SureSeq

Una società del gruppo Sysmex

Manuale di OGT

Soluzione Universale V2 per workflows NGS

Solo per uso di ricerca; non utilizzare nelle procedure diagnostiche

Indice

Introduzione 4

Reagenti, materiali di consumo e attrezzature 5

Reagenti forniti da OGT 5
Reagenti forniti dall'utente 6
Materiali di consumo forniti dall'utente 7
Attrezzature fornite dall'utente 7

Linee guida generali 8

Consigli prima di iniziare 8
Conservazione e manipolazione 8
Sicurezza 9
Legenda dei simboli 9

Uso previsto 9

Software Interpret NGS Analysis 10

Panoramica del processo 10

Requisiti del campione 11

Requisiti del campione 11
DNA: preparazione del campione 11
Concentrazione del DNA: kit di analisi HS dsDNA Qubit 11
Integrità del DNA: ScreenTape per DNA genomico 12
Purezza: NanoDrop 13

Preparazione della libreria 14

Step 1: Frammentazione del DNA, riparazione delle estremità e aggiunta della coda di adenina (A) all'estremità 3' 14
Step 2: ligazione e purificazione dell'adattatore 17
Step 3: PCR pre-cattura 23
Ibridazione universale 28
Cattura e lavaggio universali 32
Step 4: PCR post-cattura 40

Sequenziamento 45

Preparazione del file dei campioni 47
Denaturazione e caricamento del pool di sequenziamento 48

Appendice 49

Sequenze degli adattatori 49
Sequenze degli indici 49
Linee guida consigliate per il sequenziamento 54
Posizioni delle provette dei reagenti 55

Informazioni legali 56

Dosaggio NGS di preparazione della libreria 56
Marchi commerciali 56
Obblighi del cliente 56

Informazioni sugli ordini 57

Informazioni di contatto 57

Introduzione

La Soluzione Universale V2 per workflows NGS è stata sviluppata e ottimizzata per l'uso con le sonde per pannelli genetici SureSeq™ e CytoSure® progettate da Oxford Gene Technology (OGT) per fornire il rilevamento accurato di un'ampia gamma di varianti.

La gamma di sequenziamento di nuova generazione (NGS) di OGT è compatibile con le sostanze reagenti di Illumina MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ e NovaSeq™.

Il kit da 24 reazioni contiene un numero sufficiente di reagenti per processare un set di 8 campioni in tre occasioni. Nel kit da 96 reazioni è presente un numero sufficiente di reagenti per processare un set di 24 campioni in quattro occasioni.

Reagenti, materiali di consumo e attrezzature

Reagenti forniti da OGT

Contenuto	Condizioni di spedizione/ conservazione	N. cat. (24 reazioni)	N. cat. (96 reazioni)
Kit di preparazione universale della libreria	Spedito a -20 °C, conservare a -20 °C	770100-24	770100-96
Adattatori universali per indici	Spediti a -20 °C, conservare a -20 °C	770200-24	770200-96
Kit V2 universale di ibridazione e lavaggio	Spedito a -20 °C, conservare a -20 °C	770410-24	770410-96
Kit con biglie magnetiche pre-PCR	Spedito a 4 °C, conservare a 4 °C	770310-24	770310-96
Kit di biglie magnetiche post-PCR	Spedito a 4 °C, conservare a 4 °C	770315-24	770315-96
Pannello SureSeq CLL+CNV V3			
SureSeq Reference DNA	Spedito a -20 °C, conservare a 4 °C	770600	-

Kit di preparazione universale della libreria
770100-24 e 770100-96

Adattatori universali per indici
770200-24 e 770200-96

Kit V2 universale di ibridazione e lavaggio
770410-24 e 770410-96

Kit con biglie magnetiche pre-PCR
770310-24 e 770310-96

Kit di biglie magnetiche post-PCR
770315-24 e 770315-96

SureSeq Reference DNA
770600

Reagenti, materiali di consumo e attrezzature

Reagenti forniti dall'utente

Componente	Fornitore suggerito	N. cat.*
Etanolo 100% di grado per biologia molecolare	Fornitore generico di laboratorio	–
Acqua di grado per biologia molecolare	Fornitore generico di laboratorio	–
Soluzione di idrossido di sodio 5,0 M di grado per biologia molecolare	Fornitore generico di laboratorio	–
Kit di analisi ad alta sensibilità (HS) dsDNA Qubit®	Termo Fisher Scientific	Q32854
Kit di analisi ad ampio spettro (BR) dsDNA Qubit	Termo Fisher Scientific	Q32853
D1000 ScreenTape	Agilent Technologies	5067-5582
Reagenti D1000	Agilent Technologies	5067-5583
High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent Technologies	5067-5584
Reagenti High Sensitivity D1000	Agilent Technologies	5067-5585
Kit V2 di reagenti MiSeq (300 cicli)	Illumina†	MS-102-2002
Kit V3 di reagenti MiSeq (600 cicli)	Illumina†	MS-102-3003
NextSeq 500/550 Mid-Output Kit v2.5 (300 cicli)	Illumina†	20024905
NextSeq 500/550 High-Output Kit v2.5 (300 cicli)	Illumina†	20024908
Facoltativo: ScreenTape per DNA genomico	*Agilent Technologies*	*5067-5365*
Facoltativo: reagenti per DNA genomico	*Agilent Technologies*	*5067-5366*

* I numeri di catalogo sono corretti per il Regno Unito, ma potrebbero variare in altri territori. Per maggiori informazioni, scrivere all'indirizzo email support@ogt.com

† A seconda del dispositivo di sequenziamento utilizzato.

Reagenti, materiali di consumo e attrezzature

Materiali di consumo forniti dall'utente

Componente	Fornitore suggerito	N. cat.*
Provette per dosaggio Qubit	Termo Fisher Scientific	Q32856
Provette per DNA da 1,5 ml LoBind®	Eppendorf	22431021
Strips per PCR con tappi attaccati	Starlab	A1402-3700
Puntali per pipette sterili resistenti agli aerosol con filtri da 2, 10, 20, 200, 1000 µl	Fornitore generico di laboratorio	–
Facoltativo: provette da 15 ml o 50 ml	*Fornitore generico di laboratorio*	–
Facoltativo: serbatoi monouso per reagenti	*Fornitore generico di laboratorio*	–

Attrezzature fornite dall'utente

Componente	Fase richiesta	Fornitore suggerito	N. cat.*
Agilent® 4200 TapeStation®	Post-PCR	Agilent Technologies	G2991BA
2 x termociclatori (96 pozzetti) con coperchio riscaldato	Pre e post-PCR	Fornitori generici di laboratorio	–
Agitatore vortex da laboratorio; OGT consiglia l'agitatore vortex Digital IKA™ MS 3	Pre e post-PCR	IKA	IKA 0003319000
Adattatore per piastra per agitatore vortex; OGT consiglia l'attacco per microtitolazione IKA MS 3.4	Post-PCR	IKA	IKA 0003426400
Microcentrifuga per provette standard da 1,5 ml e provette PCR a 8 strips	Pre e post-PCR	Fornitore generico di laboratorio	-
Magnete per piastra con micropozzetti a 96 pozzetti; OGT consiglia il magnete laterale DynaMag™-96	Pre e post-PCR	Termo Fisher Scientific	12331D
Magnete per provette da 1,5 ml; OGT consiglia il magnete DynaMag-2	Post-PCR	Termo Fisher Scientific	12321D
Fluorometro (Qubit 4)	Pre e post-PCR	Termo Fisher Scientific	Q33238
NanoDrop™ (uno spettrofotometro per microvolumi UV-Vis)	Pre-PCR	Termo Fisher Scientific	ND-ONE-W
Pipetta a 8 canali da 20–200 µl e 1–10 µl	Pre e post-PCR	Fornitore generico di laboratorio	–
Illumina MiniSeq, MiSeq, NextSeq o NovaSeq	Post-PCR	Illumina	–

* I numeri di catalogo sono corretti per il Regno Unito, ma potrebbero variare in altri territori. Per maggiori informazioni, scrivere all'indirizzo email support@ogt.com

Linee guida generali

Consigli prima di iniziare

Per ottenere risultati ottimali, OGT consiglia di eseguire tutti gli step in provette con Strips per PCR con tappi attaccati.

Si consiglia vivamente di testare le condizioni di ibridazione (termociclatore e attrezzature in plastica) per garantire che durante l'incubazione notturna si verifichi un'evaporazione minima.

- Per effettuare il test, aggiungere 17 µl di acqua priva di nucleasi (senza DNA) in ogni pozzetto che si desidera utilizzare e utilizzare le impostazioni del termociclatore riportate nella Tabella 9.
- Dopo l'incubazione notturna, verificare che l'evaporazione non superi 1-2 µl per provetta.
- Se necessario, regolare l'impostazione dei coperchi del termociclatore e/o utilizzare distanziatori adatti al modello del termociclatore.

Utilizzare una soluzione fresca di etanolo all'80% per tutto il processo, usando etanolo di grado per biologia molecolare e acqua di grado per biologia molecolare.

Ove opportuno, consentire alle sfere Mag-Bind® TotalPure NGS e alle sfere magnetiche di streptavidina Dynabeads™ M-270 di equilibrarsi a temperatura ambiente rimuovendole dalle rispettive condizioni di conservazione almeno 30 minuti prima dell'uso.

Conservazione e utilizzo

Il kit deve essere utilizzato prima della data di scadenza indicata sulla sua etichetta.

Il kit di preparazione universale della libreria, gli adattatori universali per indici, i pannelli costituzionali SureSeq e NGS e il kit V2 di ibridazione e lavaggio universali devono essere conservati a -20 °C.

I kit SureSeq Reference DNA e con biglie magnetiche pre-PCR e post-PCR devono essere conservati a 4 °C.

Linee guida generali

Sicurezza

La manipolazione delle sonde per pannelli OGT deve essere effettuata da personale di laboratorio qualificato, nel rispetto delle buone pratiche di laboratorio, utilizzando i dispositivi di protezione adeguati, come camici da laboratorio, occhiali protettivi e guanti.

Il kit V2 di ibridazione e lavaggio universali contiene sostanze reagenti potenzialmente pericolose quando viene maneggiato in modo improprio. Prestare particolare attenzione alla formammide e al buffer di ibridazione.

Prima di procedere con il protocollo, assicurarsi che tutti gli operatori abbiano preso visione delle schede dati di sicurezza (SDS) e delle valutazioni dei rischi pertinenti.

