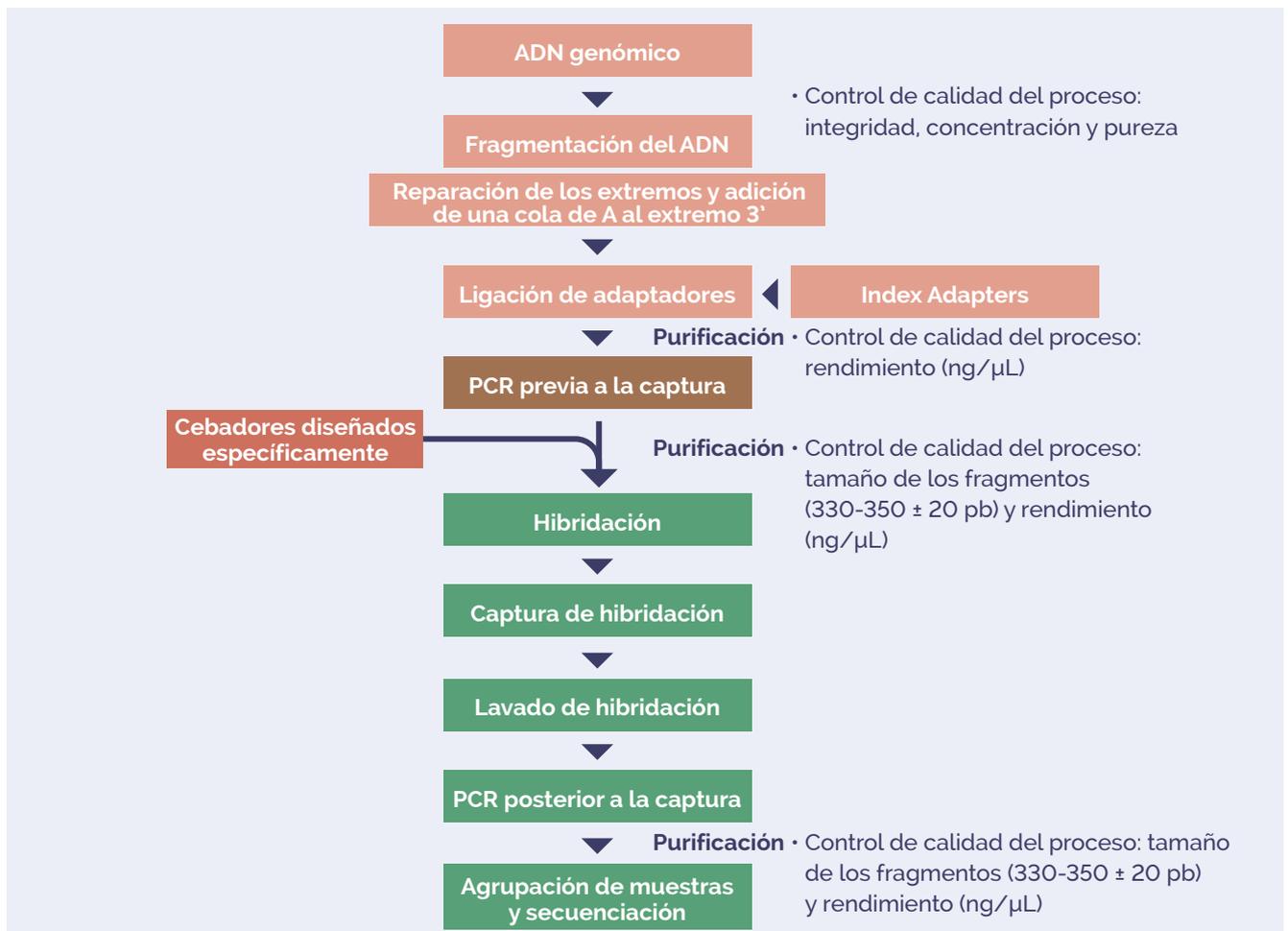
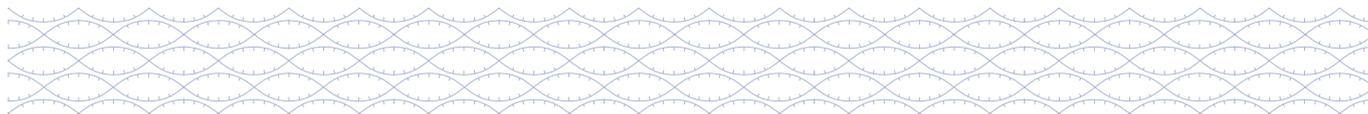


Figura 1: Flujo de trabajo de preparación de la librería de una muestra, indicando el tamaño esperado de los fragmentos de ADN en cada paso del procedimiento.



Requisitos de las muestras

Requisitos de las muestras

ADN: el protocolo se ha optimizado para usar una cantidad inicial de 200–500 ng de ADN.

Para el SureSeq CLL + CNV V3 Panel: incluya 500 ng de SureSeq Reference Female y 500 ng de SureSeq Reference Male del SureSeq Reference DNA Kit. Se requiere una muestra de referencia por cada grupo de hibridación, con un total de dos en un experimento MiSeq de 16 muestras.



La modificación de la cantidad inicial recomendada de ADN afectará a los resultados de secuenciación posteriores.

ADN: preparación de las muestras

La determinación de la concentración de la muestra de ADN_g es obligatoria para todas las muestras antes de iniciar el protocolo.

La evaluación de la integridad y la pureza del ADN es opcional, pero recomendable.

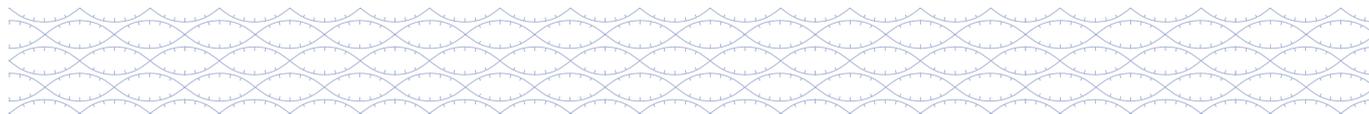
Recomendamos los siguientes ensayos para evaluar la integridad, concentración y pureza de las muestras:

- Concentración: Thermo Fisher Scientific Qubit
- Integridad del ADN: Agilent 4200 TapeStation
- Pureza: Thermo Scientific NanoDrop

Concentración de ADN: Qubit dsDNA HS Assay Kit

Consulte la guía del usuario del fabricante de Thermo Fisher Scientific Qubit. A continuación, se describen los pasos principales:

1. Prepare la solución de trabajo Qubit diluyendo el reactivo Qubit en una proporción 1:200 en tampón Qubit.
2. Tome una alícuota de 190 μ L de solución de trabajo Qubit para los dos patrones.
3. Añada 10 μ L de cada patrón Qubit al tubo correspondiente.
4. Tome una alícuota de 199 μ L de solución de trabajo Qubit para cada muestra evaluada.
5. Añada 1 μ L de muestra al tubo correspondiente.



Requisitos de las muestras



Las muestras con una concentración inicial de ADN >100 ng/ μ L deben prediluirse a 20-100 ng/ μ L con TE Buffer (incluido en el kit). Confirme la concentración de ADN mediante el Qubit dsDNA HS Assay Kit. La cuantificación precisa de la cantidad inicial de ADN es esencial para obtener resultados de fragmentación reproducibles.

6. Mezcle en un vórtex durante 2–3 s, con cuidado de no generar burbujas.
7. Incube los tubos a temperatura ambiente durante 2 min.
8. Mida y registre las concentraciones de ADN siguiendo las indicaciones de la pantalla.

Integridad del ADN: Genomic DNA ScreenTape

Opcional: Este paso es importante para evaluar el nivel, si lo hay, de degradación del ADN.

Consulte la guía del usuario del fabricante del sistema Agilent 4200 TapeStation. A continuación, se describen los pasos principales:

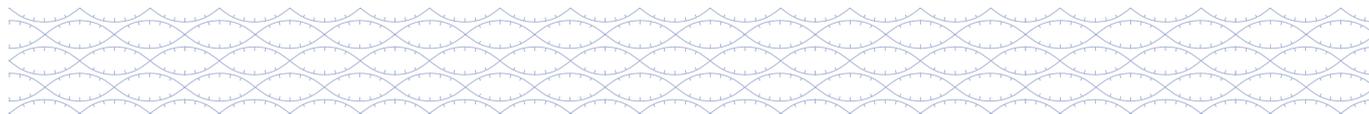
1. Prepare el marcador de peso molecular; para ello, mezcle 10 μ L de Genomic DNA Sample Buffer con 1 μ L de Genomic DNA Ladder en el primer tubo o pocillo de la tira de tubos o placa.

Nota: Se requiere un marcador de peso molecular para cada análisis. No existe ningún marcador electrónico de peso molecular para el ensayo de ADN genómico.

2. Para cada muestra evaluada, añada 1 μ L de muestra de ADN a 10 μ L de Sample Buffer.
3. Selle todos los tubos o pocillos.
4. Mezcle los tubos o la placa en un vórtex durante 1 min a 2.000 rpm y, a continuación, centrifúguelos brevemente para recoger el líquido en el fondo.
5. Centrifugue brevemente para recoger la muestra en el fondo de los tubos o pocillos.
6. Cargue la tira de tubos o la placa en el sistema Agilent 4200 TapeStation.

Nota: Si utiliza tiras de tubos, recuerde quitar los tapones.

7. Marque las muestras necesarias en el software de control y anote los nombres de las muestras en la hoja de muestras.
8. Introduzca un nombre de archivo en el campo «Prefix» (Prefijo) del software de control para guardar los resultados y seleccione «Start» (Iniciar).



Requisitos de las muestras

9. Compruebe que el electroferograma indique que el ADNg está intacto, presenta una distribución uniforme y tiene un tamaño de pico máximo >5.000 pb.
10. Tras la electroforesis del ADN mediante el sistema Agilent 4200 TapeStation, se genera un número de integridad del ADN (DIN). Un DIN >7 confirma la presencia de ADN intacto, mientras que un DIN <7 indica que el ADN está degradado. Si una muestra tiene un DIN <7, póngase en contacto con su especialista local en aplicaciones de campo (FAS).

Pureza: NanoDrop

Opcional: Este paso es importante para evaluar la pureza de la muestra de ADN.

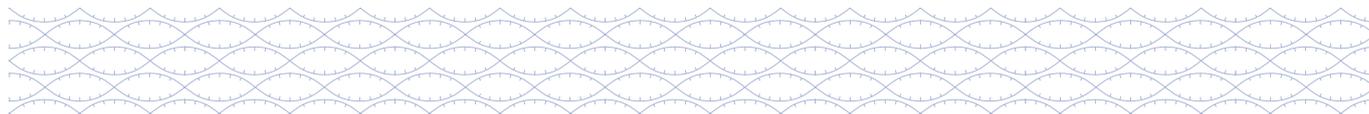
Consulte la guía del usuario del fabricante del sistema NanoDrop.

A continuación, se describen los pasos principales:

1. Utilice los ajustes «Nucleic Acid» (Ácido nucleico) y «DNA-50» (ADN-50).
2. Limpie el pedestal con Nuclease-free Water.
3. Cargue 1-2 µL de tampón de muestra o blanco.
4. Haga clic en «Measure blank» (Medir blanco).
5. Limpie el pedestal con una toallita que no deje pelusa.
6. Cargue 1-2 µL de cada muestra en el pedestal.
7. Haga clic en «Measure» (Medir).
8. Registre las lecturas correspondientes a las relaciones 260/230 y 260/280, así como la concentración (ng/µL).

Se recomiendan unos valores de densidad óptica (DO) de 1,8 a 2,0 para la relación 260/280 y de 2,0 a 2,2 para la relación 260/230. El uso de muestras de ADN con unos valores inferiores puede dar lugar a un rendimiento deficiente.

Póngase en contacto con su especialista local en aplicaciones de campo (FAS) de OGT si necesita asesoramiento sobre la calidad de sus muestras.



Preparación de librerías: Paso 1

Fragmentación del ADN, reparación de los extremos y adición de una cola de A al extremo 3'

ADN genómico



↓ Fragmentación, reparación de los extremos y adición de una cola de A



Resumen

El ADN genómico se fragmenta enzimáticamente. El ADNbc fragmentado se repara con las enzimas de la mezcla de fragmentación y reparación de extremos (ER) para crear extremos romos. Al mismo tiempo, se crea un voladizo de adenina en el extremo 3' como preparación para la ligación del adaptador.

Preparativos:

- Extraiga el TE Buffer (tapón azul; ●) del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C). Déjelo descongelar a temperatura ambiente y, a continuación, colóquelo en hielo.

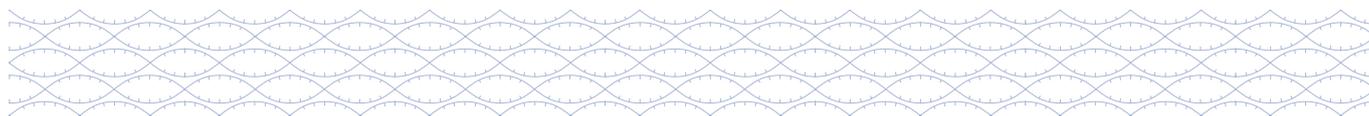


Utilice únicamente el TE Buffer (tapón azul; ●) incluido en el kit para la preparación de las muestras de ADN (Tris 10 mM y EDTA 1 mM). El uso de otras formulaciones de TE (por ejemplo, TE 0,1x) o agua puede afectar a los resultados de la fragmentación.

- Extraiga el Frag + ER Buffer del paso 1 (tapón naranja; ●) del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C). Déjelo descongelar a temperatura ambiente y colóquelo en hielo. Asegúrese de que todos los componentes del tampón estén disueltos.

Es frecuente que se forme un precipitado en el tampón. Si esto ocurre, pipetee el tampón varias veces para disgregar el precipitado y, a continuación, mézclelo brevemente en un vórtex hasta que se disuelva. Si el precipitado no desaparece, evite pipetearlo en la Master Mix.

- Extraiga la Frag + ER Enzyme del paso 1 (tapón naranja; ●) del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y colóquela en hielo.
- Asegúrese de que las muestras de ADN estén prediluidas a 20–100 ng/ μ L con TE Buffer (tapón azul; ●).



Preparación de librerías: Paso 1

Realización del paso 1: Fragmentación del ADN, reparación de los extremos y adición de una cola de A al extremo 3'

Tiempo estimado: 1,25 h para 8-24 muestras. Tiempo de intervención manual: 15 min.

1. Programe el termociclador conforme a los ajustes indicados en la Tabla 1. Guarde el programa como «OGT Fragmentation» (Fragmentación OGT).

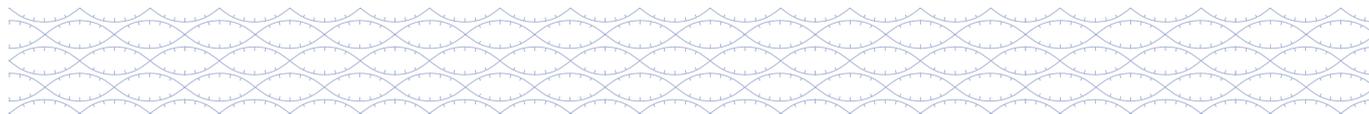
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	37	20 min
2	65	30 min
3	4	Mantenimiento

Tabla 1: Perfil de incubación del programa «OGT Fragmentation» (Fragmentación OGT).

2. **Precaliente** el termociclador a 37 °C. Cuando sea posible, ajuste la tapa calefactada a 75 °C; si no es posible, active el ajuste predeterminado de la tapa calefactada.
 3. Diluya **200-500 ng** de ADN de muestra en tiras de tubos de PCR con el TE Buffer refrigerado (tapón azul; ●) suministrado hasta alcanzar un volumen total de **26,5 µL**. Mezcle los tubos en un vórtex durante **3-5 s**, sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido y colóquelos en hielo.
- Para SureSeq CLL + CNV V3:** Prepare 1 muestra de 500 ng de Human Reference DNA Female y 1 muestra de 500 ng de Human Reference DNA Male en un volumen total de **26,5 µL** para cada serie de 16 muestras. Procese las dos muestras de referencia en paralelo con las 14 muestras del ensayo.
4. Etiquete un nuevo conjunto de tubos de PCR en tira para la muestra y colóquelos en hielo.
 5. Mezcle el Frag + ER Buffer y la Frag + ER Enzyme del paso 1 en un vórtex durante **5-8 s**. Someta ambos materiales a un pulso de centrifugación para recoger el contenido y colóquelos en hielo.



Es esencial mezclar bien la Frag + ER Enzyme para obtener un rendimiento óptimo.



Preparación de librerías: Paso 1

- ❄️ 6. Prepare la Fragmentation and ER Master Mix según la Tabla 2 en un tubo LoBind nuevo de 1,5 mL y colóquelo en hielo.

Reactivo	Librería 1x (µL)	Librería 8x (µL) (incluye exceso de 2)	Librería 16x (µL) (incluye exceso de 2)	Librería 24x (µL) (incluye exceso de 3)
Muestra de ADN	26,5	-	-	-
Frag + ER Buffer del paso 1 (tapón naranja; ●)	7	70	126	189
Frag + ER Enzyme del paso 1 (tapón naranja; ●)	1,5	15	27	40,5
TOTAL	35	85	153	229,5

Tabla 2: Fragmentation and ER Master Mix.

- ❄️ 7. Mezcle la Fragmentation and ER Master Mix en un vórtex durante **3-5 s**, sométala a un pulso de centrifugación para recoger el contenido y colóquela en hielo.
- ❄️ 8. Añada **8,5 µL** de Fragmentation and ER Master Mix en cada uno de los tubos vacíos preparados del paso 4 y manténgalos en hielo.
- ❄️ 9. Utilice una pipeta multicanal para añadir **26,5 µL** de muestra de ADN del paso 3 a los tubos del paso 4.



Respete los tiempos para evitar la sobrefragmentación, ya que la enzima es activa a temperatura ambiente. Mantenga las muestras en hielo cuando no las esté mezclando en un vórtex o centrifugando.

10. Mézclelos **inmediatamente** en un vórtex durante **3 s**.
11. Sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido y transfíeralos **inmediatamente** al termociclador **precalentado**. Inicie el programa «OGT Fragmentation» (Fragmentación OGT).

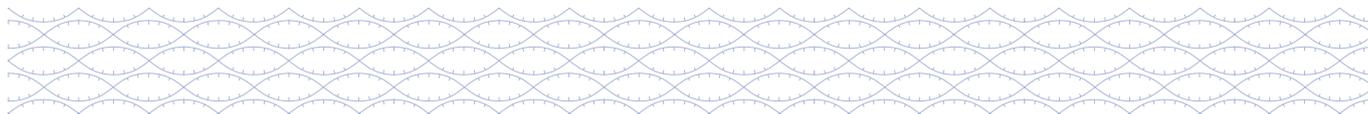


Recomendación: Prepare la Ligation Master Mix en los 10 minutos finales del programa del termociclador.

12. Cuando el programa haya finalizado y el termociclador haya alcanzado los 4 °C, extraiga las muestras y colóquelas en hielo hasta que esté listo para proceder a la ligación de adaptadores.



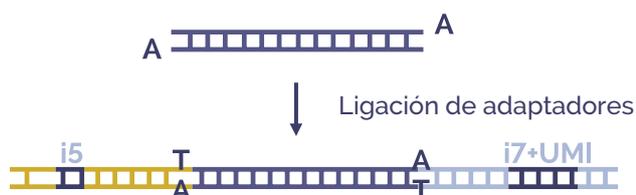
Recomendamos realizar inmediatamente las operaciones descritas en la sección «Paso 2: Ligación de adaptadores y purificación». Si es necesario, las muestras pueden almacenarse a -20 °C; sin embargo, podría producirse una pérdida de rendimiento (alrededor del 20 %).



Preparación de librerías: Paso 2

Ligación de adaptadores y purificación

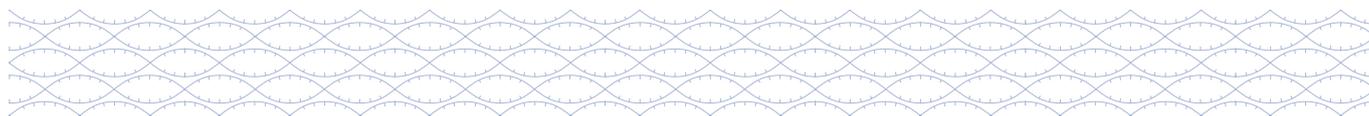
Resumen



Utilizando el voladizo del extremo 3' creado durante la reparación de extremos/adición de una cola de A y DNA Ligase, las secuencias de los adaptadores compatibles con los sistemas Illumina se fijan a fragmentos de ADNbc. Los adaptadores contienen secuencias con identificadores moleculares únicos (UMI) e índices de muestras únicos.

Preparativos:

- Extraiga de la nevera las microesferas Mag-Bind TotalPure NGS del Pre-PCR Universal Bead Kit al menos **30 minutos antes de usarlas** para que alcancen la temperatura ambiente.
- Prepare una solución nueva de etanol al 80 % utilizando etanol y agua de calidad para biología molecular.
- Extraiga el Ligation Buffer del paso 2 (tapón amarillo; ●) del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y déjelo descongelar a temperatura ambiente. Asegúrese de que todos los componentes del Ligase Buffer estén disueltos. Si es necesario, incúbelo a 37 °C hasta que se disuelvan.
- ❄ • Extraiga la Ligase del paso 2 (tapón amarillo; ●) del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y colóquela en hielo.
- ❄ • Extraiga la Universal Index Adapter Plate del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y déjela descongelar en hielo **5-10 min antes de usarla**. Someta la Adapter Plate a un pulso de centrifugación para recoger el contenido. Mantenga la placa en hielo en todo momento. No la caliente por encima de la temperatura ambiente.
- Los Index Adapters son de un solo uso. Si solo utiliza una parte de la placa, cubra los pocillos de adaptadores usados para evitar derrames del exceso de Index Adapter. Los adaptadores no utilizados también pueden distribuirse en alícuotas en tiras de tubos y descongelarse justo antes de su uso.



Preparación de librerías: Paso 2

- Asigne un Index Adapter diferente a cada muestra. Consulte la Figura 2 y la Figura 3 para conocer las posiciones de los Index Adapters en la placa.
- OGT recomienda procesar lotes de ocho muestras; de esta forma, cada grupo ocupará una columna completa de la placa de índice.

Realización del paso 2: Ligación

Tiempo estimado: 35 min para 8–24 muestras. Tiempo de intervención manual: 15 min.

1. Programe el termociclador conforme a los ajustes indicados en la Tabla 3. Guarde el programa como «OGT Ligation» (Ligación OGT).

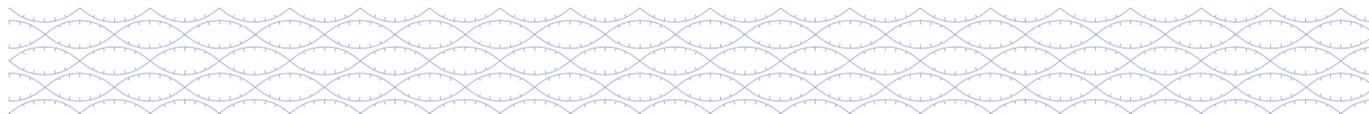


No utilice la tapa calefactada. Si no se puede apagar la tapa calefactada, manténgala abierta.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	20	20 min
2	4	Mantenimiento

Tabla 3: Perfil de incubación del programa «OGT Ligación» (Fijación OGT).

2. Mezcle el Ligase Buffer del paso 2 en un vórtex durante **3–5 s**, sométalo a un pulso de centrifugación para recoger el contenido y colóquelo en hielo.
3. Mezcle la Ligase del paso 2 dando golpecitos, sométala a un pulso de centrifugación para recoger el contenido y colóquela en hielo.



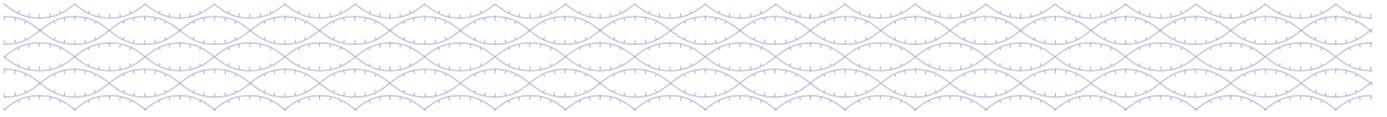
Preparación de librerías: Paso 2

- ❄ 4. Prepare la Ligation Master Mix según la Tabla 4 en un tubo LoBind nuevo de 1,5 mL y colóquelo en hielo.

Reactivo	Librería 1x (µL)	Librería 8x (µL) (incluye exceso de 2)	Librería 16x (µL) (incluye exceso de 2)	Librería 24x (µL) (incluye exceso de 3)
Muestra de ADN	35	-	-	-
Index Adapter	2,5	-	-	-
Ligase Buffer del paso 2 (tapón amarillo; ●)	9	90	162	243
Ligase del paso 2 (tapón amarillo; ●)	2	20	36	54
TOTAL	48,5	110	198	297

Tabla 4: Ligation Master Mix.

- ❄ 5. Mezcle la Ligation Master Mix en un vórtex durante **3-5 s**, sométala a un pulso de centrifugación para recoger el contenido y colóquela en hielo.
- ❄ 6. Añada **11 µL** de Ligation Master Mix en cada tubo de muestra de ADN refrigerado que contenga los productos fragmentados.
7. Añada **2,5 µL** de Index Adapter en cada tubo de muestra de ADN del paso 6.
8. Mezcle los tubos en un vórtex durante **3-5 s** y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
9. Transfiéralos **inmediatamente** al termociclador e inicie el programa «OGT Ligation» (Ligación OGT).
10. Cuando el programa haya finalizado y el termociclador haya alcanzado los 4 °C, extraiga las muestras y **lleve a cabo inmediatamente** las operaciones descritas en la sección «Ejecución de la purificación de la librería fijada».



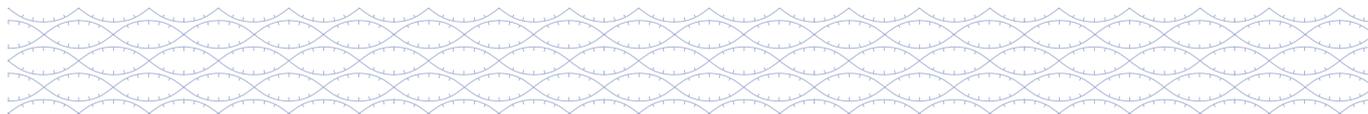
Preparación de librerías: Paso 2

	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

Figura 2: Disposición de la Universal Index Adapter Plate (1-24). X: pocillo vacío.

	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

Figura 3: Disposición de la Universal Index Adapter Plate (1-96).



Preparación de librerías: Paso 2

Realización de la purificación de la librería fijada

Tiempo estimado de intervención manual: 50 min para 8–24 muestras.



Antes de usar las microesferas, mézclelas en un vórtex al menos 1 min o hasta que la solución de microesferas tenga un aspecto homogéneo y un color uniforme.

Preparativos:

1. Prepare un conjunto **nuevo** de tubos de PCR en tira para cada grupo de muestras.
2. Añada **29 µL** de microesferas Mag-Bind TotalPure NGS homogéneas a temperatura ambiente del Pre-PCR Universal Bead Kit en cada tubo **vacío** y guarde aparte los tubos hasta el paso 6.

Pasos para los tubos de muestras de ADN:

3. Añada **11 µL** de microesferas Mag-Bind TotalPure NGS homogéneas a temperatura ambiente del Pre-PCR Universal Bead Kit en cada tubo de muestra de ADN. Mezcle los tubos en un vórtex para resuspender las microesferas y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
4. Incube los tubos a temperatura ambiente durante **5 min**.



5. Coloque los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. **3–5 min**).

6. Transfiera **60 µL** de **sobrenadante limpio que contiene la muestra de ADN** a los tubos con microesferas preparados en el paso 2. Las microesferas usadas pueden desecharse.

7. Mezcle los tubos en un vórtex para resuspender las microesferas y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.

8. Incube los tubos a temperatura ambiente durante **5 min**.

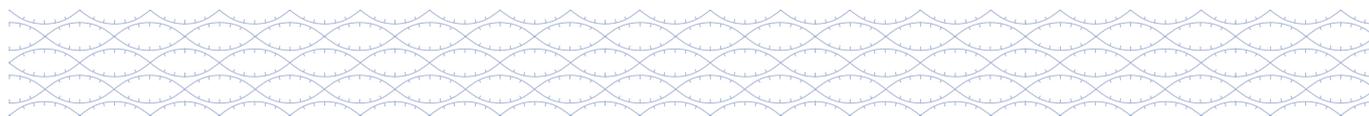


9. Coloque los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. **3–5 min**).

10. Evitando el precipitado de microesferas, retire y deseche el sobrenadante claro (**aprox. 88 µL**). **Conserve las microesferas que contienen la muestra de ADN.**

11. Añada **200 µL** de etanol al 80 % en cada tubo sin resuspender el precipitado de microesferas.

12. Incube los tubos durante **30 s** y, a continuación, extraiga el etanol.



Preparación de librerías: Paso 2

-  13. Repita el lavado (pasos 11 y 12) una vez; en total, debe realizar **dos** lavados.
14. Selle los tubos y sométalos a un **pulso** de centrifugación para recoger el etanol residual. Vuelva a colocar los tubos en el soporte magnético. Extraiga el etanol residual con una pipeta P20.
15. Seque los precipitados de microesferas a temperatura ambiente durante **1-2 min.**



No los seque en exceso, ya que eso reducirá el rendimiento. Los precipitados de microesferas estarán secos cuando el aspecto de la superficie cambie de brillante a mate. El secado excesivo producirá grietas en los precipitados de microesferas.

16. Retire los tubos del soporte magnético y añada **34 µL** de Nuclease-free Water directamente a cada precipitado de microesferas para eluir la muestra de ADN. Mezcle los tubos en un vórtex para resuspender las microesferas y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
17. Incube los tubos durante **5 min** a temperatura ambiente.