Legenda dei simboli

Simbolo	Definizione
	Informazioni importanti: è particolarmente importante leggere, comprendere e seguire attentamente queste note.
	Suggerimento per risparmiare tempo: suggerimento facoltativo per aumentare l'efficienza del protocollo.
	Step freddo: per questo step, mantenere tutti i componenti su ghiaccio.
	Step sul magnete: durante questi step, tenere tutte le provette sul magnete.
	Informazioni specifiche sul sequenziamento: è particolarmente importante leggere, comprendere e seguire attentamente queste note per caricare la Corsa di sequenziamento in modo ottimale.
	Punto sicuro di interruzione: in questa fase i campioni possono essere conservati in modo sicuro, senza influire sui risultati.

Uso previsto

Questi prodotti sono destinati ai dosaggi a solo scopo di ricerca. La soluzione universale per i flussi di lavoro NGS è progettata per l'uso da parte del da personale opportunamente formato, utilizzando DNA estratto da vari tessuti, tra cui sangue e midollo osseo.

Software Interpret NGS Analysis

I file di dati grezzi FASTQ generati dai sequenziatori Illumina possono essere analizzati utilizzando il software Interpret NGS Analysis e trasformati in report di analisi NGS interattivi. Il software è l'efficiente pacchetto di analisi dei dati di OGT fornito con il kit.

Panoramica del processo

Per informazioni sugli ordini dei prodotti OGT, visitare il sito **www.ogt.com**.

La sezione seguente contiene istruzioni per la produzione di librerie di campioni specifiche per la piattaforma di sequenziamento Illumina. Per ogni campione viene eseguita una preparazione individuale della libreria. Ogni campione è contrassegnato da una sequenza indice (codice a barre) e da un identificatore molecolare univoco (UMI) per la correzione degli errori e una maggiore precisione durante il sequenziamento. I campioni vengono amplificati e poi raggruppati in set di otto. Ogni pool viene ibridato per progettare sonde specifiche, catturate e poi amplificate, pronte per il sequenziamento.

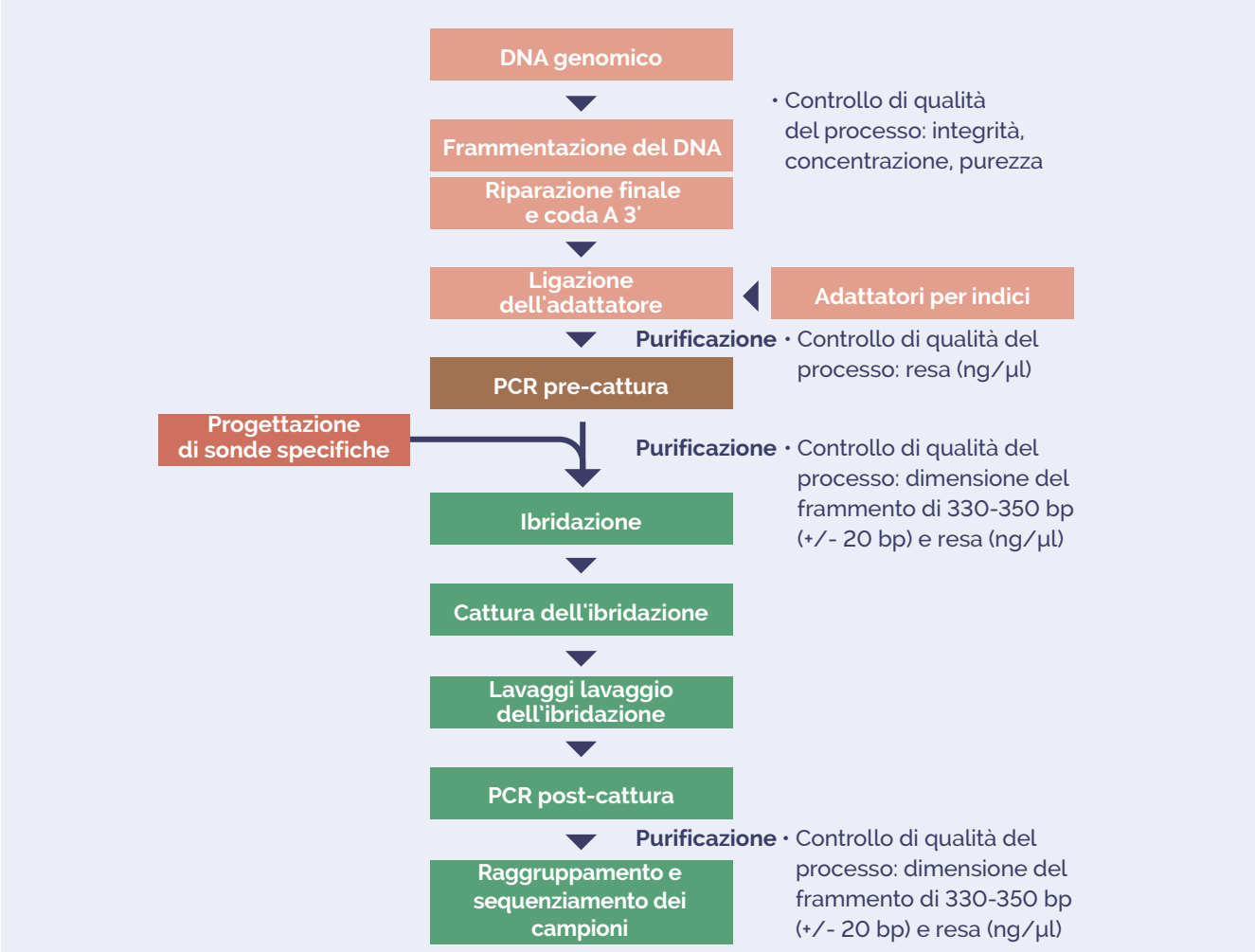


Figura 1: processo della preparazione della libreria dei campioni che indica la dimensione prevista del frammento di DNA in ogni step della procedura.

Requisiti del campione

DNA: il protocollo è stato ottimizzato per input di DNA di 200-500 ng.

Per il pannello SureSeq CLL + CNV V3: includere 500 ng di SureSeq Reference Female e 500 ng di SureSeq Reference Male dal kit SureSeq Reference DNA. È richiesto un campione di riferimento per pool di ibridazione, per un totale di due in una corsa MiSeq da 16 campioni.

La modifica dell'input di DNA consigliato influirà sui risultati del sequenziamento a valle.

DNA: preparazione del campione

Prima di iniziare il protocollo, è obbligatorio determinare la concentrazione del campione di gDNA per tutti i campioni.

La valutazione dell'integrità e della purezza del DNA è facoltativa, ma consigliata.

Raccomandiamo i seguenti test per valutare l'integrità, la concentrazione e la purezza del campione:

- Concentrazione: Thermo Fisher Scientific Qubit
- Integrità del DNA: Agilent 4200 TapeStation
- Purezza: Thermo Scientific NanoDrop

Concentrazione del DNA: kit di analisi HS dsDNA Qubit

Consultare il manuale d'uso del fabbricante di Thermo Fisher Scientific Qubit.
Di seguito sono descritti gli step chiave:

1. Preparare la soluzione di lavoro Qubit diluendo il reagente Qubit 1:200 nel buffer Qubit.
2. Prelevare 190 µl di soluzione di lavoro Qubit per i due standard.
3. Aggiungere 10 µl di ogni standard Qubit nella provetta appropriata.
4. Prelevare 199 µl di soluzione di lavoro Qubit per ogni campione in fase di valutazione.
5. Aggiungere 1 µl di campione nella provetta appropriata.

Requisiti del campione

I campioni con una concentrazione iniziale di DNA >100 ng/µl devono essere prediluiti a 20-100 ng/µl con il buffer TE (fornito nel kit). Confermare la concentrazione del DNA utilizzando il kit di analisi HS dsDNA Qubis. Quantificare in modo preciso l'input di DNA è essenziale per ottenere risultati di frammentazione riproducibili.

6. Mescolare agitando in vortex per 2–3 secondi, facendo attenzione a non far formare bolle.
7. Incubare le provette a temperatura ambiente per 2 minuti.
8. Misurare e registrare le concentrazioni di DNA seguendo le istruzioni sullo schermo.

Integrità del DNA: ScreenTape per DNA genomico

Facoltativo: questo step è importante per valutare l'eventuale livello di degradazione del DNA.

Consultare il manuale d'uso del fabbricante di Agilent 4200 TapeStation. Di seguito sono descritti gli step chiave:

1. Preparare il ladder mescolando 10 µl di buffer per campioni di DNA genomico con 1 µl di ladder per DNA genomico nella prima provetta/pozzetto della provetta con strips o della piastra.

Nota: Per ogni corsa è necessaria un ladder. Per il dosaggio del DNA genomico non è disponibile alcun ladder

2. Per ogni campione in fase di valutazione, aggiungere 1 µl di campione di DNA a 10 µl di buffer per campioni.
3. Sigillare tutte le provette/tutti i pozzetti.
4. Agitare in vortex le provette o la piastra per 1 minuto a 2000 rpm e quindi centrifugare brevemente per raccogliere il liquido sul fondo.
5. Centrifugare brevemente per raccogliere il campione sul fondo delle provette/dei pozzetti.
6. Caricare la strip di provette o la piastra su Agilent 4200 TapeStation.

Nota: se si utilizzano provette con strips, ricordarsi di togliere i tappi.

7. Evidenziare i campioni richiesti sul software di controllo e inserire i nomi dei campioni nel file dei campioni.
8. Specificare un nome del file nel campo “Prefix” (Prefisso) del software di controllo per salvare i risultati e selezionare “Start” (Avvia).
9. Verificare che l'elettroferogramma mostri che l'integrità del gDNA è intatta, con una distribuzione uniforme e una dimensione massima del picco >5000 bp.
10. Dopo aver effettuato l'elettroforesi del DNA con Agilent 4200 TapeStation, viene generato un numero di integrità del DNA (DIN). Un DIN >7 indica la presenza di DNA intatto, mentre un DIN <7 indica che il DNA è degradato. Se un campione ha un DIN <7, contattare il FAS locale.

Purezza: NanoDrop

Facoltativo: questo step è importante per valutare la purezza del campione di DNA.