Recomendación: Si va a continuar inmediatamente con el paso 3 («PCR previa a la captura»), puede extraer la Primer Mix y el PCR Buffer del paso 3 del lugar de almacenamiento para descongelarlos a temperatura ambiente.

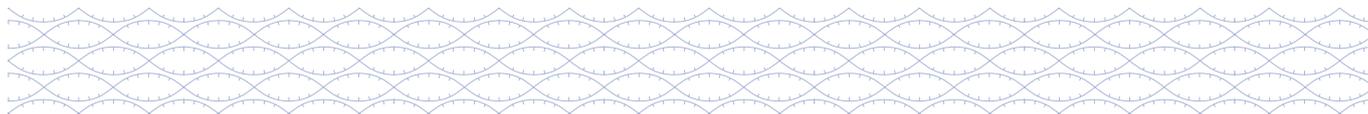
18. Etiquete un nuevo conjunto de tubos de PCR en tira para las muestras y guárdelos aparte hasta el paso 20.



19. Coloque los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. **2-3 min**).
20. Transfiera **32 µL** del eluido que contiene los productos fijados purificados a los tubos del paso 18. Llegado este momento, puede desechar los tubos que contengan microesferas.
21. Evalúe el rendimiento utilizando **1 µL** de producto fijado con el Qubit dsDNA HS Kit según las instrucciones del fabricante. El rendimiento esperado es $>2 \text{ ng}/\mu\text{L}$.



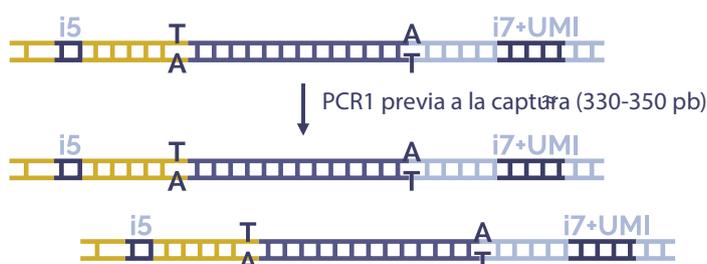
PUNTO DE PARADA OPCIONAL: Si no va a utilizar las muestras inmediatamente, almacénelas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Si las va a usar, pase a la sección «PCR previa a la captura».



Preparación de librerías: Paso 3

PCR previa a la captura

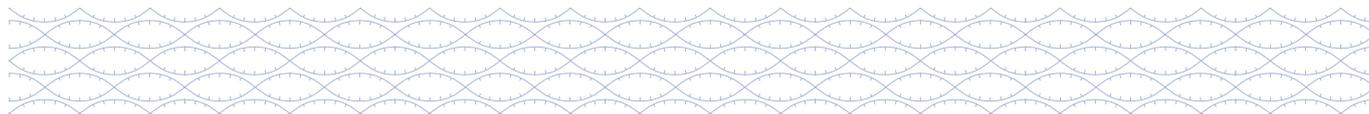
Resumen



La PCR de alta fidelidad se utiliza para amplificar la librería de ADN antes de la hibridación y la captura de fragmentos específicos. El número de ciclos de PCR se minimiza para reducir el número de lecturas duplicadas (copias del mismo fragmento de ADN original obtenidas por PCR) en los datos de secuenciación.

Preparativos:

- Extraiga la Primer Mix (tapón rojo; ●) y el PCR Buffer (tapón rojo; ●) del paso 3 del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y déjelos descongelar a temperatura ambiente.
- Asegúrese de que todos los componentes del PCR Buffer estén bien disueltos. Si es necesario, mézclelo en un vórtex y/o incúbelo a 37 °C hasta que se disuelvan.
- ❄ • Extraiga la PCR Polymerase (tapón rojo; ●) del paso 3 del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y colóquela en hielo.



Preparación de librerías: Paso 3

Realización del paso 3: PCR previa a la captura

Tiempo estimado: 45 min para 8–24 muestras. Tiempo de intervención manual: 15 min.

1. Programe el termociclador conforme a los ajustes indicados en la Tabla 5 y la Tabla 6. Guarde el programa como «OGT PCR1» (PCR1 OGT). Cuando sea posible, ajuste la tapa calefactada a 105 °C; si no es posible, active el ajuste predeterminado de la tapa calefactada.

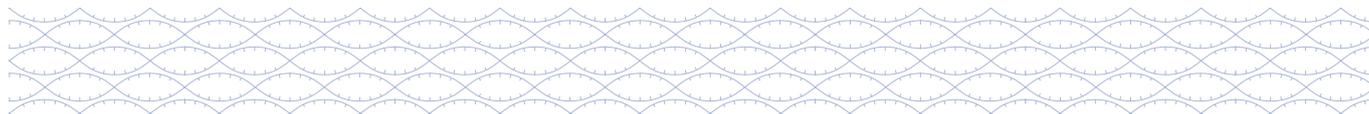
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	98	3 min
2	98	30 s
3	65	30 s
4	72	1 min
5	Repita del paso 2 al paso 4 hasta realizar el número de ciclos indicado en la Tabla 6	
6	72	10 min
7	4	Mantenimiento

Tabla 5: Perfil de incubación del programa «OGT PCR1» (PCR1 OGT).

Cantidad inicial de ADN	Número total de ciclos de PCR
200-350 ng	6
351-500 ng	5

Tabla 6: Número total de ciclos de PCR para el intervalo recomendado de cantidad inicial de ADN.

2. Mezcle la Primer Mix y el PCR Buffer del paso 3 en un vórtex durante **3–5 s** y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
- ❄ 3. Mezcle la PCR Polymerase del paso 3 dando golpecitos, sométala a un **pulso** de centrifugación para recoger el contenido y colóquela en hielo.



Preparación de librerías: Paso 3

4. Prepare la Pre-capture PCR Master Mix según la Tabla 7 en un tubo LoBind nuevo de 1,5 mL.

Reactivo	Librería 1x (µL)	Librería 8x (µL) (incluye exceso de 2)	Librería 16x (µL) (incluye exceso de 2)	Librería 24x (µL) (incluye exceso de 3)
Muestra de ADN fijada con adaptador	31	-	-	-
Nuclease-free Water (tapón transparente; ○)	9,5	95	171	256,5
PCR Buffer del paso 3 (tapón rojo; ●)	5	50	90	135
Primer Mix del paso 3 (tapón rojo; ●)	2,5	25	45	67,5
PCR Polymerase del paso 3 (tapón rojo; ●)	2	20	36	54
TOTAL	50	190	342	513

Tabla 7: Pre-capture PCR Master Mix.

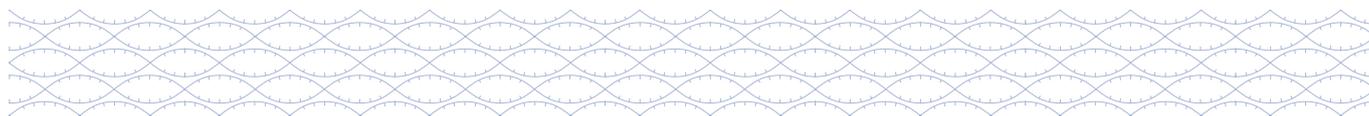
5. Mezcle la Pre-capture PCR Master Mix en un vórtex durante **3-5 s** y sométala a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
6. Añada **19 µL** de Pre-capture PCR Master Mix en cada tubo de muestra de ADN que contenga los productos fijados.
7. Mézclelos en un vórtex durante **3-5 s** y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
8. Transfiéralos al termociclador e inicie el programa «OGT PCR1» (PCR1 OGT).

Realización de la purificación por PCR previa a la captura

Tiempo estimado de intervención manual: 40 min para 8-24 muestras.



Antes de usar las microesferas, mézclelas en un vórtex durante al menos 1 min o hasta que la solución de microesferas tenga un aspecto homogéneo y un color uniforme.



Preparación de librerías: Paso 3

Pasos para los tubos de muestras de ADN:

1. Añada **45 µL** de microesferas Mag-Bind TotalPure NGS homogéneas a temperatura ambiente del Post-PCR Universal Bead Kit en cada tubo de muestra de ADN. Mezcle los tubos en un vórtex para resuspender las microesferas y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
 2. Incube los tubos a temperatura ambiente durante **5 min**.
 -  3. Coloque los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. **3-5 min**).
 4. Evitando el precipitado de microesferas, retire y deseche el sobrenadante claro (aprox. **90 µL**). **Conserve las microesferas que contienen la muestra de ADN.**
 5. Añada **200 µL** de etanol al 80 % en cada tubo sin resuspender el precipitado de microesferas.
 6. Incube los tubos durante **30 s** y, a continuación, extraiga el etanol.
 7. Repita el lavado (pasos 5 y 6) una vez; en total, debe realizar dos lavados.
 8. Selle los tubos y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el etanol residual. Vuelva a colocar los tubos en el soporte magnético. Extraiga el etanol residual con una pipeta P20.
 9. Seque los precipitados de microesferas a temperatura ambiente durante **1-2 min**.
-  No los seque en exceso, ya que eso reducirá el rendimiento. Los precipitados de microesferas estarán secos cuando el aspecto de la superficie cambie de brillante a mate. El secado excesivo producirá grietas en los precipitados de microesferas.
10. Retire los tubos del soporte magnético y añada **25 µL** de Nuclease-free Water directamente a cada precipitado de microesferas para eluir la muestra de ADN. Mezcle los tubos en un vórtex para resuspender las microesferas y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
 11. Incube los tubos durante **5 min** a temperatura ambiente.
 12. Etiquete un nuevo conjunto de tubos de PCR en tira para las muestras y guárdelos aparte hasta el paso 14.
 -  13. Coloque los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. **2-3 min**).
 14. Transfiera **24 µL** del eluido que contiene los productos amplificados purificados a los tubos del paso 12. Llegado este momento, puede desechar los tubos que contengan microesferas.

Preparación de librerías: Paso 3

15. Evalúe el tamaño del producto amplificado utilizando el Agilent D1000 ScreenTape System. El electroferograma debe mostrar un tamaño de pico de $330\text{--}350 \pm 20$ pb (Figura 4). Configure el instrumento y prepare el ensayo, las muestras y el marcador de peso molecular siguiendo las instrucciones del fabricante.

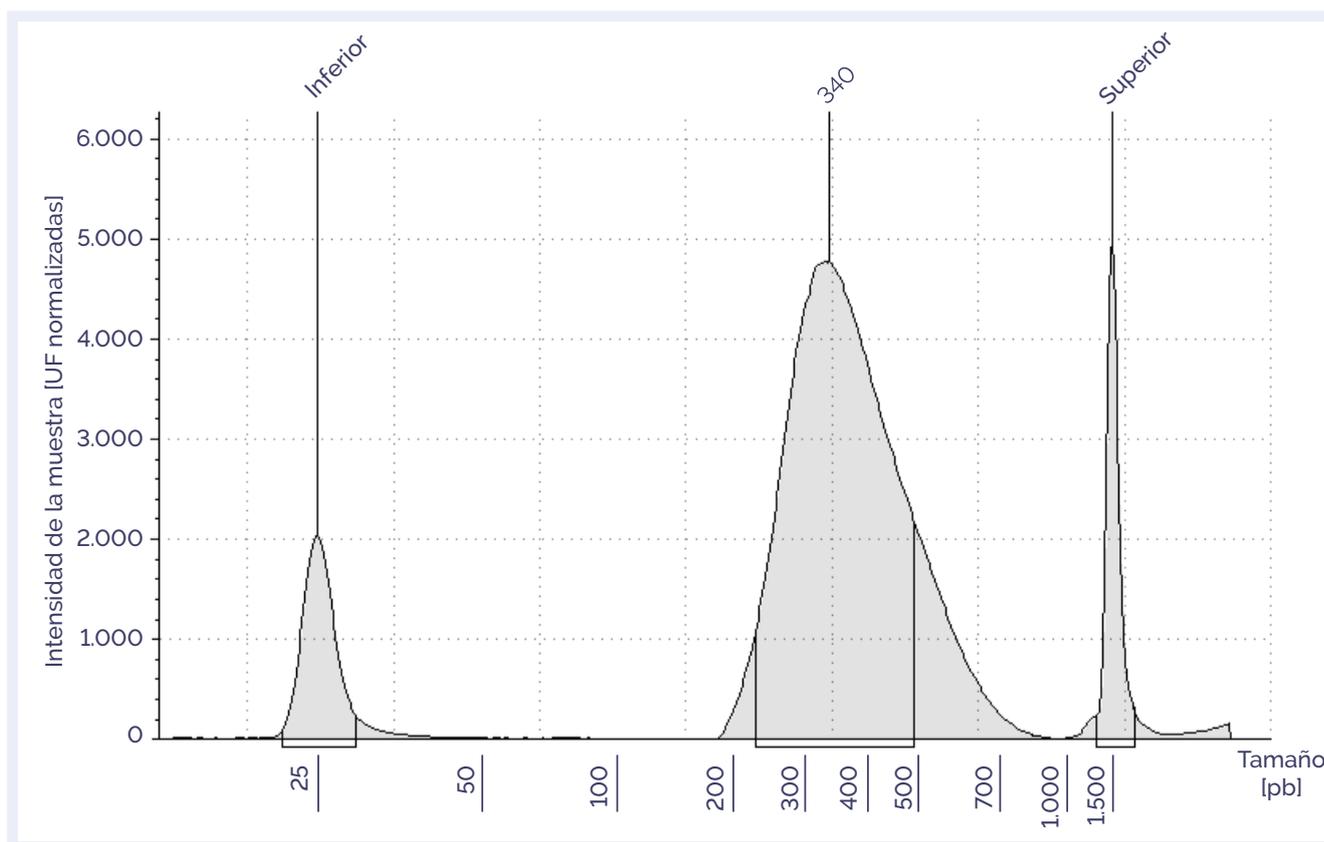


Figura 4: Electroferograma del producto purificado de la PCR previa a la captura, obtenido mediante un ensayo Agilent D1000 ScreenTape. El electroferograma presenta un pico máximo en el intervalo de tamaño de aproximadamente $330\text{--}350 \pm 20$ pb.



Los fragmentos cuyo tamaño esté fuera de este intervalo pueden reducir la calidad de los datos de la secuencia. Póngase en contacto con su especialista local en aplicaciones de campo (FAS) si necesita más asesoramiento.

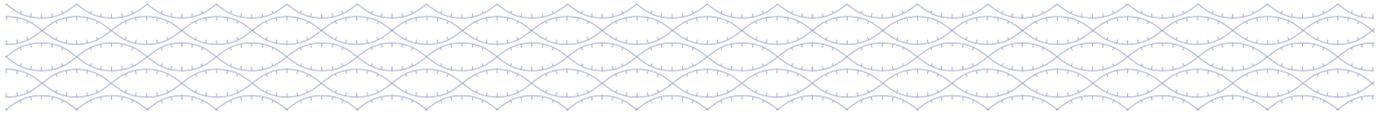
16. Evalúe el rendimiento utilizando **1 μL** de producto amplificado con el Qubit dsDNA HS Kit según las instrucciones del fabricante. El rendimiento esperado es >18 ng/ μL (aprox. 400 ng por librería).