Consultare il manuale d'uso del fabbricante di NanoDrop.
Di seguito sono descritti gli step chiave:

1. Utilizzare l'impostazione “Nucleic Acid” (Acido nucleico) e “DNA-50”.
2. Pulire il piedistallo con acqua priva di nucleasi.
3. Caricare 1-2 µl di buffer campione o soluzione di bianco.
4. Fare clic su “Measure blank” (Misura bianco).
5. Pulire il piedistallo con una salvietta priva di lanugine.
6. Caricare 1-2 µl di ogni campione sul piedistallo.
7. Fare clic su “Measure” (Misura).
8. Registrare le letture per 260/230, 260/280 e la concentrazione (ng/µl).

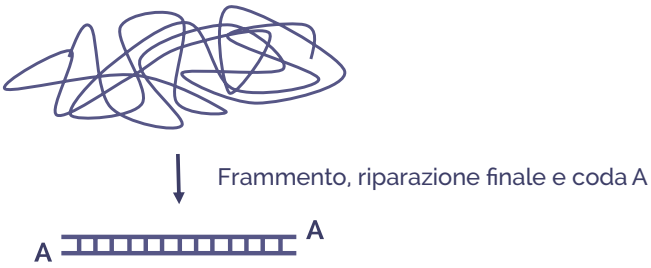
Si consiglia un rapporto OD 260/280 compreso tra 1,8 e 2,0 e un rapporto OD 260/230 compreso tra 2,0 e 2,2. L'uso di campioni di DNA con rapporti inferiori può comportare prestazioni scadenti.

Per consigli sulla qualità dei campioni, contattare il Field Application Specialist (FAS) locale di OGT.

Preparazione della libreria: Step 1

Frammentazione del DNA, riparazione delle estremità e aggiunta della coda di adenina (A) all'estremità 3'

DNA genomico



Panoramica

Il DNA genomico è frammentato dal punto di vista enzimatico. Il dsDNA frammentato viene riparato con enzimi nella miscela di frammentazione e riparazione delle estremità (ER) per creare estremità smussate. Contemporaneamente, viene creato una sporgenza di adenina al 3' in preparazione alla ligazione dell'adattatore.

Prima di iniziare:

Rimuovere il buffer TE (coperchio blu; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C). Lasciar scongelare a temperatura ambiente e poi mettere in ghiaccio.

> Utilizzare solo il buffer TE (coperchio blu; ●) fornito nel kit per la preparazione dei campioni di DNA (10 mM Tris, 1 mM EDTA). L'uso di altre formulazioni TE (ad esempio 0,1x TE) o di acqua può influenzare i risultati della frammentazione.

- Step 1: rimuovere il buffer framm. + ER (coperchio arancione; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C). Lasciar scongelare a temperatura ambiente e mettere in ghiaccio. Assicurarsi che tutti i componenti del buffer siano dissolti.

  Non è raro osservare precipitazioni nel buffer. In tal caso, pipettare il buffer più volte per rompere il precipitato, quindi agitare rapidamente in vortex per mescolare fino a completa dissoluzione. Se rimane del precipitato, evitare di pipettarlo nella master mix.

- Step 1: rimuovere framm. + enzima ER (coperchio arancione; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e mettere in ghiaccio.
- Assicurarsi che i campioni di DNA siano prediluiti a 20-100 ng/µl con buffer TE (coperchio blu; ●).

Preparazione della libreria: Step 1

Eseguire lo step 1: Frammentazione del DNA, riparazione delle estremità e aggiunta della coda di adenina (A) all'estremità 3'

Tempo stimato: 1,25 ore per 8-24 campioni. Durata dell'attività pratica: 15 min.

1. Programmare il termociclatore utilizzando le impostazioni indicate nella Tabella 1. Salvare il programma come "Frammentazione OGT".

Step	Temperatura (°C)	Tempo
1	37	20 min.
2	65	30 min.
3	4	Attesa

Tabella 1: profilo di incubazione del programma "Frammentazione OGT".

2. **Preriscaldare** il termociclatore a 37 °C. Se possibile, impostare il coperchio riscaldato a 75 °C; in alternativa, attivare il coperchio riscaldato preimpostato.

3. Nelle provette con Strips per PCR, diluire **200-500 ng** di DNA campione con il buffer TE raffreddato (coperchio blu; ●) fornito per un volume totale di **26,5 µl**. Mescolare usando un agitatore vortex per **3-5 secondi**, centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto e mettere in ghiaccio.

Per SureSeq CLL + CNV V3: preparare 1 x 500 ng di DNA di riferimento umano femminile e 1 x 500 ng di DNA di riferimento umano maschile in un volume totale di **26,5 µl** per ogni corsa di 16 campioni. Elaborare i due campioni di riferimento in parallelo con i 14 campioni di analisi.

4. Etichettare un nuovo set di provette con Strips per PCR per il campione e metterle in ghiaccio.

5. Step 1: miscelare framm. + buffer ER e step 1: framm. + enzima ER usando un agitatore vortex per **5-8 secondi**. Centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto e metterlo in ghiaccio.

⚠ Per ottenere prestazioni ottimali, è essenziale miscelare accuratamente Framm. + enzima ER.

Preparazione della libreria: Step 1

6. Preparare la frammentazione e la master mix ER secondo la Tabella 2 in una provetta LoBind nuova da 1,5 ml e mettere in ghiaccio.

Reagente	Libreria da 1 (µl)	Libreria da 8 (µl) (include 2 eccedenze)	Libreria da 16 (µl) (include 2 eccedenze)	Libreria da 24 (µl) (include 3 eccedenze)
Campione di DNA	26,5	–	–	–
Step 1: framm. + buffer ER (coperchio arancione; ●)	7	70	126	189
Step 1: framm. + enzima ER (coperchio arancione; ●)	1,5	15	27	40,5
TOTALE	35	85	153	229,5

Tabella 2: frammentazione e master mix ER.

7. Mescolare la frammentazione e la master mix ER usando un agitatore vortex per **3–5 secondi**, centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto e mantenerlo in ghiaccio.

8. Aggiungere **8,5 µl** di frammentazione e master mix ER in ogni provetta vuota preparata nello step 4 e mantenere in ghiaccio.

9. Utilizzando una pipetta multicanale, aggiungere **26,5 µl** del campione di DNA dallo step 3 alle provette dallo step 4.

> ⚠ Procedere tempestivamente per evitare una frammentazione eccessiva, in quanto l'enzima è attivo a temperatura ambiente. Mantenere i campioni in ghiaccio quando non vengono agitati in vortex o centrifugati.

10. Mescolare **immediatamente** usando un agitatore vortex per **3 secondi**.

11. Centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto e trasferire **immediatamente** nel termociclatore **preriscaldato**. Iniziare il programma "Frammentazione OGT".

> 💡 Consiglio: preparare la master mix di ligazione negli ultimi 10 minuti del programma del termociclatore.

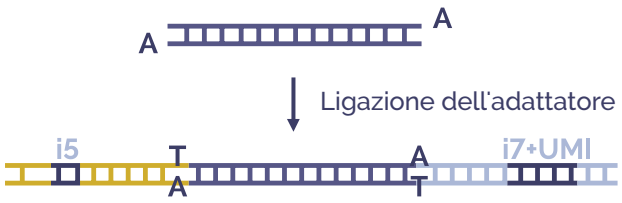
12. Una volta completato il programma e quando il termociclatore ha raggiunto 4 °C, rimuovere i campioni e metterli in ghiaccio fino a quando non si è pronti a procedere con la ligazione dell'adattatore.

> ⚠ Consigliamo di continuare immediatamente con lo "Step 2: ligazione e purificazione dell'adattatore". Se necessario, i campioni possono essere conservati a -20 °C; tuttavia, si potrebbe osservare una perdita di resa (~20%).

Preparazione della libreria: step 2

Ligazione e purificazione dell'adattatore

Panoramica



Utilizzando la sporgenza al 3' creata durante la riparazione delle estremità/A-tailing e ligasi del DNA, le Sequenze degli adattatori compatibili con Illumina vengono ligate ai frammenti di dsDNA. Gli adattatori contengono sequenze di identificatori molecolari univoci (UMI) e indici di campione univoci.

Prima di iniziare:

- Togliere dal frigorifero almeno le sfere Mag-Bind TotalPure NGS dal kit universale con sfere pre-PCR almeno **30 minuti prima dell'uso** per portarle a temperatura ambiente.
- Preparare una soluzione fresca di etanolo all'80% utilizzando etanolo di grado per biologia molecolare e acqua di grado per biologia molecolare.
- Step 2: rimuovere il buffer di ligazione (coperchio giallo; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e scongelare a temperatura ambiente. Assicurarsi che tutti i componenti del buffer di ligasi siano dissolti. Se necessario, incubare a 37 °C fino alla dissoluzione.
- Step 2: rimuovere la ligasi (coperchio giallo; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e mettere in ghiaccio.
- Togliere la piastra degli adattatori universali per indici dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e lasciarla scongelare in ghiaccio **5-10 minuti prima dell'uso**. Centrifugare a impulsi la piastra degli adattatori per raccoglierne il contenuto. Tenere sempre la piastra in ghiaccio. Non portare a temperatura superiore a quella ambiente.
- Gli adattatori per indici sono esclusivamente monouso. Se si utilizza solo una parte della piastra, coprire i pozzetti degli adattatori utilizzati per evitare la fuoriuscita dell'adattatore per indice in eccesso. Gli adattatori inutilizzati possono anche essere aliquotati in provette con strips e scongelati immediatamente prima dell'uso.

Preparazione della libreria: step 2

- Assegnare un adattatore per indici diverso a ogni campione. Vedere la Figura 2 e la Figura 3 per la posizione degli adattatori per indici sulla piastra.
- OGT consiglia di processare lotti di otto campioni; ogni gruppo conterrà una colonna completa dalla piastra degli indici.

Eseguire lo step 2: ligazione

Tempo stimato: 35 min per 8–24 campioni. Durata dell'attività pratica: 15 min.

1. Programmare il termociclatore utilizzando le impostazioni indicate nella Tabella 3. Salvare il programma come "Ligazione OGT".

⚠ Non utilizzare il coperchio riscaldato. Se non è possibile spegnere il coperchio riscaldato, tenerlo aperto.

Step	Temperatura (°C)	Tempo
1	20	20 min.
2	4	Attesa

Tabella 3: profilo di incubazione del programma "OGT Ligation".

❄ 2. Step 2: miscelare il buffer di ligasi usando un agitatore vortex per **3–5 secondi**, centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto e mettere in ghiaccio.

❄ 3. Step 2: miscelare energicamente la ligasi, centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto e mettere in ghiaccio.

Preparazione della libreria: step 2

4. Preparare la master mix di ligazione secondo la Tabella 4 in una provetta LoBind nuova da 1,5 ml e metterla in ghiaccio.

Reagente	Libreria da 1 (µl)	libreria da 8 (µl) (include 2 eccedenze)	Libreria da 16 (µl) (include 2 eccedenze)	Libreria da 24 (µl) (include 3 eccedenze)
Campione di DNA	35	–	–	–
Adattatore per indici	2,5	–	–	–
Step 2: buffer di ligasi (coperchio giallo; 🟡)	9	90	162	243
Step 2: Ligasi (coperchio giallo; 🟡)	2	20	36	54
TOTALE	**48,5**	**110**	**198**	**297**

Tabella 4: master mix di ligazione.

5. Mescolare la master mix di ligazione usando un agitatore vortex per **3-5 secondi**, centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto e mantenerlo in ghiaccio.
6. Aggiungere **11 µl** della master mix di ligazione in ogni provetta di campione di DNA refrigerata contenente i prodotti frammentati.
7. Aggiungere **2,5 µl** dell'adattatore per indici a ogni provetta del campione di DNA dallo step 6.
8. Mescolare usando un agitatore vortex per **3-5 secondi** e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
9. Trasferire **immediatamente** nel termociclatore e iniziare il programma "Ligazione OGT".
10. Una volta completato il programma e quando il termociclatore ha raggiunto 4 °C, rimuovere i campioni e **procedere immediatamente** alla "Purificazione della libreria ligata".

Preparazione della libreria: step 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: Disposizione della piastra degli adattatori universali per indici (1-24). X: pozzetto vuoto.

	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: disposizione della piastra degli adattatori universali per indici (1-96).

Preparazione della libreria: step 2

Eseguire la purificazione della libreria ligata

Tempo stimato per l'attività pratica: 50 min. per 8-24 campioni.

Prima dell'uso, mescolare le sfere si un agitatore vortex per almeno 1 minuto o fino a quando la soluzione di sfere è omogenea e di colore uniforme.

Prima di iniziare:

1. Preparare un set **fresco** di provette con Strips per PCR per ogni strip di campioni.
2. Aggiungere **29 µl** di sfere Mag-Bind TotalPure NGS omogenee a temperatura ambiente dal kit con biglie magnetiche pre-PCR a ciascuna provetta **vuota** e mettere da parte fino al momento dell'utilizzo nello step 6.

Per le provette per i campioni di DNA:

3. Aggiungere **11 µl** di sfere Mag-Bind TotalPure NGS omogenee e a temperatura ambiente dal kit con biglie magnetiche pre-PCR in ogni provetta per campione di DNA. Mescolare usando un agitatore vortex per risospendere le sfere e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
4. Incubare a temperatura ambiente per **5 minuti**.
5. Posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa **3-5 minuti**).
6. Trasferire **60 µl** di **supernatante pulito contenente il campione di DNA** nelle provette contenenti le sfere preparate nello step 2. È possibile gettare i pellet di sfere usati.
7. Mescolare usando un agitatore vortex per risospendere le sfere e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
8. Incubare a temperatura ambiente per **5 minuti**.
9. Posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa **3-5 minuti**).
10. Evitando il pellet di sfere, rimuovere e gettare il surnatante pulito (**~88 µl**). **Conservare le sfere contenenti il campione di DNA.**
11. Aggiungere **200 µl** di etanolo all'80% in ogni provetta senza risospendere il pellet di sfere.
12. Incubare per **30 secondi**, quindi rimuovere l'etanolo.

Preparazione della libreria: step 2

13. Ripetere il lavaggio (step 11 e 12) una volta, per un totale di **due** lavaggi.
14. Sigillare le provette e centrifugare a impulsi per raccogliere l'etanolo residuo. Rimettere le provette sul supporto magnetico. Rimuovere l'etanolo residuo con una pipetta P20.
15. Asciugare i pellet delle sfere a temperatura ambiente per **1–2 minuti**.

Non far essiccare troppo in quanto farà diminuire la resa. Il pellet di sfere è asciutto quando l'aspetto della superficie cambia da lucido a opaco. Un'eccessiva essiccazione provoca la formazione di crepe nel pellet di sfere.

16. Togliere dal supporto magnetico e aggiungere **34 µl** di acqua priva di nucleasi direttamente sul pellet di sfere per eluire il campione di DNA. Mescolare usando un agitatore vortex per risospendere le sfere e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
17. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente.

Consiglio: se si procede con lo step 3: Pre-catturare immediatamente la PCR, lo step 3: Primer Mix e step 3: il buffer per PCR può essere rimosso dal luogo di conservazione per scongelarlo a temperatura ambiente.

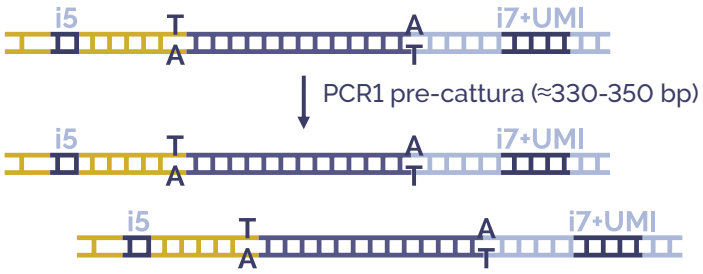
18. Etichettare un nuovo set di provette con Strips per PCR per i campioni e metterle da parte fino al momento dell'utilizzo nello step 20.
19. Posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa **2–3 minuti**).
20. Trasferire **32 µl** dell'eluato contenente i prodotti ligati purificati nelle provette dello step 18. A questo punto è possibile gettare le provette che contengono le sfere.
21. Valutare la resa utilizzando **1 µl** di prodotto ligato con il kit HS dsDNA Qubit secondo le istruzioni del fabbricante. La resa prevista è >2 ng/µl.

STOP **PUNTO DI INTERRUZIONE FACOLTATIVO:** se i campioni non devono essere utilizzati immediatamente, conservarli a -20 °C. Se si continua, procedere con la "PCR pre-cattura".

Preparazione della libreria: Step 3

PCR pre-cattura

Panoramica



La PCR ad alta fedeltà viene utilizzata per amplificare la libreria di DNA prima dell'ibridazione e della cattura del bersaglio. Il numero di cicli di PCR è ridotto al minimo per ridurre il numero di letture duplicate (copie di PCR dello stesso frammento di DNA originale) nei dati di sequenziamento.

Prima di iniziare:

- Step 3: rimuovere la primer mix (coperchio rosso; ●) e step 3: il buffer per PCR (coperchio rosso; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e lasciarlo scongelare a temperatura ambiente.
- Assicurarsi che tutti i componenti del buffer per PCR siano ben dissolti. Se necessario, mescolare in vortex e/o incubare a 37 °C fino alla dissoluzione.
- Step 3: rimuovere la polimerasi PCR (coperchio rosso; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e mettere in ghiaccio.

Preparazione della libreria: Step 3

Eseguire lo step 3: PCR pre-cattura

Tempo stimato: 45 min. per 8-24 campioni. Durata dell'attività pratica: 15 min.

1. Programmare il termociclatore utilizzando le impostazioni indicate nella Tabella 5 e nella Tabella 6. Salvare il programma come "PCR1 OGT". Se possibile, impostare il coperchio riscaldato a 105 °C; in alternativa, attivare il coperchio riscaldato preimpostato.

Step	Temperatura (°C)	Tempo
1	98	3 min.
2	98	30 sec.
3	65	30 sec.
4	72	1 min.
5	Ripetere gli step da 2 a 4 in base al numero di cicli indicato nella Tabella 6	
6	72	10 min.
7	4	Attesa

Tabella 5: profilo di incubazione del programma "OGT PCR1".

Input di DNA	Numero totale di cicli di PCR
200-350 ng	6
351-500 ng	5

Tabella 6: numero totale di cicli di PCR per l'intervallo consigliato di input di DNA.

2. Step 3: vortexare Primer Mix e step 3: il buffer per PCR usando un agitatore vortex per **3-5 secondi** e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
3. Step 3: miscelare energicamente la polimerasi PCR, centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto e mantenerlo in ghiaccio.

Preparazione della libreria: step 3

4. Preparare la master mix per PCR pre-cattura secondo la Tabella 7 in una provetta LoBind nuova da 1,5 ml.

Reagente	Libreria da 1 (µl)	libreria da 8 (µl) (include 2 eccedenze)	Libreria da 16 (µl) (include 2 eccedenze)	Libreria da 24 (µl) (include 3 eccedenze)
Campione di DNA ligato all'adattatore	31	–	–	–
Acqua priva di nucleasi (coperchio trasparente; ⚪)	9,5	95	171	256,5
Step 3: buffer per PCR (coperchio rosso; 🔴)	5	50	90	135
Step 3: primer mix (coperchio rosso; 🔴)	2,5	25	45	67,5
Step 3: polimerasi PCR (coperchio rosso; 🔴)	2	20	36	54
TOTALE	**50**	**190**	**342**	**513**

Tabella 7: master mix per PCR pre-cattura.

5. Mescolare la master mix per PCR pre-cattura usando un agitatore vortex per **3-5 secondi** e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
6. Aggiungere **19 µl** della master mix per PCR pre-cattura in ogni provetta del campione di DNA contenente i prodotti ligati.
7. Mescolare usando un agitatore vortex per **3-5 secondi** e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
8. Trasferire immediatamente nel termociclatore e iniziare il programma "PCR1 OGT".

Eseguire la purificazione PCR pre-cattura

Tempo stimato per l'attività pratica: 40 min. per 8-24 campioni.

⚠ Prima dell'uso, mescolare le sfere si un agitatore vortex per almeno 1 minuto o fino a quando la soluzione di sfere è omogenea e di colore uniforme.