Se recomienda utilizar una pipeta de un solo canal y asegurarse de que no haya exceso de líquido en el lateral de la punta para evitar lecturas inexactas que puedan afectar a la agrupación.



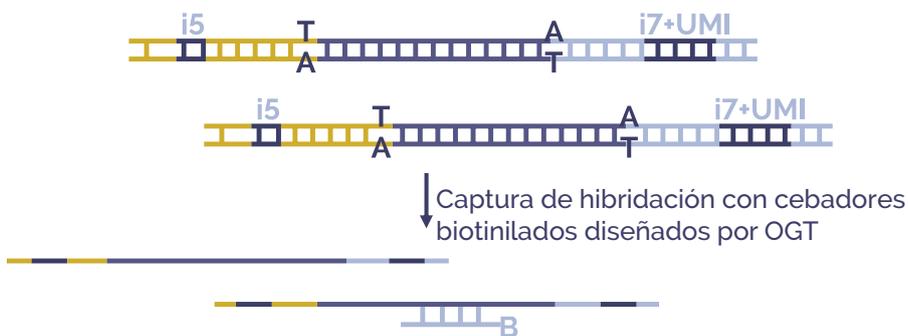
PUNTO DE PARADA OPCIONAL: Si no va a utilizar las muestras inmediatamente, consérvelas a 4°C durante la noche o a -20°C si necesita almacenarlas a largo plazo. Si va a continuar con el proceso, pase a la sección «Hibridación universal».



Preparación de librerías: Hibridación universal

Hibridación universal

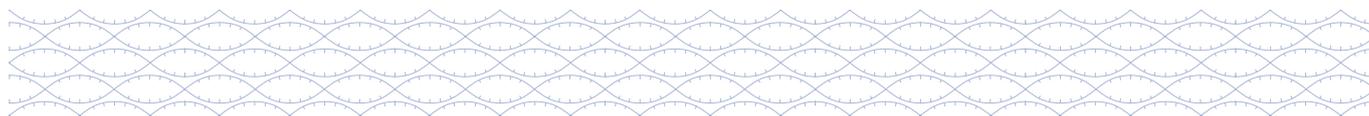
Resumen



La librería amplificada se desnaturaliza y se somete a un proceso de captura mediante cebadores SureSeq o CytoSure NGS (biotinilados).

Preparativos:

- Extraiga de la nevera las microesferas Mag-Bind TotalPure NGS del Post-PCR Universal Bead Kit al menos **30 minutos antes de usarlas** para que alcancen la temperatura ambiente.
- Prepare una solución nueva de etanol al 80 % utilizando etanol y agua de calidad para biología molecular.
- Extraiga el Hybridisation Buffer (tapón rojo; ●), la formamida (tapón amarillo; ●), el Cot Human DNA (tapón verde; ●), los Index Blockers (tapón azul; ●) y el Nuclease-free Water (tapón transparente; ○) del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y déjelos descongelar a temperatura ambiente.
- Extraiga los cebadores SureSeq o CytoSure del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y déjelos descongelar a temperatura ambiente.
- Asegúrese de que todos los componentes del Hybridisation Buffer estén bien disueltos. Si es necesario, incúbelo a 37 °C hasta que se disuelvan.



Preparación de librerías: Hibridación universal

Preparación de la Hybridisation Master Mix

Tiempo estimado: 5 min para 8–24 muestras. Tiempo de intervención manual: 5 min.

1. Mezcle el Hybridisation Buffer, la formamida, el Cot Human DNA, los cebadores específicos del panel y los Index Blockers en un vórtex durante **3–5 s** y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
2. Prepare la Hybridisation Master Mix según la Tabla 8 en un tubo LoBind nuevo de 1,5 mL.

Reactivo	Grupo 1x (µL)	Grupo 2x (µL) (incluye exceso de 0,5)	Grupo 3x (µL) (incluye exceso de 0,5)
Nuclease-free Water (tapón transparente; ○)	2,5	6,25	8,75
Hybridisation Buffer (tapón rojo; ●)	7,5	18,75	26,25
Formamida (tapón amarillo; ●)	3,5	8,75	12,25
TOTAL	13,5	33,75	47,25

Tabla 8: Hybridisation Master Mix.

3. Mézclela en un vórtex y sométala a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
4. **Lleve a cabo inmediatamente** los pasos descritos en la sección «Agrupación de muestras e hibridación con cebadores de captura».

Agrupación de muestras e hibridación con cebadores de captura

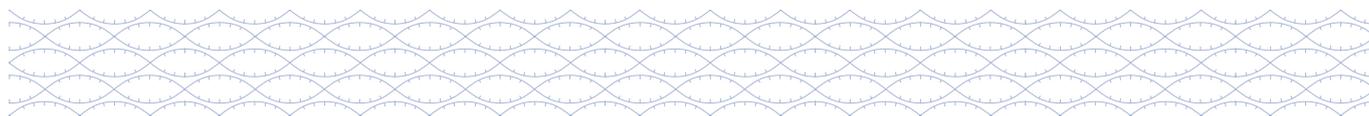
Tiempo estimado: 40 min para 8–24 muestras.

La reacción de hibridación requiere que todas las muestras tengan una cantidad inicial idéntica de ADN para combinarlas en un grupo de 8 muestras. Para cada grupo, debe realizar una captura de hibridación. La hibridación se realiza de forma óptima con la máxima cantidad inicial posible por muestra (hasta 500 ng). Para librerías con rendimientos inferiores a 500 ng, ajuste la cantidad inicial de todas las muestras según el rendimiento mínimo del grupo de hibridación.

1. Calcule los volúmenes de producto de la PCR previa a la captura que sean necesarios para combinar ocho librerías y formar un grupo de hibridación.



No utilice cantidades iniciales inferiores a 300 ng por muestra; póngase en contacto con el [Departamento de Asistencia Técnica de OGT](#) si desea obtener ayuda adicional.



Preparación de librerías: Hibridación universal

2. Deposite alícuotas con una cantidad idéntica del producto amplificado purificado del paso 3 (**300–500 ng**) de cada una de las ocho librerías de un grupo en un tubo LoBind de 1,5 mL.

Para el SureSeq CLL + CNV V3 Panel: Incluya 1 librería SureSeq Reference por grupo, junto con otras 7 librerías. En total, deben incluirse 2 muestras de referencia (1 de SureSeq Reference Female y 1 de SureSeq Reference Male) en cada ciclo de secuenciación de 16 muestras.

3. Añada **10 µL** de Cot Human DNA (tapón verde; ●) a cada grupo.
4. Mezcle todo en un vórtex y realice un pulso de centrifugación para recoger el contenido.



Antes de usar las microesferas, mézclelas en un vórtex durante al menos 1 min o hasta que la solución de microesferas tenga un aspecto homogéneo y un color uniforme.

5. Añada **2** volúmenes de microesferas Mag-Bind TotalPure NGS del Post-PCR Universal Bead Kit a cada grupo.
Ejemplo: Para un grupo de hibridación de 60 µL (+ 10 µL de Cot Human DNA), añada 140 µL de microesferas.
6. Mezcle todo en un vórtex y realice un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
7. Realice una incubación a temperatura ambiente durante **5 min**.



8. Coloque los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. **3–5 min**).
9. Evitando el precipitado de microesferas, retire y deseche el sobrenadante claro. **Conserve las microesferas que contienen la muestra de ADN.**
10. Añada **500 µL** de etanol al 80 % en cada tubo sin resuspender el precipitado de microesferas.
11. Incube los tubos durante **30 s** y, a continuación, extraiga el etanol.
12. Seque el precipitado durante **aprox. 5 min** o hasta que el etanol residual se haya evaporado por completo.

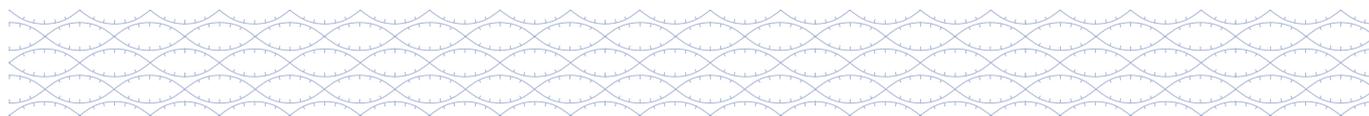


No lo seque en exceso, ya que eso reducirá el rendimiento. El precipitado de microesferas estará seco cuando el aspecto de la superficie cambie de brillante a mate. El secado excesivo producirá grietas en el precipitado de microesferas.

13. Retire los tubos del soporte magnético y añada **13,5 µL** de Hybridisation Master Mix directamente a cada precipitado de microesferas para eluir las librerías de ADN agrupadas. Mezcle los tubos en un vórtex para resuspender las microesferas y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.



Asegúrese de resuspender bien las microesferas. En el caso de los volúmenes grandes de microesferas, podría tener que mezclarlos en un vórtex durante más tiempo para garantizar una resuspensión completa.



Preparación de librerías: Hibridación universal

14. Incube los tubos durante **5 min** a temperatura ambiente.
15. Etiquete un nuevo conjunto de tubos de PCR en tira para los grupos y guárdelos aparte hasta el paso 17.



Recomendación: Programe el termociclador conforme a los ajustes indicados en la Tabla 9. Guarde el programa como «OGT Hybridisation» (Hibridación OGT).



16. Coloque los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. **2-3 min**).
17. Transfiera **13 µL** del eluido a los tubos vacíos del paso 15. Llegado este momento, puede desechar los tubos que contengan microesferas.
18. Añada **2 µL** de Index Blockers (tapón azul; ●) a los grupos.
19. Añada **2 µL** de cebadores específicos del panel a los grupos.
20. Selle los tubos, mézclelos en un vórtex y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido. El volumen final debe ser de **17 µL**.
21. Asegúrese de que todos los tapones estén bien cerrados.
22. Coloque los tubos en el termociclador y ejecute el programa «OGT Hybridisation» (Hibridación OGT), que se muestra en la Tabla 9. Cuando sea posible, ajuste la tapa calefactada a 105 °C; si no es posible, active el ajuste predeterminado de la tapa calefactada.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	5 min
2	65	Mantenimiento

Tabla 9: Perfil de incubación del programa «OGT Hybridisation» (Hibridación OGT).

23. Incube la mezcla de hibridación durante la noche (**16-20 h**) a 65 °C.

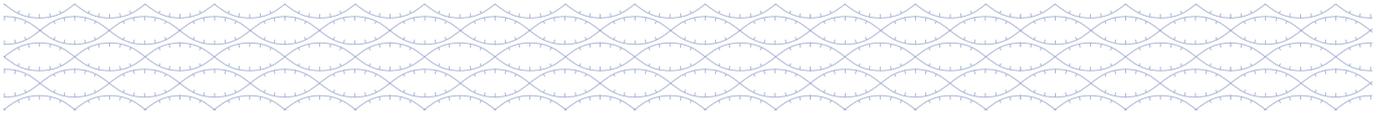


No sobrepase las 24 horas, ya que eso aumentará el riesgo de evaporación.

24. Pase a la sección «Captura universal y lavado».



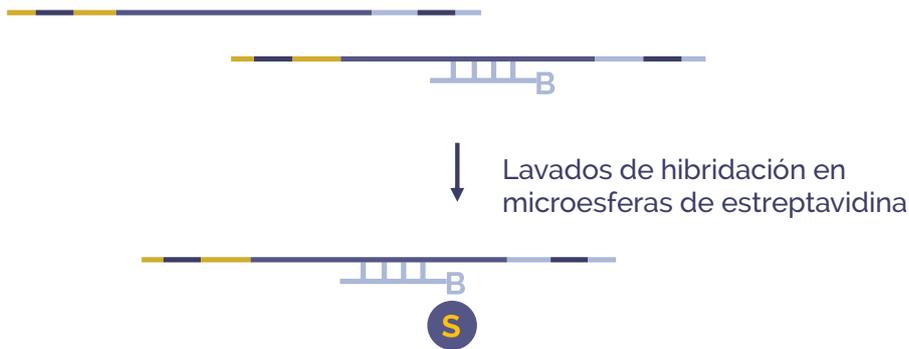
Extraiga el Hyb Wash Buffer (punto azul; ●) y el Bead Priming Buffer (tapón/punto naranja; ●) del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y déjelos descongelar a temperatura ambiente. Puede dejarlos en la mesa de trabajo durante la noche para que se descongelen.



Preparación de librerías: Captura universal y lavado

Captura universal y lavado

Resumen



Los fragmentos específicos hibridados se unen a microesferas de estreptavidina y se lavan para eliminar el ADN inespecífico.

Tiempo estimado: 1,25 h para 8–24 muestras. Tiempo de intervención manual: 45 min.

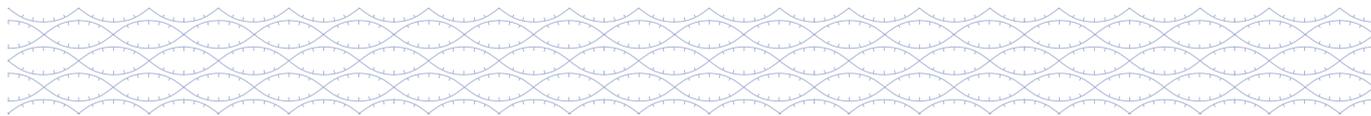
Preparativos:

- Precaliente un termociclador a 65 °C durante al menos **30 min antes de usarlo**.
- Precaliente un termociclador a 35 °C durante al menos **30 min antes de usarlo**.



Es importante mantener la temperatura correcta; se recomienda verificar la temperatura con un termómetro calibrado.

- Extraiga de la nevera las microesferas magnéticas Dynabeads M-270 Streptavidin del Post-PCR Universal Bead Kit al menos **30 minutos antes de usarlas** para que alcancen la temperatura ambiente.
- Extraiga el Hyb Wash Buffer (punto azul; ●) y el Bead Priming Buffer (tapón/punto naranja; ●) del lugar de almacenamiento (a entre –15 y –25 °C) y déjelos descongelar a temperatura ambiente. Puede dejarlos en la mesa de trabajo durante la noche para que se descongelen.



Preparación de librerías: Captura universal y lavado

Preparación del Hyb Wash Buffer para su uso exclusivo con el CytoSure Constitutional NGS Panel

- El CytoSure Constitutional NGS Panel requiere añadir Component A (tapón marrón; ●) a las botellas de Hyb Wash Buffer.



No es necesario usar Component A para los SureSeq Cancer Panels.

- Extraiga el Component A (tapón marrón; ●) del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y déjelo descongelar a temperatura ambiente.
- Consulte la Tabla 10 para conocer el volumen necesario en función del tamaño del kit.

Tamaño del kit	Volumen de Component A que hay que añadir a la botella de Hyb Wash Buffer (μ L)
24 reacciones	100
96 reacciones	180 (por cada botella de Hyb Wash Buffer)

Tabla 10: Volumen de Component A que hay que añadir a la botella de Hyb Wash Buffer.

- Etiquete la botella para indicar que se ha añadido Component A.
- Invierta la botella 10 veces después de añadir Component A.