Preparazione della libreria: step 3

Per le provette per i campioni di DNA:

1. Aggiungere **45 µl** di sfere Mag-Bind TotalPure NGS omogenee a temperatura ambiente dal con biglie magnetiche post-PCR in ogni provetta per campione di DNA. Mescolare usando un agitatore vortex per risospendere le sfere e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
2. Incubare a temperatura ambiente per **5 minuti**.
3. Posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa **3-5 minuti**).
4. Evitando il pellet di sfere, rimuovere e gettare il surnatante pulito (**~90 µl**). **Conservare le sfere contenenti il campione di DNA.**
5. Aggiungere **200 µl** di etanolo all'80% in ogni provetta senza risospendere il pellet di sfere.
6. Incubare per **30 secondi**, quindi rimuovere l'etanolo.
7. Ripetere il lavaggio (step 5 e 6) una volta, per un totale di due lavaggi.
8. Sigillare le provette e centrifugare a impulsi per raccogliere l'etanolo residuo. Rimettere le provette sul supporto magnetico. Rimuovere l'etanolo residuo con una pipetta P20.
9. Asciugare i pellet di sfere a temperatura ambiente per **1–2 minuti**.

⚠ Non far essiccare troppo in quanto farà diminuire la resa. Il pellet di sfere è asciutto quando l'aspetto della superficie cambia da lucido a opaco. Un'eccessiva essiccazione provoca la formazione di crepe nel pellet di sfere.

10. Togliere dal supporto magnetico e aggiungere **25 µl** di acqua priva di nucleasi direttamente sul pellet di sfere per eluire il campione di DNA. Mescolare usando un agitatore vortex per risospendere le sfere e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
11. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente.
12. Etichettare un nuovo set di provette con Strips per PCR per i campioni e metterle da parte fino al momento dell'utilizzo nello step 14.
13. Posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa **2-3 minuti**).
14. Trasferire **24 µl** dell'eluato contenente i prodotti amplificati purificati nelle provette nello step 12. A questo punto è possibile gettare le provette che contengono le sfere.

Preparazione della libreria: step 3

15. Valutare le dimensioni del prodotto amplificato utilizzando il sistema Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape. L'elettroferogramma dovrebbe mostrare una dimensione del picco di 330-350 bp (+/- 20 bp) (Figura 4). Installare lo strumento e preparare il nastro, i campioni e il ladder seguendo le istruzioni del fabbricante.

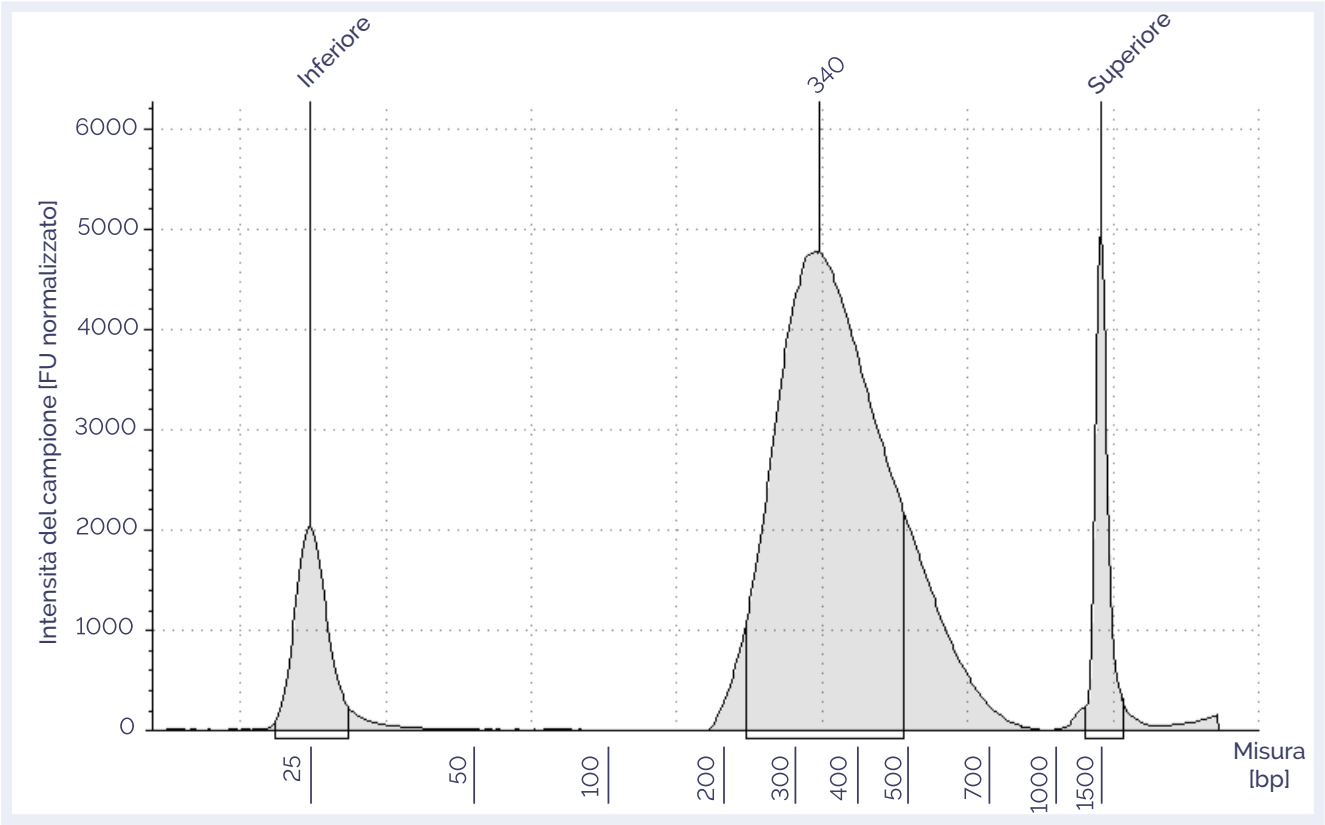


Figura 4: Elettroferogramma del prodotto PCR pre-cattura purificato, generato utilizzando un dosaggio Agilent D1000 ScreenTape. L'elettroferogramma mostra un picco massimo nell'intervallo di dimensioni di circa 330-350 bp (+/- 20 bp).

Le dimensioni dei frammenti al di fuori di questo intervallo possono ridurre la qualità dei dati della sequenza. Per ulteriori consigli, contattare proprio il Field Application Specialist (FAS) locale.

16. Valutare la resa utilizzando **1 µl** di prodotto amplificato con il kit HS dsDNA Qubit secondo le istruzioni del fabbricante.
La resa prevista è >18 ng/µl (~400 ng per libreria).

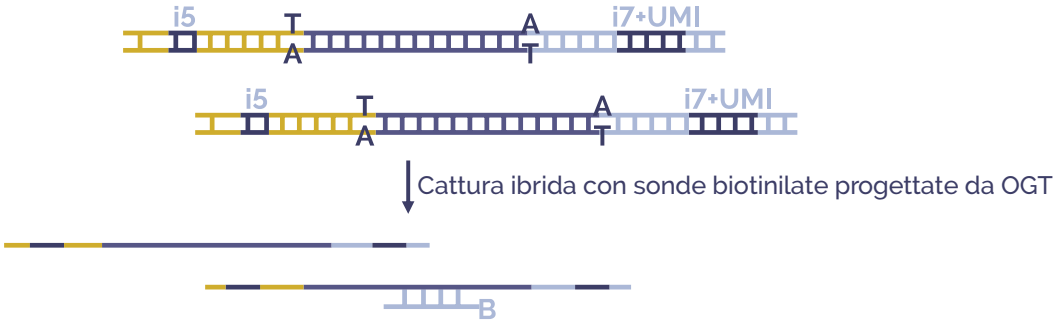
Si consiglia di utilizzare una pipetta monocanale e di assicurarsi che non sia presente liquido in eccesso sul lato della punta, per evitare letture imprecise che potrebbero influire sul raggruppamento.

STOP **PUNTO DI INTERRUZIONE FACOLTATIVO:** se i campioni non devono essere utilizzati immediatamente, conservarli a 4 °C durante la notte o a -20 °C per una conservazione a lungo termine. Se si continua, procedere con "Ibridazione universale".

Preparazione della libreria: ibridazione universale

Ibridazione universale

Panoramica



La libreria amplificata viene denaturata e catturata mediante sonde NGS SureSeq o CytoSure (biotinilate).

Prima di iniziare:

- Togliere dal frigorifero almeno le sfere Mag-Bind TotalPure NGS dal kit universale con sfere post-PCR almeno **30 minuti prima dell'uso** per portarle a temperatura ambiente.
- Preparare una soluzione fresca di etanolo all'80% utilizzando etanolo di grado per biologia molecolare e acqua di grado per biologia molecolare.
- Rimuovere il buffer di ibridazione (coperchio rosso; ●), la formammide (coperchio giallo; ●), il DNA umano Cot (coperchio verde; ●), i bloccanti degli indici (coperchio blu; ●) e l'acqua priva di nucleasi (coperchio trasparente; ○) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e lasciar scongelare a temperatura ambiente.
- Togliere le sonde SureSeq o CytoSure dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e lasciarle scongelare a temperatura ambiente.
- Assicurarsi che tutti i componenti nel buffer di ibridazione siano dissolti. Se necessario, incubare a 37 °C fino alla dissoluzione.

Preparazione della libreria: ibridazione universale

Preparazione della master mix di ibridazione

Tempo stimato: 5 min. per 8-24 campioni. Durata dell'attività pratica: 5 min.

1. Mescolare usando un agitatore vortex il buffer, la formammide, il DNA umano Cot, le sonde specifiche per il pannello e i bloccanti degli indici per **3-5 secondi** e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
2. Preparare la master mix di ibridazione secondo la Tabella 8 in una provetta LoBind nuova da 1,5 ml.

Reagente	Pool da 1(µl)	Pool da 2 (µl) (include 0,5 di eccedenza)	Pool da 3 (µl) (include 0,5 di eccedenza)
Acqua priva di nucleasi (coperchio trasparente; ○)	2,5	6,25	8,75
Buffer di ibridazione (coperchio rosso; 🔴)	7,5	18,75	26,25
Formammide (coperchio giallo; 🟡)	3,5	8,75	12,25
TOTALE	**13,5**	**33,75**	**47,25**

Tabella 8: master mix di ibridazione.

3. Mescolare usando un agitatore vortex e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
4. **Procedere immediatamente** a "Raggruppare i campioni e ibridarli con le sonde".

Raggruppare i campioni e ibridali con le sonde

Tempo stimato: 40 min. per 8-24 campioni.

La reazione di ibridazione richiede che gli input di DNA di ciascun campione siano uguali e combinati in un pool di 8 campioni. Per ogni pool, effettuare una cattura di ibridazione. L'ibridazione viene eseguita al meglio con il massimo input possibile per campione, fino a 500 ng. Per rese di libreria inferiori a 500 ng, regolare l'input di tutti i campioni fino alla resa più bassa nel pool di ibridazione.

1. Calcolare i volumi di prodotto PCR pre-cattura necessari per combinare otto librerie e formare un pool di ibridazione.

⚠ Non utilizzare input inferiori a 300 ng per campione; contattare il **Supporto OGT** per ricevere ulteriore assistenza.

Preparazione della libreria: ibridazione universale

2. Aliquotare una quantità uguale di prodotto amplificato purificato dallo step 3 (**300 ng–500 ng**) di ciascuna delle otto librerie in un pool in una provetta LoBind da 1,5 ml.

   Per il pannello SureSeq CLL+CNV V3: include 1 libreria di riferimento SureSeq per pool, insieme ad altre 7 librerie. 1 x SureSeq Reference Female e 1 x SureSeq Reference Male: in una Corsa di sequenziamento di 16 campioni devono essere inclusi 2 campioni di riferimento in totale.
3. Aggiungere **10 µl** di DNA umano Cot (coperchio verde; ●) a ciascun pool.
4. Mescolare usando un agitatore vortex e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.

Prima dell'uso, mescolare le sfere si un agitatore vortex per almeno 1 minuto o fino a quando la soluzione di sfere è omogenea e di colore uniforme.

5. Aggiungere **2 volte** il volume delle sfere Mag-Bind TotalPure NGS dal kit con biglie magnetiche post-PCR a ciascun pool.
   Esempio: Aggiungere 140 µl di sfere a un pool di ibridazione da 60 µl (+ 10 µl di DNA umano Cot).
6. Mescolare usando un agitatore vortex e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
7. Incubare a temperatura ambiente per **5 minuti**.
8. Posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa **3–5 minuti**).
9. Evitando il pellet di sfere, rimuovere e gettare il surnatante pulito.
   Conservare le sfere contenenti il campione di DNA.
10. Aggiungere **500 µl** di etanolo all'80% in ogni provetta senza risospendere il pellet di sfere.
11. Incubare per **30 secondi**, quindi rimuovere l'etanolo.
12. Asciugare il pellet per **circa 5 minuti** o fino all'evaporazione completa dell'etanolo residuo.

Non far essiccare troppo in quanto farà diminuire la resa. Il pellet di sfere è asciutto quando l'aspetto della superficie cambia da lucido a opaco. Un'eccessiva essiccazione provoca la formazione di crepe nel pellet di sfere.

13. Rimuovere le provette dal supporto magnetico e aggiungere **13,5 µl** della master mix di ibridazione direttamente al pellet di sfere per eluire le librerie di DNA raggruppate. Mescolare usando un agitatore vortex per risospendere le sfere e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.

Assicurarsi che le sfere siano risospese bene. Potrebbe essere necessario vortexare più a lungo volumi maggiori di sfere, per garantirne la risospensione completa.

Preparazione della libreria: ibridazione universale

14. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente.
15. Etichettare un nuovo set di provette con Strips per PCR per i pool e metterle da parte fino al momento dell'utilizzo nello step 17.

Consiglio: programmare il termociclatore utilizzando le impostazioni indicate nella Tabella 9. Salvare il programma come "Ibridazione OGT".

16. Posizionare le provette su un supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa **2–3 minuti**).
17. Trasferire **13 µl** dell'eluato nelle provette vuote dello step 15. A questo punto è possibile gettare le provette che contengono le sfere.
18. Aggiungere **2 µl** di bloccanti degli indici (coperchio blu; ●) ai pool.
19. Aggiungere **2 µl** di sonde specifiche per il pannello nei pool.
20. Sigillare le provette, mescolare usando un agitatore vortex e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto. Il volume finale dovrebbe essere **17 µl**.
21. Assicurarsi che tutti i tappi siano ben chiusi.
22. Posizionare le provette nel termociclatore ed eseguire il programma "Ibridazione OGT" mostrato nella Tabella 9. Se possibile, impostare il coperchio riscaldato a 105 °C; in alternativa, attivare il coperchio riscaldato preimpostato.

Step	Temperatura (°C)	Tempo
1	95	5 min.
2	65	Attesa

Tabella 9: profilo di incubazione del programma "Ibridazione OGT".

23. Incubare la miscela di ibridazione durante la notte (**16–20 ore**) a 65 °C.

Evitare di superare le 24 ore, in quanto ciò aumenta il rischio di evaporazione.

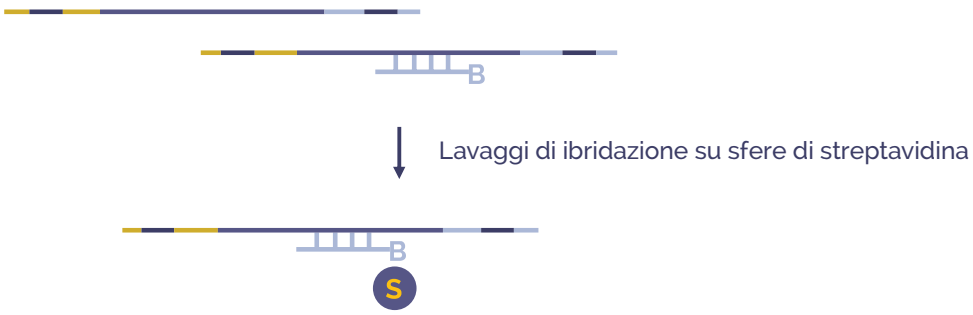
24. Continuare con "Cattura e lavaggio universali".

Rimuovere il buffer ibrido di lavaggio (punto blu; ●) e il buffer per il priming delle sfere (coperchio/punto arancione; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e lasciar scongelare a temperatura ambiente. Possono essere lasciati sul tavolo durante la notte per farli scongelare.

Preparazione della libreria: cattura e lavaggio universali

Cattura e lavaggio universali

Panoramica



I target ibridati vengono legati alle sfere di streptavidina e lavati per rimuovere l'eventuale DNA non bersaglio.

Tempo stimato: 1,25 ore per 8-24 campioni. Durata dell'attività pratica: 45 min.

Prima di iniziare:

- Preriscaldare un termociclatore a 65 °C per almeno **30 minuti prima dell'uso**.
- Preriscaldare un termociclatore a 35 °C per almeno **30 minuti prima dell'uso**.

⚠ È importante mantenere la temperatura corretta; si consiglia di controllarla utilizzando un termometro calibrato.

Togliere dal frigorifero almeno le sfere magnetiche con streptavidina Dynabeads M-270 dal kit con biglie magnetiche post-PCR almeno **30 min. prima dell'uso** per portarle a temperatura ambiente.

- Rimuovere il buffer ibrido di lavaggio (punto blu; ●) e il buffer per il priming delle sfere (coperchio/punto arancione; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e lasciar scongelare a temperatura ambiente. Possono essere lasciati sul tavolo durante la notte per farli scongelare.

Preparazione della libreria: cattura e lavaggio universali

Preparare il buffer ibrido di lavaggio da usare solo con il pannello NGS costituzionale CytoSure

- Per pannello NGS costituzionale CytoSure è necessario aggiungere il componente A (coperchio marrone; ●) alle bottiglie del buffer ibrido di lavaggio.

⚠ Il componente A è **non** necessario per i pannelli per il cancro SureSeq

1. Rimuovere il componente A (coperchio marrone; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e lasciar scongelare a temperatura ambiente.
2. Consultare la Tabella 10 per il volume necessario per le dimensioni del kit.

Dimensioni del kit	Volume del componente A da aggiungere al flacone del buffer ibrido di lavaggio (µl)
24 reazioni	100
96 reazioni	180 (per flacone di buffer ibrido di lavaggio)

Tabella 10: Volume del componente A da aggiungere al flacone del buffer ibrido di lavaggio.

3. Etichettare il flacone per indicare che è stato aggiunto il componente A.
4. Dopo aver aggiunto il componente A, capovolgere il flacone 10 volte.

Preparare la sequenza di cattura e i buffer di lavaggio delle sfere

1. Assicurarsi che il buffer ibrido di lavaggio e il buffer per il priming delle sfere siano completamente scongelati.

⚠ Incubare a 37 ˚C per 5-10 minuti per risospendere eventuali precipitati. È possibile scongelare questi buffer a temperatura ambiente durante l'incubazione notturna.

2. Aliquotare **6 x 200 µl** di buffer ibrido di lavaggio per il pool di ibridazione in provette con Strips per PCR come mostrato nella Figura 5 per un pool di ibridazione.

Preparazione della libreria: cattura e lavaggio universali

3. Preriscaldare le aliquote alle temperature seguenti in un termoblocco per almeno **30 minuti prima dell'uso**:

- 3 x 200 µl a 65 °C/pool
- 3 x 200 µl a 35 °C/pool

Pool 1	Pool 1
W1 ●	W1 ●
W2 ●	W2 ●
W3 ●	W3 ●
Lavaggi a 65 ˚C	Lavaggi a 35 ˚C

Figura 5: configurazione delle aliquote del buffer ibrido di lavaggio per un pool di ibridazione.

Preparare le sfere magnetiche

1. Agitare bene le sfere magnetiche con streptavidina Dynabeads M-270 per **1 minuto**, cambiando l'orientamento della provetta **ogni 15 secondi**.

Assicurarsi che la massa di sfere sia completamente libera dal fondo o dai lati del tubo, in quanto aggiungere sfere in eccesso influenzerà negativamente i processi a valle. Non centrifugare a impulsi le sfere magnetiche dopo averle mescolate.

2. Immediatamente prima dell'uso, risospendere le sfere magnetiche con streptavidina Dynabeads M-270 a temperatura ambiente utilizzando un set di pipette da **200 µl** per **100 µl** e pipettare verso l'alto verso e verso il basso almeno **10 volte**.

Preparazione della libreria: cattura e lavaggio universali

3. Aggiungere **100 µl** delle sfere magnetiche con streptavidina Dynabeads M-270 in una nuova provetta per PCR; una per pool di ibridazione.

In alternativa: è possibile lavare fino a 400 µl di sfere (per quattro pool di ibridazione) contemporaneamente in una singola provetta LoBind da 1,5 ml.