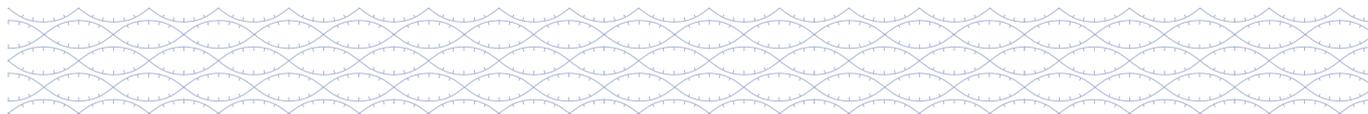
Preparación de los tampones de captura de secuencias y lavado de microesferas

- Asegúrese de que el Hyb Wash Buffer y el Bead Priming Buffer se hayan descongelado por completo.



Realice una incubación a 37 °C durante 5-10 min para resuspender cualquier precipitado. Puede descongelar estos tampones a temperatura ambiente durante la incubación nocturna.

- Tome **6 alícuotas de 200 μ L** de Hyb Wash Buffer por cada grupo de hibridación y deposítelas en tubos de PCR en tira tal como se muestra en la Figura 5 para un grupo de hibridación.



Preparación de librerías: Captura universal y lavado

3. Precaliente las alícuotas a las siguientes temperaturas en un bloque térmico durante al menos **30 minutos antes de usarlas**:
 - 3 x 200 μL a 65 °C por grupo
 - 3 x 200 μL a 35 °C por grupo

Grupo 1	Grupo 1
W1 ●	W1 ●
W2 ●	W2 ●
W3 ●	W3 ●
Lavados a 65 °C	Lavados a 35 °C

Figura 5: Preparación de alícuotas de Hyb Wash Buffer para un grupo de hibridación.

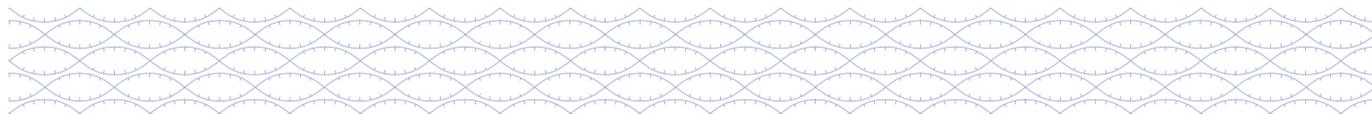
Preparación de las microesferas magnéticas

1. Mezcle el pocillo de microesferas magnéticas Dynabeads M-270 Streptavidin en un vórtex durante **1 min**, cambiando la orientación del tubo **cada 15 s**.



Asegúrese de que el pellet de microesferas esté completamente desprendido del fondo o de los lados del tubo, ya que la adición de un exceso de microesferas repercutirá negativamente en los procesos posteriores. No someta las microesferas magnéticas a pulsos de centrifugación después de mezclarlas.

2. Inmediatamente antes de usar las microesferas magnéticas Dynabeads M-270 Streptavidin a temperatura ambiente, resuspéndalas utilizando una pipeta de **200 μL** ajustada a **100 μL** y efectuando un pipeteo de mezcla hacia arriba y hacia abajo al menos **10 veces**.



Preparación de librerías: Captura universal y lavado

- Añada **100 µL** de microesferas magnéticas Dynabeads M-270 Streptavidin a un nuevo tubo de PCR (uno por cada grupo de hibridación).



Opción alternativa: Puede lavar hasta 400 µL de microesferas (para cuatro grupos de hibridación) a la vez en un solo tubo LoBind de 1,5 mL.



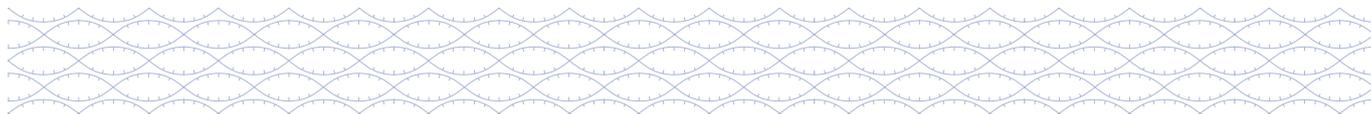
- Coloque los tubos en un soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. **10 s**).
- Evitando el precipitado de microesferas, retire y deseche el sobrenadante claro (**aprox. 100 µL**).
- Añada **200 µL** de Bead Priming Buffer 1x por cada **100 µL** de microesferas. Mezcle todo en un vórtex y realice un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
- Vuelva a colocar los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. **10 s**).
- Evitando el precipitado de microesferas, retire y deseche el sobrenadante claro (**aprox. 200 µL**).
- Repita los pasos 6-8 una vez; en total, debe realizar **dos** lavados.
- Retire los tubos del soporte magnético y añada el volumen original de Bead Priming Buffer (es decir, 100 µL de Bead Priming Buffer para 100 µL de microesferas), mezcle todo en un vórtex y realice un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
- Si lava más de **100 µL** de microesferas por tubo, etiquete un nuevo conjunto de tubos de PCR en tira y transfiera las microesferas a los nuevos tubos de PCR (100 µL/pocillo).



- Coloque los tubos en un soporte magnético, deje que las microesferas se separen del sobrenadante y, a continuación, extráigalas con cuidado y deseche el sobrenadante.



Lleve a cabo inmediatamente los pasos descritos en la sección «Realización de la captura de hibridación». No deje que las microesferas se sequen. Las pequeñas cantidades de Bead Priming Buffer residual no interferirán con la unión posterior del ADN a las microesferas magnéticas Dynabeads M-270 Streptavidin.



Preparación de librerías: Captura universal y lavado

Realización de la captura de hibridación

1. Tras la incubación nocturna, mantenga las muestras hibridadas en el termociclador y transfiera todas ellas (**aprox. 17 μ L** de volumen) a las microesferas de estreptavidina que ha preparado.
2. Mezcle bien todo en un vórtex durante **3-5 s** y asegúrese de que las microesferas se resuspendan. Realice un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
3. Vuelva a introducir los tubos en el termociclador en el que se esté ejecutando el programa «OGT Hybridisation» (Hibridación OGT) durante **45 min.**
4. **Cada 15 minutos**, ‘mezcle los tubos en un vórtex durante **3 s** y, a continuación, realice un breve pulso de centrifugación para recoger el contenido. Esto garantizará que las microesferas permanezcan en suspensión. Vuelva a introducir los tubos en un termociclador en el que se esté ejecutando el programa «OGT Hybridisation» (Hibridación OGT).
5. Tras 45 minutos de incubación, extraiga los tubos del termociclador y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido. **Lleve a cabo inmediatamente** el siguiente paso, descrito en la sección «Lavado de las microesferas de estreptavidina para eliminar el ADN no fijado».



Mantenga activo el programa «OGT Hybridisation» (Hibridación OGT) del termociclador.

Lavado de las microesferas de estreptavidina para eliminar el ADN no fijado



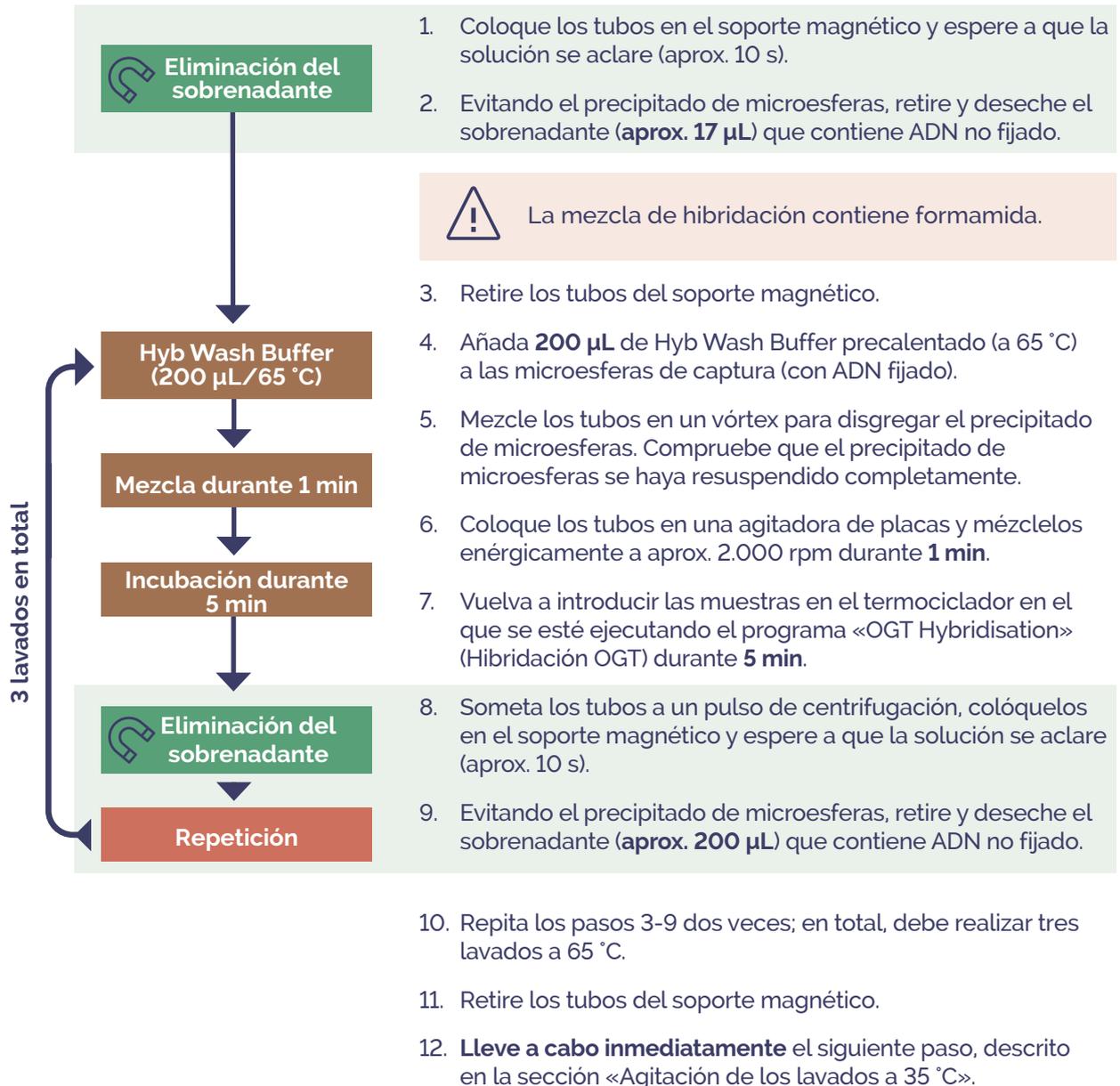
Trabaje con rapidez para asegurarse de que la temperatura no descienda sensiblemente por debajo de 65 °C. Para ello, recomendamos realizar todos los lavados en tubos de PCR en tira y utilizar una pipeta multicanal.



Tras añadir tampón nuevo, asegúrese de que el precipitado se haya resuspendido completamente mediante una breve mezcla en un vórtex seguida de una inspección visual. No utilice una pipeta para mezclar.

Preparación de librerías: Captura universal y lavado

Lavados en caliente a 65 °C



Preparación de librerías: Captura universal y lavado

Agitación de los lavados a 35 °C

Hyb Wash Buffer
(200 µL/35 °C)

Mezcla durante 2 min

 Eliminación del sobrenadante

Hyb Wash Buffer
(200 µL/35 °C)

Mezcla durante 1 min

 Eliminación del sobrenadante

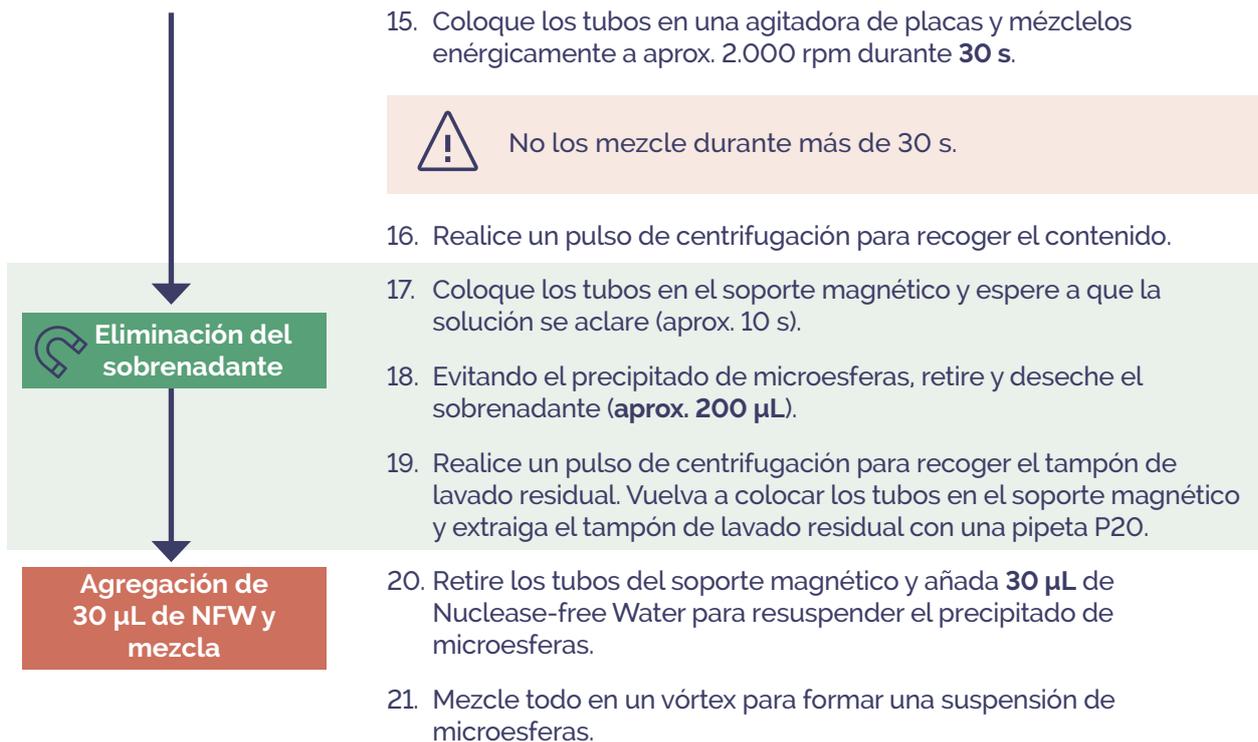
Hyb Wash Buffer
(200 µL/35 °C)

Mezcla durante 30 s

1. Añada **200 µL** de Hyb Wash Buffer precalentado (a 35 °C) a las microesferas de captura.
2. Mezcle todo en un vórtex para disgregar el precipitado de microesferas. Compruebe que el precipitado de microesferas se haya resuspendido completamente.
3. Coloque los tubos en una agitadora de placas y mézclelos enérgicamente a aprox. 2.000 rpm durante **2 min**.
4. Realice un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
5. Coloque los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. 10 s).
6. Evitando el precipitado de microesferas, retire y deseche el sobrenadante que contiene ADN no fijado (**aprox. 200 µL**).
7. Añada **200 µL** de Hyb Wash Buffer precalentado (a 35 °C) a las microesferas de captura.
8. Mezcle todo en un vórtex para disgregar el precipitado de microesferas. Compruebe que el precipitado de microesferas se haya resuspendido completamente.
9. Coloque los tubos en una agitadora de placas y mézclelos enérgicamente a aprox. 2.000 rpm durante **1 min**.
10. Realice un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
11. Coloque los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. 10 s).
12. Evitando el precipitado de microesferas, retire y deseche el sobrenadante que contiene ADN no fijado (**aprox. 200 µL**).
13. Añada **200 µL** de Hyb Wash Buffer precalentado (a 35 °C) a las microesferas de captura.
14. Mezcle todo en un vórtex para disgregar el precipitado de microesferas. Compruebe que el precipitado de microesferas se haya resuspendido completamente.

Preparación de librerías: Captura universal y lavado

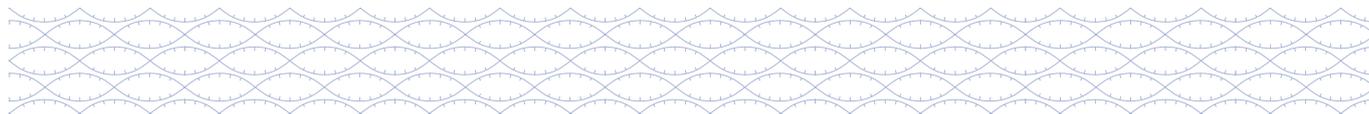
Agitación de los lavados a 35 °C (continuación)



Recomendación: Si va a continuar inmediatamente con el paso 4 («PCR posterior a la captura»), puede extraer la Primer Mix y el PCR Buffer del paso 4 del lugar de almacenamiento para descongelarlos a temperatura ambiente.



PUNTO DE PARADA OPCIONAL: Si no va a utilizar las muestras inmediatamente, conserve la suspensión de microesferas a 4 °C. No congele la suspensión de microesferas. Si va a continuar con el proceso, pase a la sección «PCR posterior a la captura».



Preparación de librerías: Paso 4

PCR posterior a la captura

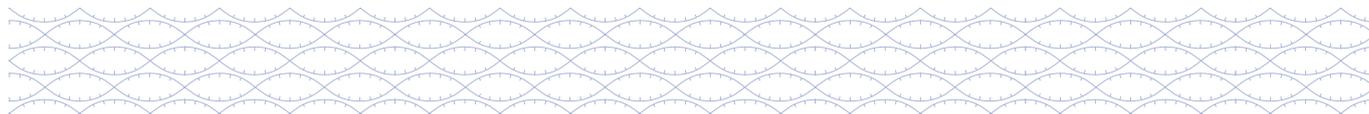
Resumen



Tras la captura de los fragmentos específicos, se amplificará el ADNmc fijado a las microesferas de estreptavidina.

Preparativos:

- Extraiga de la nevera las microesferas Mag-Bind TotalPure NGS del Post-PCR Universal Bead Kit al menos **30 minutos antes de usarlas** para que alcancen la temperatura ambiente.
- Prepare una solución nueva de etanol al 80 % utilizando etanol y agua de calidad para biología molecular.
- Extraiga la Primer Mix (tapón morado; ●) y el PCR Buffer (tapón morado; ●) del paso 4 del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y déjelos descongelar a temperatura ambiente.
- Asegúrese de que todos los componentes del PCR Buffer estén disueltos. Si es necesario, mézclelo en un vórtex y/o incúbelo a 37 °C hasta que se disuelvan.
- ❄ Extraiga la PCR Polymerase (tapón morado; ●) del paso 4 del lugar de almacenamiento (a entre -15 y -25 °C) y colóquela en hielo.



Preparación de librerías: Paso 4

Realización del paso 4: PCR posterior a la captura

Tiempo estimado: 1,25 h para 8–24 muestras. Tiempo de intervención manual: 15 min.

1. Programe el termociclador conforme a los ajustes indicados en la Tabla 11 y la Tabla 12. Guarde el programa como «OGT PCR2» (PCR2 OGT). Cuando sea posible, ajuste la tapa calefactada a 105 °C; si no es posible, active el ajuste predeterminado de la tapa calefactada.

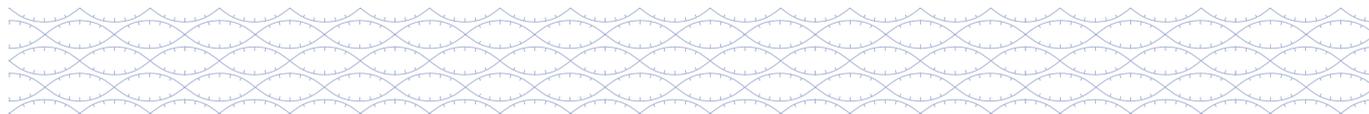
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	98	3 min
2	98	30 s
3	65	30 s
4	72	1 min
5	Repita del paso 2 al paso 4 hasta realizar el número total de ciclos especificado en la Tabla 12	
6	72	10 min
7	4	Mantenimiento

Tabla 11: Perfil de incubación del programa «OGT PCR2» (PCR2 OGT).

Número total de ciclos de 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

Tabla 12: Número total de ciclos de PCR para diversos paneles de NGS de OGT. Nota: Si utiliza un MyPanel personalizado, póngase en contacto con su especialista local en aplicaciones de campo (FAS) para conocer el número de ciclos de PCR.

2. Mezcle la Primer Mix y el PCR Buffer del paso 4 en un vórtex durante **3–5 s** y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
3.  Mezcle la PCR Polymerase del paso 4 dando golpecitos, sométala a un pulso de centrifugación para recoger el contenido y colóquela en hielo.



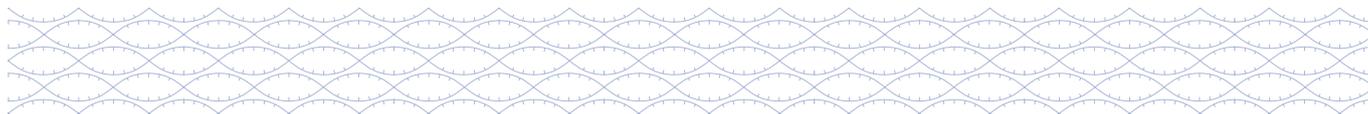
Preparación de librerías: Paso 4

- Para múltiples grupos, prepare la Post-capture PCR Master Mix según se indica en la Tabla 13 en un tubo LoBind nuevo de 1,5 mL.

Reactivo	Grupo 1x (µL)	Grupo 2x (µL) (incluye exceso de 0,5)	Grupo 3x (µL) (incluye exceso de 0,5)
ADNc capturado en suspensión de microesferas	14	-	-
Nuclease-free Water (tapón transparente; ○)	26,5	66,25	92,75
PCR Buffer del paso 4 (tapón morado; ●)	5	12,5	17,5
Primer Mix del paso 4 (tapón morado; ●)	2,5	6,25	8,75
PCR Polymerase del paso 4 (tapón morado; ●)	2	5	7
TOTAL	50	90	126

Tabla 13: Post-capture PCR Master Mix.

- Mezcle la Post-capture PCR Master Mix en un vórtex durante **3-5 s** y sométala a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
- Etiquete un nuevo conjunto de tubos de PCR en tira para cada reacción de PCR.
- Añada **36 µL** de Post-capture PCR Master Mix en los tubos del paso 5.
- Resuspenda las microesferas efectuando un pipeteo de mezcla hacia arriba y hacia abajo al menos 10 veces para garantizar la homogeneidad de las microesferas. Añada **inmediatamente 14 µL** de suspensión de microesferas bien mezclada en cada tubo.
- Efectúe un pipeteo de mezcla al menos 10 veces.
- Transfiera los tubos al termociclador e inicie el programa «OGT PCR2» (PCR2 OGT).



Preparación de librerías: Paso 4

Realización de la purificación por PCR posterior a la captura

Tiempo estimado: 40 min para 8–24 muestras.



Antes de usar las microesferas, mézclelas en un vórtex durante al menos 1 min o hasta que la solución de microesferas tenga un aspecto homogéneo y un color uniforme.

Pasos para los tubos de muestras de ADN:

1. Añada **45 µL** de microesferas Mag-Bind TotalPure NGS homogéneas a temperatura ambiente del Post-PCR Universal Bead Kit en cada tubo de muestra de ADN. Mezcle los tubos en un vórtex para resuspender las microesferas y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
2. Incube los tubos a temperatura ambiente durante **5 min**.
3. Coloque los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. **3–5 min**).
4. Evitando el precipitado de microesferas, retire y deseche el sobrenadante claro (aprox. **95 µL**). **Conserve las microesferas que contienen la muestra de ADN.**
5. Añada **200 µL** de etanol al 80 % en cada tubo sin resuspender el precipitado de microesferas.
6. Incube los tubos durante **30 s** y, a continuación, extraiga el etanol.
7. Repita el lavado (pasos 5 y 6) una vez; en total, debe realizar dos lavados.
8. Selle los tubos y sométalos a un pulso de centrifugación para recoger el etanol residual. Vuelva a colocar los tubos en el soporte magnético durante **30 s**. Extraiga el etanol residual con una pipeta P20.
9. Seque los precipitados de microesferas a temperatura ambiente durante **1–2 min**.



No los seque en exceso, ya que eso reducirá el rendimiento. Los precipitados de microesferas estarán secos cuando el aspecto de la superficie cambie de brillante a mate. El secado excesivo producirá grietas en los precipitados de microesferas.

10. Retire los tubos del soporte magnético y añada **32 µL** de Nuclease-free Water directamente a cada precipitado de microesferas para eluir la muestra de ADN. Mezcle todo en un vórtex y realice un pulso de centrifugación para recoger el contenido.
11. Incube los tubos durante **5 min** a temperatura ambiente.

Preparación de librerías: Paso 4

12. Etiquete un nuevo conjunto de tubos de PCR en tira para los eluidos y guárdelos aparte hasta el paso 14.



13. Coloque los tubos en el soporte magnético y espere a que la solución se aclare (aprox. **2-3 min**).

14. Transfiera **30 µL** del eluido que contiene los productos purificados obtenidos mediante la PCR posterior a la captura a los tubos del paso 12. Llegado este momento, puede desechar los tubos que contengan microesferas.

15. Evalúe el tamaño del producto amplificado utilizando el Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System. El electroferograma debe mostrar un tamaño de pico de $330-350 \pm 20$ pb (Figura 6). Configure el instrumento y prepare el ensayo, las muestras y el marcador de peso molecular siguiendo las instrucciones del fabricante.

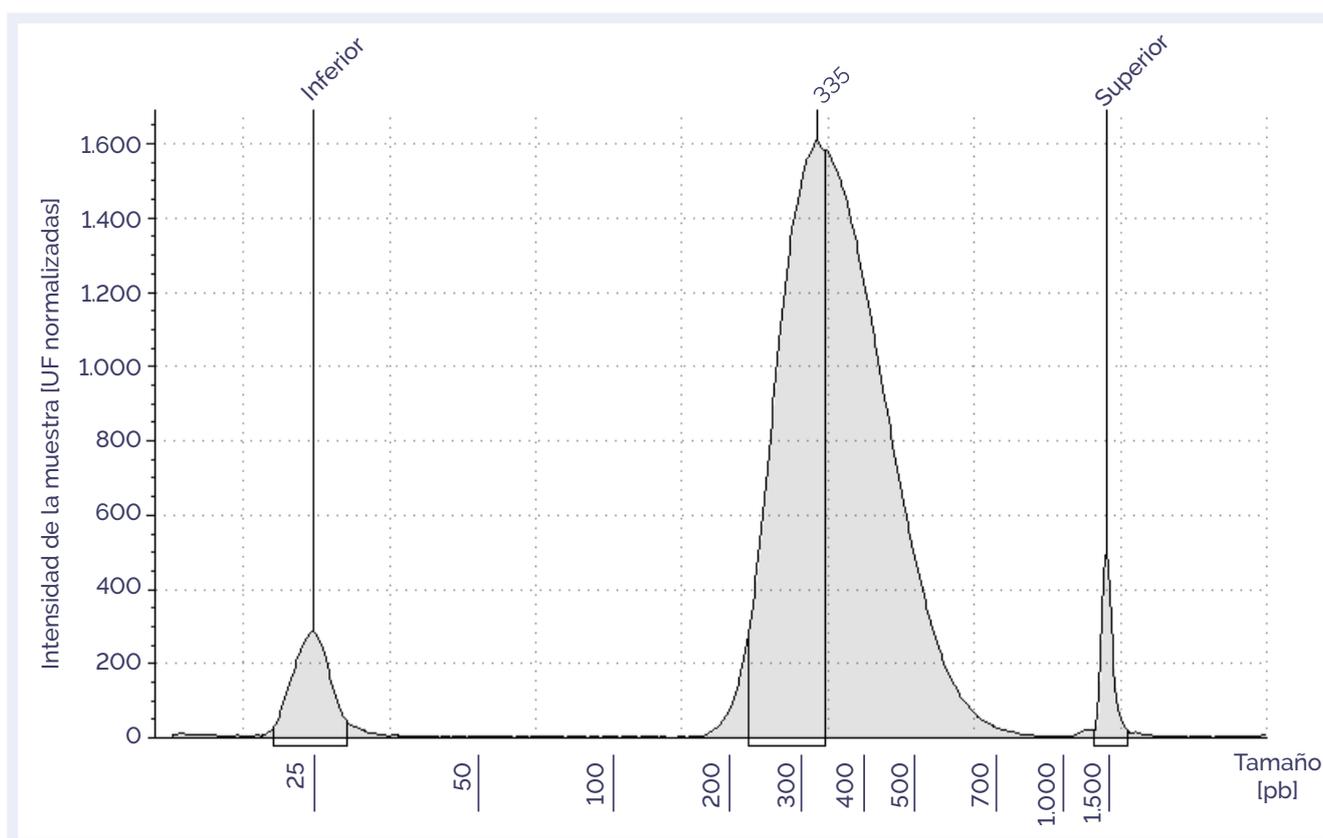
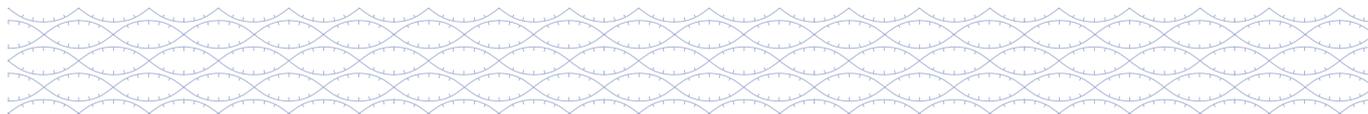


Figura 6: Electroferograma del producto purificado de la PCR posterior a la captura, obtenido mediante un ensayo Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape. El electroferograma presenta un pico máximo en el intervalo de tamaño de aproximadamente $330-350 \pm 20$ pb.



Los fragmentos cuyo tamaño esté fuera de este intervalo pueden reducir la calidad de los datos de la secuencia. Póngase en contacto con su especialista local en aplicaciones de campo (FAS) para obtener más información.