4. Posizionare le provette su un supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa **10 secondi**).
5. Evitando il pellet di sfere, rimuovere e gettare il surnatante pulito (**~100 µl**).
6. Aggiungere **200 µl** di 1x buffer per il priming delle sfere per **100 µl** di sfere. Mescolare usando un agitatore vortex e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
7. Riposizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa **10 secondi**).
8. Evitando il pellet di sfere, rimuovere e gettare il surnatante pulito (**~200 µl**).
9. Ripetere gli step 6-8 una volta, per un totale di **due** lavaggi.
10. Togliere dal supporto magnetico e aggiungere il volume originale del buffer per il priming delle sfere (ad esempio, per 100 µl di sfere, aggiungere 100 µl di buffer per il priming delle sfere), mescolare usando un agitatore vortex e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
11. Se si lavano più di **100 µl** di sfere per provetta, etichettare un nuovo set di provette con Strips per PCR e trasferire le sfere nelle nuove provette per PCR (100 µl/pool).
12. Posizionare le provette su un supporto magnetico, lasciare che le sfere si separino dal surnatante, quindi rimuovere con attenzione e gettare il surnatante.

Procedere immediatamente a "Eseguire la cattura ibrida". Non lasciare che le sfere si secchino. Piccole quantità residue di buffer per il priming delle sfere non interferiranno con il legame a valle del DNA con le sfere magnetiche con streptavidina Dynabeads M-270.

Preparazione della libreria: cattura e lavaggio universali

Eseguire la cattura ibrida

1. Dopo l'incubazione notturna, conservare i campioni ibridati sul termociclatore e trasferirli nelle strips da PCR contenenti le biglie magnetiche (**~17 µl** di volume) con streptavidina preparate.
2. Mescolare accuratamente usando un agitatore vortex per **3–5 secondi** e assicurarsi che le sfere vengano risospese. Centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
3. Rimettere le provette nel termociclatore mentre è ancora in esecuzione il programma "Ibridazione OGT" per **45 minuti**.
4. **Ogni 15 minuti**, mescolare usando un agitatore vortex per **3 secondi** seguito da una breve centrifuga a impulsi per raccogliere il contenuto. In questo modo si garantisce che le sfere rimangano in sospensione. Collocare le provette nel termociclatore eseguendo il programma "Ibridazione OGT".
5. Dopo 45 minuti di incubazione, rimuovere le provette dal termociclatore e centrifugare a impulsi per raccoglierne il contenuto. **Procedere immediatamente** allo step successivo "Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato".

Mantenere in esecuzione il programma "Ibridazione OGT" del termociclatore.

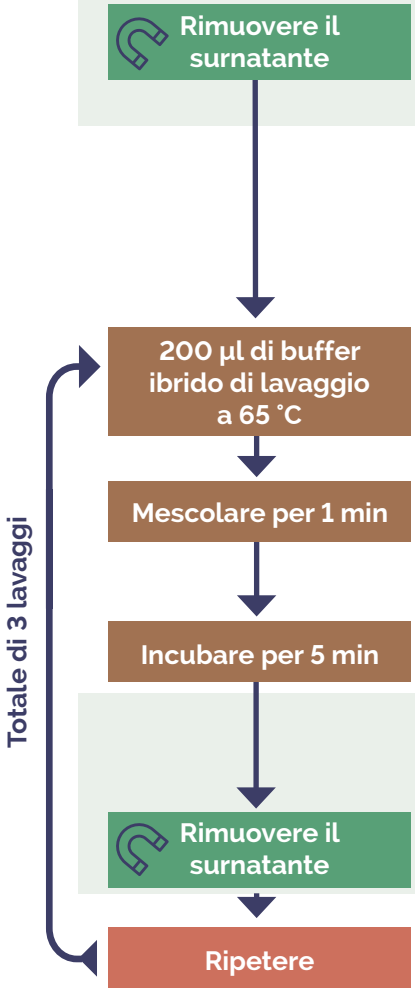
Lavare le sfere di streptavidina per rimuovere il DNA non legato

Lavorare rapidamente per garantire che la temperatura non scenda molto al di sotto dei 65 °C. Per ottenere questo risultato, consigliamo di eseguire tutti i lavaggi in provette con Strips per PCR e di utilizzare una pipetta multicanale.

Dopo l'aggiunta del nuovo buffer, assicurarsi che il pellet sia stato completamente risospeso con una breve miscelazione usando un agitatore vortex seguita da un'ispezione visiva. Non utilizzare una pipetta per mescolare.

Preparazione della libreria: cattura e lavaggio universali

Lavaggi caldi a 65 °C



1. Posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa 10 secondi).
2. Evitando il pellet di sfere, rimuovere e gettare il surnatante (~**17 µl**) che contiene DNA non legato.

⚠ La miscela di ibridazione contiene formammide.

3. Rimuovere le provette dal supporto magnetico.
4. Aggiungere **200 µl** di buffer ibrido di lavaggio preriscaldato (a 65 °C) alle sfere di cattura (con DNA legato).
5. Mescolare con un agitatore vortex per rompere il pellet di sfere. Controllare che il pellet sia stato risospeso completamente.
6. Posizionare le provette in un agitatore vortex con piastre e mescolare energicamente a circa 2000 rpm per **1 minuto**.
7. Rimettere i campioni nel termociclatore mentre è ancora in esecuzione il programma "Ibridazione OGT" per **5 minuti**.
8. Centrifugare a impulsi e posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa 10 secondi).
9. Evitando il pellet di sfere, rimuovere e gettare il surnatante (~**200 µl**) che contiene DNA non legato.
10. Ripetere gli step 3-9 due volte, per un totale di tre lavaggi a 65 °C.
11. Rimuovere le provette dal supporto magnetico.
12. **Procedere immediatamente** allo step successivo "Lavaggi a 35 °C con agitazione".

Preparazione della libreria: cattura e lavaggio universali

Lavaggi a 35 °C con agitazione

1. Aggiungere **200 µl** di buffer ibrido di lavaggio preriscaldato (a 35 °C) alle sfere di cattura.
2. Mescolare con un agitatore vortex per rompere il pellet di sfere. Controllare che il pellet sia stato risospeso completamente.
3. Posizionare le provette in un agitatore vortex con piastre e mescolare energicamente a circa 2000 rpm per **2 minuti**.
4. Centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
5. Posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa 10 secondi).
6. Evitando il pellet di sfere, rimuovere e gettare il surnatante che contiene DNA non legato (~**200 µl**).
7. Aggiungere **200 µl** di buffer ibrido di lavaggio preriscaldato (a 35 °C) alle sfere di cattura.
8. Mescolare con un agitatore vortex per rompere il pellet di sfere. Controllare che il pellet sia stato risospeso completamente.
9. Posizionare le provette in un agitatore vortex con piastre e mescolare energicamente a circa 2000 rpm per **1 minuto**.
10. Centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
11. Posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa 10 secondi).
12. Evitando il pellet di sfere, rimuovere e gettare il surnatante che contiene DNA non legato (~**200 µl**).
13. Aggiungere **200 µl** di buffer ibrido di lavaggio preriscaldato (a 35 °C) alle sfere di cattura.
14. Mescolare con un agitatore vortex per rompere il pellet di sfere. Controllare che il pellet sia stato risospeso completamente.

Preparazione della libreria: cattura e lavaggio universali

Lavaggi a 35 °C con agitazione (continua)

15. Posizionare le provette in un agitatore vortex con piastre e mescolare energicamente a circa 2000 rpm per **30 secondi**.

> ⚠ Non mescolare per più di 30 secondi.

16. Centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.

Rimuovere il surnatante

17. Posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa 10 secondi).
18. Evitando il pellet di sfere, rimuovere e gettare il surnatante (**~200 µl**).
19. Centrifugare a impulsi per raccogliere il buffer di lavaggio residuo. Riporre le provette sul supporto magnetico e rimuovere il buffer di lavaggio residuo con una pipetta P20.

Aggiungere 30 µl di NFW e mescolare

20. Togliere le provette dal supporto magnetico e aggiungere **30 µl** di acqua priva di nucleasi al pellet di sfere.
21. Mescolare con un agitatore vortex fino a formare una sospensione di sfere.

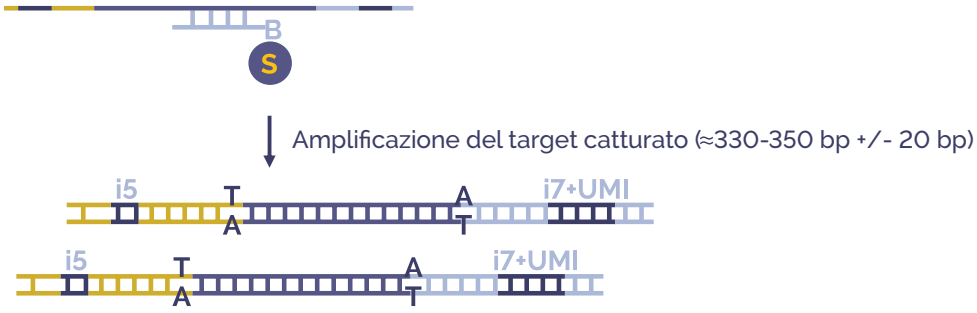
> 💡 Consiglio: se si procede con lo step 4: PCR post-cattura immediata, step 4: primer mix e step 4: il buffer per PCR può essere rimosso dal luogo di conservazione per scongelarlo a temperatura ambiente.

> STOP **PUNTO DI INTERRUZIONE FACOLTATIVO:** Se i campioni non devono essere utilizzati immediatamente, conservare la sospensione di sfere a 4 °C; non congelarla. Se si continua, procedere con "PCR post-cattura".

Preparazione della libreria: Step 4

PCR post-cattura

Panoramica



Dopo la cattura dei frammenti bersaglio, gli ssDNA legati alle sfere di streptavidina vengono amplificati.

Prima di iniziare:

- Togliere dal frigorifero almeno le sfere Mag-Bind TotalPure NGS dal kit universale con sfere post-PCR almeno **30 minuti prima dell'uso** per portarle a temperatura ambiente.
- Preparare una soluzione fresca di etanolo all'80% utilizzando etanolo di grado per biologia molecolare e acqua di grado per biologia molecolare.
- Step 4: rimuovere la primer mix (coperchio viola; ●) e step 4: il buffer per PCR (coperchio viola; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e lasciar scongelare a temperatura ambiente.
- Assicurarsi che tutti i componenti del buffer per PCR siano dissolti. se necessario, mescolare in vortex e/o incubare a 37 °C fino alla dissoluzione.
- Step 4: rimuovere la polimerasi PCR (coperchio viola; ●) dal luogo di conservazione (da -15 °C a -25 °C) e mettere in ghiaccio.