Preparación de librerías: Paso 4

16. Evalúe el rendimiento utilizando **1 µL** de producto amplificado con el Qubit dsDNA HS Kit según las instrucciones del fabricante. El rendimiento esperado depende del panel y oscila entre 1 y 10 ng/µL. Póngase en contacto con su especialista local en aplicaciones de campo (FAS) para obtener más información.



PUNTO DE PARADA OPCIONAL: Si no va a utilizar las muestras inmediatamente, consérvelas a 4 °C durante la noche o a -20 °C si necesita almacenarlas a largo plazo. Si va a continuar con el proceso, pase a la sección «Secuenciación».

Secuenciación

Secuenciación

Resumen

Los grupos de captura de ADN preparados en la sección anterior (PCR posterior a la captura) deben combinarse de forma que cada grupo esté presente en cantidades equimolares en la mezcla que se cargue en el secuenciador. Esto requiere tanto la determinación precisa tanto del tamaño del pico (pb), obtenida mediante el sistema Agilent TapeStation (High Sensitivity Kit), como de la concentración de la muestra (ng/µL), determinada utilizando el ensayo Thermo Fisher Scientific Qubit (High Sensitivity).

Preparación del grupo de secuenciación



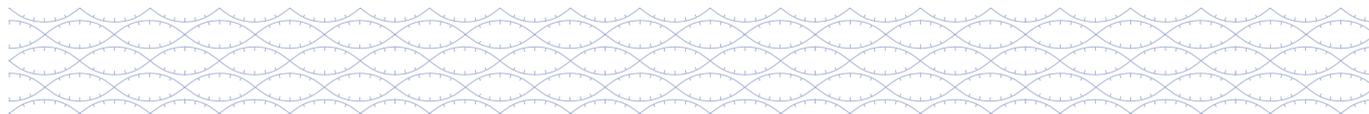
Puede crear una hoja de cálculo utilizando la plantilla «OGT_ULPK_Worksheet» proporcionada por OGT. También puede utilizar las fórmulas incluidas más adelante.

1. Utilice la hoja de cálculo descrita anteriormente o las fórmulas que se indican a continuación para determinar el volumen (µL) de cada grupo de captura de ADN que necesita para obtener el grupo de secuenciación 4 nM.



Este protocolo se ha validado con lecturas de extremos emparejados de 150 bases utilizando el MiSeq Reagent Kit v2 (300 ciclos) (ref. MS-102-2002 de Illumina) y el NextSeq 550 High-Output Kit (2 x 150 pb) (ref. 20024908 de Illumina).

2. Rellene las tablas «Sequencing Pool Parameters» (Parámetros del grupo de secuenciación) y «Samples» (Muestras) en la pestaña «PCR2» (PCR2) de la plantilla de agrupación. Las celdas en verde deben modificarse manualmente según sea necesario (deben especificarse los parámetros marcados con *).



Secuenciación

3. Añada el volumen apropiado de cada grupo de secuenciación indexado en un tubo LoBind nuevo de 1,5 mL etiquetado como «4 nM Sequencing Pool» (Grupo de secuenciación 4 nM); puede encontrar los volúmenes en la columna «Volume of PCR2 product to pipette» (Volumen de producto PCR2 que debe pipetear) de las pestañas «Volumes to pipette» (Volúmenes que debe pipetear).
4. Ajuste el volumen final del grupo de secuenciación con Nuclease-free Water hasta obtener la concentración final deseada (4 nM). Puede encontrar esta información en la columna B de las pestañas «Volumes to pipette» (Volúmenes que debe pipetear), junto a «Volume of Nuclease-free Water to pipette» (Volumen de Nuclease-free Water que debe pipetear).
5. Validación de la concentración del grupo de secuenciación: Evalúe la distribución del tamaño de pico del grupo de secuenciación utilizando el Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System; asimismo, evalúe el rendimiento utilizando el Qubit dsDNA HS Kit. Rellene la pestaña «Pool validation and dilution» (Validación y dilución del grupo) para determinar la concentración molar del grupo de secuenciación.
6. El grupo de secuenciación estará listo para cargarlo en el secuenciador.



PUNTO DE PARADA OPCIONAL: Si no va a utilizar el grupo de secuenciación inmediatamente, consérvelo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ si necesita almacenarlo a largo plazo. Si va a continuar con el proceso, pase a la sección «Preparación de la hoja de muestras».

Fórmula 1: Concentración (nM) de cada muestra

$$nM = \frac{[\text{Concentración de la muestra (ng/}\mu\text{L)}] \times 10^6}{([\text{Tamaño de la muestra en pb}] \times 660) + 157,9}$$

Fórmula 2: Volumen de cada muestra de ADN indexada

$$\text{Volumen de la muestra indexada} = \frac{\text{Grupo de secuenciación (}\mu\text{L)} \times \text{Concentración del grupo (4 nM)}}{\text{Número de muestras del grupo} \times \text{Concentración de la muestra (nM)}}$$

Secuenciación

Preparación de la hoja de muestras



Puede crear una hoja de muestras MiSeq Sample Sheet utilizando la guía de agrupación de MiSeq proporcionada por OGT.

1. Abra la hoja de cálculo cumplimentada y haga clic en la pestaña de la hoja de muestras correspondiente.

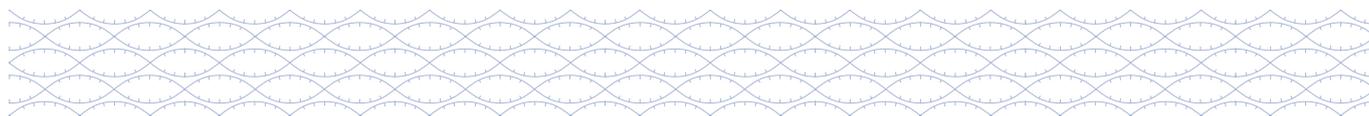


Esta hoja se rellenará automáticamente con los parámetros y los datos de las muestras introducidos en las hojas «PCR1» (PCR1) y «PCR2» (PCR2).

2. Marque todas las celdas con texto como se muestra en la Figura 7. Ajuste el número de filas marcadas según sea necesario.

[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	GAGAGGATNNNNNNNN	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	GCGATGATNNNNNNNN	507	TCAGGCTT	Example Samplesheet	
32	Sample08	Sample08			8	ACGGACANNNNNNNN	508	GTTCTCGT	Example Samplesheet	
33	Sample09	Sample09			9	CGGCTAATNNNNNNNN	509	AGAAGGAG	Example Samplesheet	
34	Sample10	Sample10			10	ATCGATCGNNNNNNNN	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	CCGTAGAA	Example Samplesheet	
39	Sample15	Sample15			15	AGAGTAGCNNNNNNNN	515	TACGCCTT	Example Samplesheet	
40	Sample16	Sample16			16	ATCCAGAGNNNNNNNN	516	CGACGTTA	Example Samplesheet	

Figura 7: Ejemplo de hoja de muestras en la plantilla de agrupación de MiSeq.



Secuenciación

3. Copie las celdas marcadas y péguelas en un nuevo archivo de Excel.



Todo el texto en rojo corresponde a información específica del usuario y de las muestras. Todo el texto en negro es necesario para garantizar que el secuenciador reconozca el archivo.

4. Guarde la nueva hoja como archivo CSV (valores separados por comas).
5. Ahora, puede cargar la hoja de muestras en el secuenciador mediante la función «Manual sample sheet upload» (Carga manual de la hoja de muestras).



PUNTO DE PARADA OPCIONAL: Si no va a utilizar el grupo de secuenciación inmediatamente, consérvelo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ si necesita almacenarlo a largo plazo. Si va a continuar con el proceso, pase a la sección «Desnaturalización y carga del grupo de secuenciación» o consulte el protocolo correspondiente de Illumina.

Desnaturalización y carga del grupo de secuenciación

1. Siga el protocolo apropiado de Illumina para desnaturalizar el grupo de secuenciación.



Si el secuenciador solo incluye un paso de dilución, siga el protocolo de Illumina para la carga. Si el secuenciador requiere un paso de dilución secundario (por ejemplo, la dilución del grupo desnaturalizado 20 pM al grupo de carga 12 pM en un MiSeq), continúe con el paso 2.



2. Después de la desnaturalización, aumente el volumen del grupo a 1 mL con HT1 frío para diluir el grupo desnaturalizado hasta una concentración aproximada de 20 pM y manténgalo en hielo.



Los volúmenes de HT1 necesarios variarán en función del volumen del grupo desnaturalizado, que viene determinado por el tipo de secuenciador. La concentración real del grupo que presenta una concentración aproximada de 20 pM se puede encontrar en la pestaña «Pool validation and dilution» (Validación y dilución del grupo) de la hoja de cálculo y dependerá de la concentración del grupo de secuenciación.

3. Introduzca la concentración de carga requerida del secuenciador en la pestaña «Pool validation and dilution» (Validación y dilución del grupo) de la hoja de cálculo.

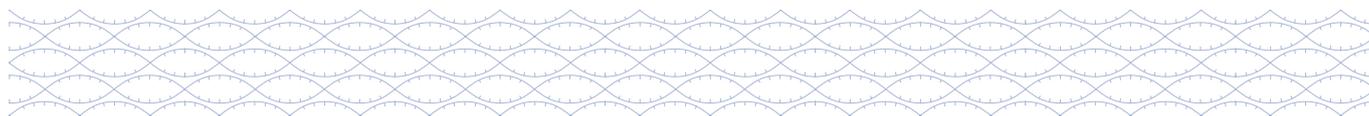


La densidad de agrupamiento puede variar en función del instrumento. Recomendamos cargar una concentración final de 8-12 pM si se utiliza un MiSeq Kit V2 (300 ciclos) y de 1,4 pM si se utiliza un NextSeq 500/550 High-Output Kit.

4. Diluya la concentración del grupo desnaturalizado desde 20 pM hasta esta concentración de carga; para ello, pipetee los volúmenes indicados en la pestaña «Pool validation and dilution» (Validación y dilución del grupo) de la hoja de cálculo.



Si se utiliza un kit NextSeq, el grupo de secuenciación debe combinarse con un 5 % de PhiX desnaturalizada antes del experimento, de acuerdo con el protocolo de Illumina.



Secuenciación

5. Pipetee el grupo de carga en el cartucho del secuenciador y configure el ciclo de secuenciación de acuerdo con el protocolo de Illumina.
6. Si utiliza BaseSpace, seleccione «+ Custom Library Prep Kit» (+ Kit personalizado de preparación de librerías) en el menú desplegable «Library Prep Kit» (Kit de preparación de librerías).
7. Utilice la información de la Tabla 14 y la Tabla 15 del Apéndice para crear el «Universal NGS Library Preparation Kit» (Kit universal de preparación de librerías de NGS).
8. Ahora, el «Universal NGS Library Preparation Kit» (Kit universal de preparación de librerías de NGS) estará disponible para usarlo en el ciclo de secuenciación.

Apéndice

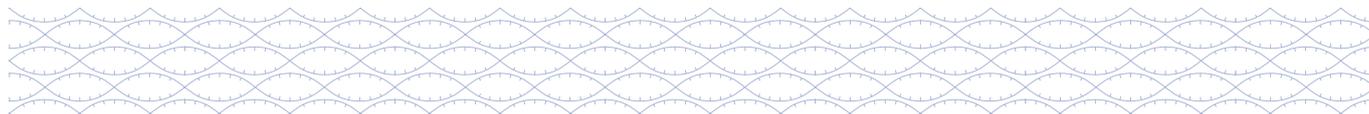
Secuencias de adaptadores

Adaptador	Secuencia
1	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA
2	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGTGT

Tabla 14: Secuencias de adaptadores: configuración de avance. Tenga en cuenta que algunos instrumentos de secuenciación Illumina requieren el complemento inverso de la secuencia de Index 2 (i5) Adapter.

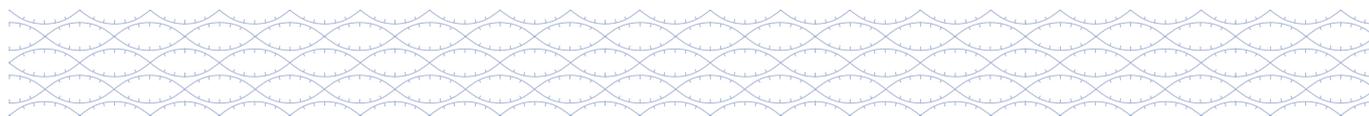
Secuencias índice

I7_Index_ID	Secuencia índice 1	I5_Index_ID	Secuencia índice 2
1	CTGATCGTNNNNNNNNNN	501	ATATGCGC
2	ACTCTCGANNNNNNNNNN	502	TGGTACAG
3	TGAGCTAGNNNNNNNNNN	503	AACCGTTC
4	GAGACGATNNNNNNNNNN	504	TAACCGGT
5	CTTGTCGANNNNNNNNNN	505	GAACATCG
6	TTCCAAGNNNNNNNNNNN	506	CCTTGTAG
7	CGCATGATNNNNNNNNNN	507	TCAGGCTT



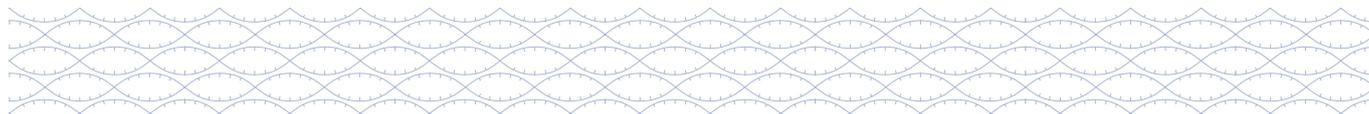
Apéndice

I7_Index_ID	Secuencia índice 1	I5_Index_ID	Secuencia índice 2
8	ACGGAACANNNNNNNNNN	508	GTTCTCGT
9	CGGCTAATNNNNNNNNNN	509	AGAACGAG
10	ATCGATCGNNNNNNNNNN	510	TGCTTCCA
11	GCAAGATCNNNNNNNNNN	511	CTTCGACT
12	GCTATCCTNNNNNNNNNN	512	CACCTGTT
13	TACGCTACNNNNNNNNNN	513	ATCACACG
14	TGGACTCTNNNNNNNNNN	514	CCGTAAGA
15	AGAGTAGCNNNNNNNNNN	515	TACGCCTT
16	ATCCAGAGNNNNNNNNNN	516	CGACGTTA
17	GACGATCTNNNNNNNNNN	517	ATGCACGA
18	AACTGAGCNNNNNNNNNN	518	CCTGATTG
19	CTTAGGACNNNNNNNNNN	519	GTAGGAGT
20	GTGCCATANNNNNNNNNN	520	ACTAGGAG
21	GAATCCGANNNNNNNNNN	521	CACTAGCT
22	TCGCTGTTNNNNNNNNNN	522	ACGACTTG
23	TTCGTTGGNNNNNNNNNN	523	CGTGTGTA
24	AAGCACTGNNNNNNNNNN	524	GTTGACCT
25	CCTTGATCNNNNNNNNNN	525	ACTCCATC
26	GTCGAAGANNNNNNNNNN	526	CAATGTGG
27	ACCACGATNNNNNNNNNN	527	TTGCAGAC
28	GATTACCGNNNNNNNNNN	528	CAGTCCAA
29	GCACAACNNNNNNNNNN	529	ACGTTCAG
30	GCGTCATTNNNNNNNNNN	530	AACGTCTG
31	ATCCGGTANNNNNNNNNN	531	TATCGGTC



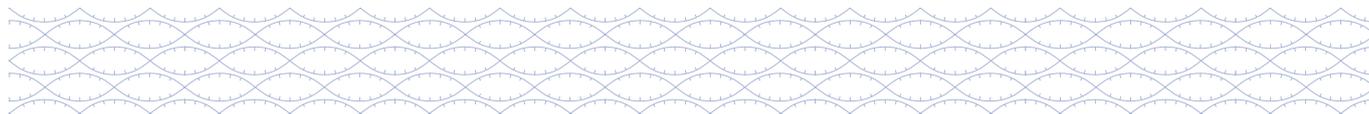
Apéndice

I7_Index_ID	Secuencia índice 1	I5_Index_ID	Secuencia índice 2
32	CGTTGCAANNNNNNNNN	532	CGCTCTAT
33	GTGAAGTGNNNNNNNNN	533	GATTGCTC
34	CATGGCTANNNNNNNNN	534	GATGTGTG
35	ATGCCTGTNNNNNNNNN	535	CGCAATCT
36	CAACACCTNNNNNNNNN	536	TGGTAGCT
37	TGTGACTGNNNNNNNNN	537	GATAGGCT
38	GTCATCGANNNNNNNNN	538	AGTGGATC
39	AGCACTTCNNNNNNNNN	539	TTGGACGT
40	GAAGGAAGNNNNNNNN	540	ATGACGTC
41	GTTGTTTCGNNNNNNNN	541	GAAGTTGG
42	CGGTTGTTNNNNNNNN	542	CATACCAC
43	ACTGAGGTNNNNNNNNN	543	CTGTTGAC
44	TGAAGACGNNNNNNNNN	544	TGGCATGT
45	GTTACGCANNNNNNNNN	545	ATCGCCAT
46	AGCGTGTTNNNNNNNNN	546	TTGCGAAG
47	GATCGAGTNNNNNNNNN	547	AGTTCGTC
48	ACAGCTCANNNNNNNNN	548	GAGCAGTA
49	GAGCAGTANNNNNNNNN	549	ACAGCTCA
50	AGTTCGTCNNNNNNNNN	550	GATCGAGT
51	TTGCGAAGNNNNNNNNN	551	AGCGTGTT
52	ATCGCCATNNNNNNNNN	552	GTTACGCA
53	TGGCATGTNNNNNNNNN	553	TGAAGACG
54	CTGTTGACNNNNNNNNN	554	ACTGAGGT
55	CATACCACNNNNNNNNN	555	CGGTTGTT



Apéndice

I7_Index_ID	Secuencia índice 1	I5_Index_ID	Secuencia índice 2
56	GAAGTTGGNNNNNNNNNN	556	GTTGTTCCG
57	ATGACGTCNNNNNNNNNN	557	GAAGGAAG
58	TTGGACGTNNNNNNNNNN	558	AGCACTTC
59	AGTGGATCNNNNNNNNNN	559	GTCATCGA
60	GATAGGCTNNNNNNNNNN	560	TGTGACTG
61	TGGTAGCTNNNNNNNNNN	561	CAACACCT
62	CGCAATCTNNNNNNNNNN	562	ATGCCTGT
63	GATGTGTGNNNNNNNNNN	563	CATGGCTA
64	GATTGCTCNNNNNNNNNN	564	GTGAAGTG
65	CGCTCTATNNNNNNNNNN	565	CGTTGCAA
66	TATCGGTCNNNNNNNNNN	566	ATCCGGTA
67	AACGTCTGNNNNNNNNNN	567	GCGTCATT
68	ACGTTCAGNNNNNNNNNN	568	GCACAAC
69	CAGTCCAANNNNNNNNNN	569	GATTACCG
70	TTGCAGACNNNNNNNNNN	570	ACCACGAT
71	CAATGTGGNNNNNNNNNN	571	GTCGAAGA
72	ACTCCATCNNNNNNNNNN	572	CCTTGATC
73	GTTGACCTNNNNNNNNNN	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



Apéndice

I7_Index_ID	Secuencia índice 1	I5_Index_ID	Secuencia índice 2
80	ATGCACGANNNNNNNNNN	580	GACGATCT
81	CGACGTTANNNNNNNNN	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

Tabla 15: Secuencias índice. La letra «N» se utiliza para representar el UMI. Tenga en cuenta que algunos instrumentos de secuenciación Illumina requieren el complemento inverso de la secuencia de Index 2 (i5) Adapter.

Apéndice

Pautas de secuenciación recomendadas

Panel	Plataforma de secuenciación recomendada	Número de muestras por ciclo de secuenciación	Propuesta de tamaño de grupo	Tamaño de kit recomendado para la compra	Número de ciclos en función del tamaño del kit comprado
770001: CoreMPN	MiSeq 300 V2	48	6 x 8 plex	2 x 24 reacciones	1 ciclo
				1 x 96 reacciones	2 ciclos
770002: Myeloid Plus	MiSeq 300 V2	16	2 x 8 plex	2 x 24 reacciones	3 ciclos
				1 x 96 reacciones	6 ciclos
770027: CLL + CNV v3	MiSeq 300 V2	16	2 x 8 plex	2 x 24 reacciones	3 ciclos
				1 x 96 reacciones	6 ciclos
770003: Pan-Myeloid	MiSeq 300 V2	8	1 x 8 plex	1 x 24 reacciones	3 ciclos
	MiSeq 600 V3	16	2 x 8 plex	2 x 24 reacciones	3 ciclos
				1 x 96 reacciones	6 ciclos
	NextSeq Mid-Output	48	6 x 8 plex	2 x 24 reacciones	1 ciclo
1 x 96 reacciones				2 ciclos	
502003: CytoSure Constitutional NGS	NextSeq High-Output	24	3 x 8 plex	1 x 24 reacciones	1 ciclo
770007: CytoSure Comprehensive Familial Hypercholesterolaemia (FH) NGS	MiSeq 300 V2	16	3 x 8 plex	2 x 24 reacciones y 1 x 96 reacciones	3 y 6 ciclos

Tabla 16: Pautas de secuenciación recomendadas.

Apéndice

Posiciones de los tubos de reactivos

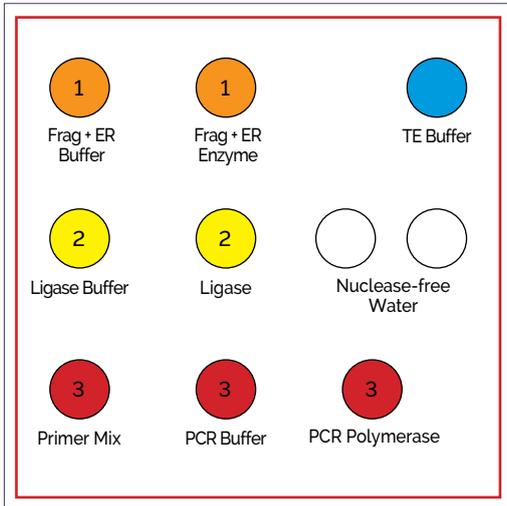


Figura 8: Posiciones de los tubos en el Library Preparation Kit de 24 reacciones (770100-24).

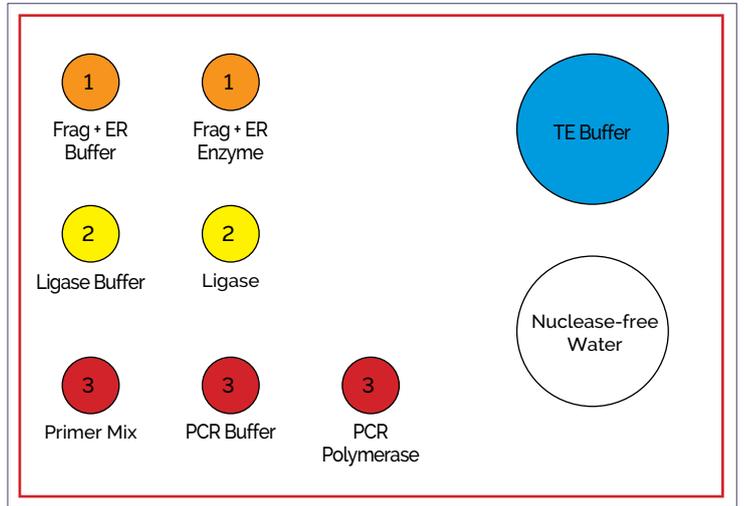


Figura 10: Posiciones de los tubos en el Library Preparation Kit de 96 reacciones (770100-96).

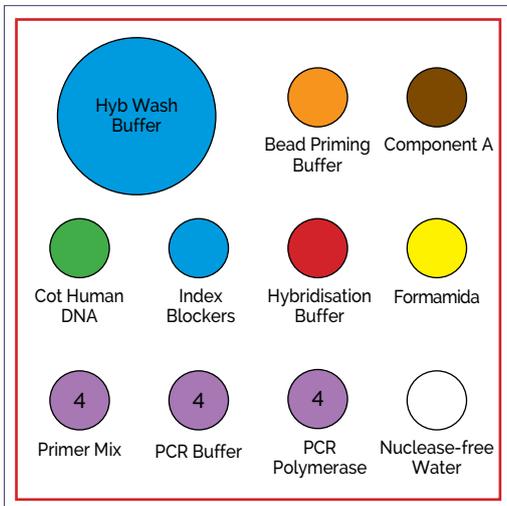


Figura 9: Posiciones de los tubos en el Hybridisation & Wash Kit V2 de 24 reacciones (770410-24).

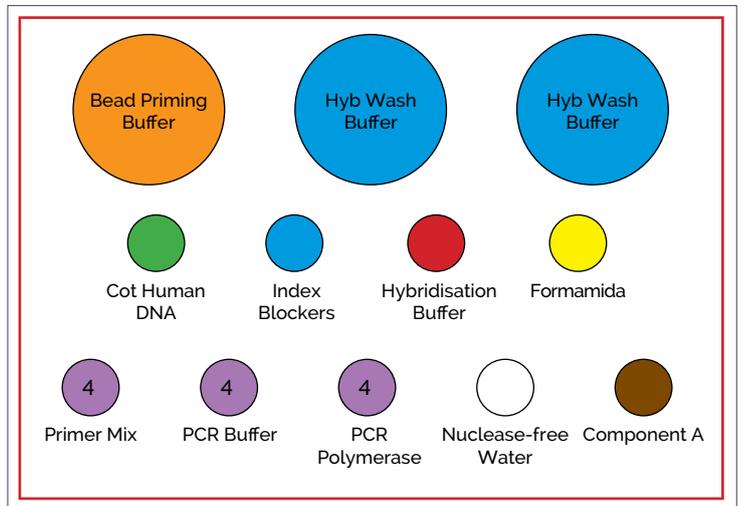
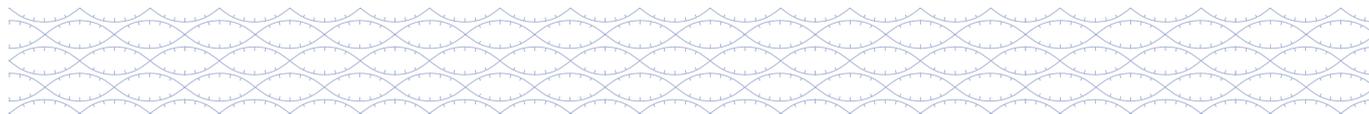


Figura 11: Posiciones de los tubos en el Hybridisation & Wash Kit V2 de 96 reacciones (770410-96).



Información legal

Este manual y su contenido son © Oxford Gene Technology (Operations) Limited 2024. Todos los derechos reservados. Queda prohibida la reproducción total o parcial de su contenido en cualquier forma, excepto aquellas situaciones en las que los usuarios individuales puedan imprimir o guardar partes del protocolo para su uso personal. Esta licencia no permite a los usuarios incorporar el material ni ninguna parte sustancial del mismo en otras obras o publicaciones, ya sean impresas, digitales o en cualquier otro formato. En concreto (y sin que lo anterior se limite a este supuesto), ninguna parte sustancial del manual puede distribuirse o copiarse con fines comerciales.

Ensayo de preparación de librerías de NGS

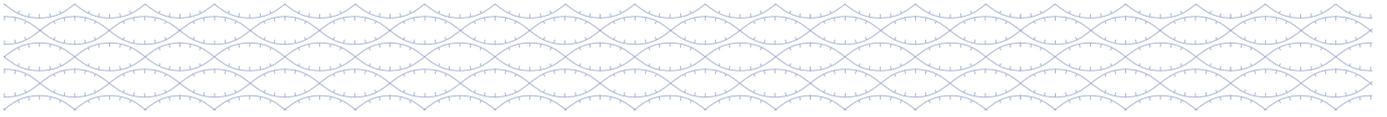
El Universal NGS Library Preparation Kit ha sido desarrollado por Oxford Gene Technology. El comprador tiene el derecho intransferible de utilizar y consumir el producto SOLO PARA USO EN INVESTIGACIÓN, Y NO PARA PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO. El producto no está destinado ni debe utilizarse para fines de diagnóstico, prevención, seguimiento, tratamiento o alivio de ninguna enfermedad o afección, ni tampoco para la investigación de ningún proceso fisiológico en cualquier persona identificable ni para ningún otro fin médico.

Marcas comerciales

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); y LoBind® (Eppendorf SE).

Obligaciones del cliente

El cliente reconoce que Oxford Gene Technology (Operations) Limited o las empresas del grupo de esta poseen todos los derechos de propiedad intelectual sobre el diseño del producto, incluidas la elección y la configuración de las secuencias de oligonucleótidos utilizadas en el producto. El producto únicamente puede ser reproducido o fabricado por Oxford Gene Technology (Operations) Limited o con su autorización.



Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º cat.
Universal NGS Workflow Solution V2	Conjunto de 1 Universal Library Preparation Kit, 1 Universal Index Adapters, 1 Universal Hybridisation & Wash Kit y 1 Universal Bead Kit	770510-24 770510-96

Tabla 17: Información para pedidos

Para consultar la lista actualizada de productos y la información más reciente, visite ogt.com.

Información de contacto

Reino Unido: +44 (0) 1865 856826

EE. UU.: +1 914 467 5285

Asistencia técnica: support@ogt.com

contact@ogt.com

ogt.com

Oxford Gene Technology Ltd.

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

Reino Unido



Una empresa del Grupo Sysmex

**What binds us,
makes us.**

SureSeq™ y CytoSure®: Solo para uso en investigación. No deben utilizarse en procedimientos de diagnóstico. Este documento y su contenido son © Oxford Gene Technology IP Limited - 2024. Todos los derechos reservados. OGT™, CytoSure® y SureSeq™ son marcas comerciales de Oxford Gene Technology IP Limited.

Oxford Gene Technology (Operations) Ltd., empresa registrada en Inglaterra (n.º 03845432), Unit 5, Oxford Technology Park, 4A Technology Drive, Kidlington, Oxfordshire, OX5 1GN, Reino Unido.

990370 09/24