Preparazione della libreria: Step 4

Eseguire lo step 4: PCR post-cattura

Tempo stimato: 1,25 ore per 8–24 campioni. Durata dell'attività pratica: 15 min.

1. Programmare il termociclatore utilizzando le impostazioni indicate nella Tabella 11 e nella Tabella 12. Salvare il programma come "PCR2 OGT". Se possibile, impostare il coperchio riscaldato a 105 °C; in alternativa, attivare il coperchio riscaldato preimpostato.

Step	Temperatura (°C)	Tempo
1	98	3 min.
2	98	30 sec.
3	65	30 sec.
4	72	1 min.
5	Ripetere gli step da 2 a 4 per un numero totale di cicli specificato nella Tabella 12	
6	72	10 min.
7	4	Attesa

Tabella 11: profilo di incubazione del programma "PCR2 OGT".

Numero totale di cicli di PCR	Pannello
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 – Pannello NGS costituzionale CytoSure

Tabella 12: numero totale di cicli di PCR per vari pannelli NGS di OGT. Nota: se si utilizza un MyPanel personalizzato, contattare proprio il FAS per conoscere il numero di cicli di PCR.

2. Step 4: mescolare primer mix e step 4: il buffer per PCR usando un agitatore vortex per **3–5 secondi** e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
3. Step 4: mescolare energicamente la polimerasi PCR, centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto e mantenerlo in ghiaccio.

Preparazione della libreria: Step 4

4. Per più pool, preparare la master mix per PCR post-cattura secondo la Tabella 13 in una provetta LoBind nuova da 1,5 ml.

Reagente	Pool da 1(µl)	Pool da 2 (µl) (include 0,5 di eccedenza)	Pool da 3 (µl) (include 0,5 di eccedenza)
cDNA catturato in sospensione di sfere	14	–	–
Acqua priva di nucleasi (coperchio trasparente; ◯)	26,5	66,25	92,75
Step 4: buffer per PCR (coperchio viola; ●)	5	12,5	17,5
Step 4: primer mix (coperchio viola; ●)	2,5	6,25	8,75
Step 4: polimerasi PCR (coperchio viola; ●)	2	5	7
TOTALE	**50**	**90**	**126**

Tabella 13: master Mix per post-cattura.

5. Mescolare la master mix per PCR post-cattura usando un agitatore vortex per **3-5 secondi** e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
6. Etichettare un nuovo set di provette con Strips per PCR per ogni reazione PCR.
7. Aggiungere **36 µl** della master mix per PCR post-cattura nelle provette dello step 5.
8. Risospendere la sospensione di sfere con la pipetta, mescolando verso l'alto e verso il basso almeno 10 volte per garantire che siano omogenee. Aggiungere **immediatamente 14 µl** di sospensione di sfere ben miscelata in ogni provetta.
9. Mescolare con la pipetta almeno 10 volte.
10. Trasferire immediatamente nel termociclatore e iniziare il programma "PCR2 OGT".

Preparazione della libreria: Step 4

Eseguire la purificazione della PCR post-cattura

Tempo stimato: 40 min. per 8–24 campioni.

Prima dell'uso, mescolare le sfere si un agitatore vortex per almeno 1 minuto o fino a quando la soluzione di sfere è omogenea e di colore uniforme.

Per le provette per i campioni di DNA:

1. Aggiungere **45 µl** di sfere Mag-Bind TotalPure NGS omogenee a temperatura ambiente dal con biglie magnetiche post-PCR in ogni provetta per campione di DNA. Mescolare usando un agitatore vortex per risospendere le sfere e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
2. Incubare a temperatura ambiente per **5 minuti**.
3. Posizionare le provette sul supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa **3–5 minuti**).
4. Evitando il pellet di sfere, rimuovere e gettare il surnatante pulito (**~95 µl**). **Conservare le sfere contenenti il campione di DNA**.
5. Aggiungere **200 µl** di etanolo all'80% in ogni provetta senza risospendere il pellet di sfere.
6. Incubare per **30 secondi**, quindi rimuovere l'etanolo.
7. Ripetere il lavaggio (step 5 e 6) una volta, per un totale di due lavaggi.
8. Sigillare le provette e centrifugare a impulsi per raccogliere l'etanolo residuo. Rimettere le provette sul supporto magnetico per **30 secondi**. Rimuovere l'etanolo residuo con una pipetta P20.
9. Asciugare i pellet di sfere a temperatura ambiente per **1–2 minuti**.

Non far essiccare troppo in quanto farà diminuire la resa. Il pellet di sfere è asciutto quando l'aspetto della superficie cambia da lucido a opaco. Un'eccessiva essiccazione provoca la formazione di crepe nel pellet di sfere.

10. Togliere dal supporto magnetico e aggiungere **32 µl** di acqua priva di nucleasi direttamente sul pellet di sfere per eluire il campione di DNA. Mescolare usando un agitatore vortex e centrifugare a impulsi per raccogliere il contenuto.
11. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente.

Preparazione della libreria: Step 4

12. Etichettare un nuovo set di provette con Strips per PCR per gli eluati e metterle da parte fino al momento dell'utilizzo nello step 14.
13. Posizionare le provette su un supporto magnetico e attendere che la soluzione diventi pulita (circa **2-3 minuti**).
14. Trasferire **30 µl** dell'eluato contenente i prodotti della PCR amplificati purificati post-cattura nelle provette dello step 12. A questo punto è possibile gettare le provette che contengono le sfere.
15. Valutare le dimensioni del prodotto amplificato utilizzando il sistema Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape. L'elettroferogramma dovrebbe mostrare una dimensione del picco di 330-350 bp (+/- 20 bp) (Figura 6). Installare lo strumento e preparare il nastro, i campioni e il ladder seguendo le istruzioni del fabbricante.

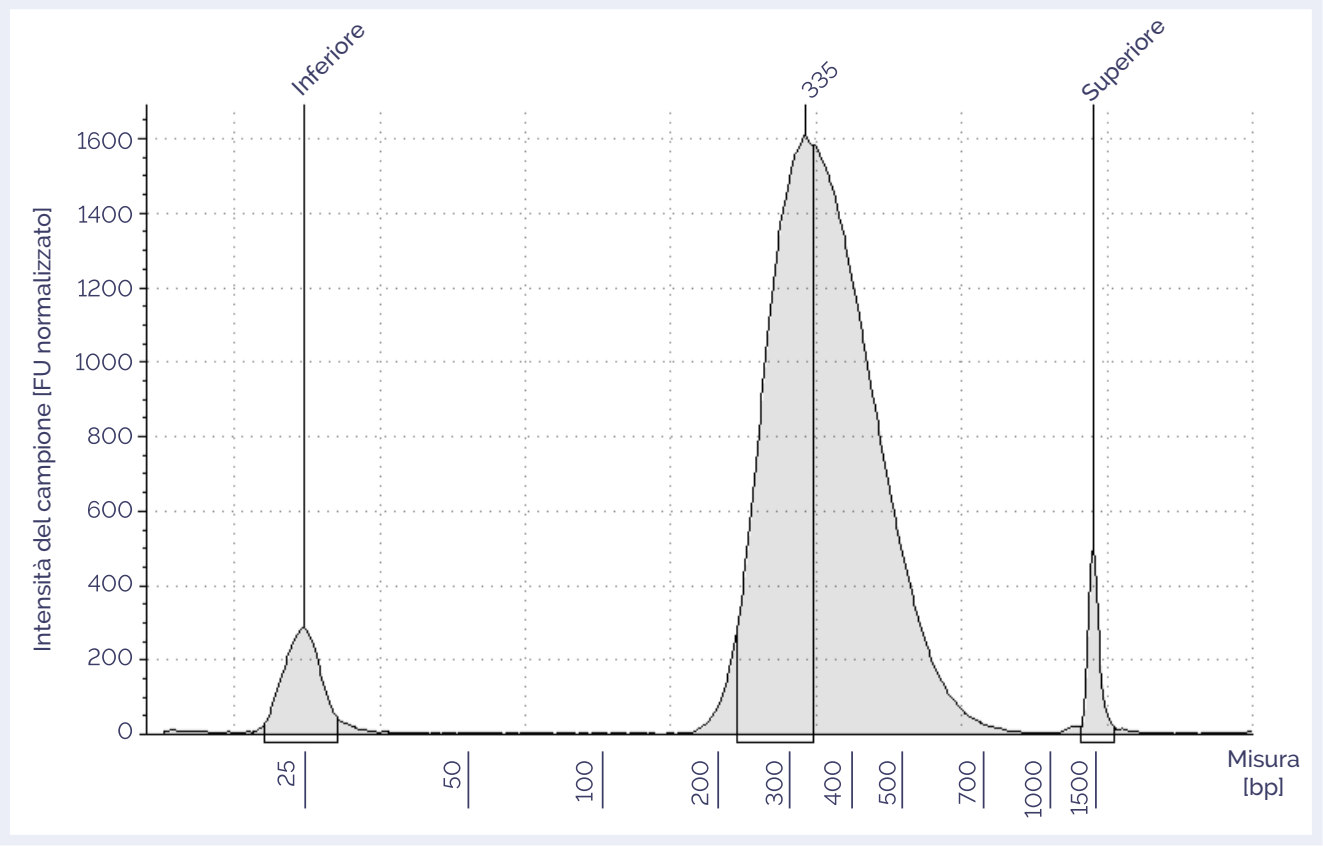


Figura 6: Elettroferogramma del prodotto PCR post-cattura purificato, generato utilizzando un dosaggio Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape. L'elettroferogramma mostra un picco massimo nell'intervallo di dimensioni di circa 330-350 bp (+/- 20 bp).

Le dimensioni dei frammenti al di fuori di questo intervallo possono ridurre la qualità dei dati della sequenza. Per ulteriori dettagli, contattare il Field Application Specialist (FAS).

Preparazione della libreria: Step 4

16. Valutare la resa utilizzando **1 µl** di prodotto amplificato con il kit HS dsDNA Qubit secondo le istruzioni del fabbricante. La resa prevista dipende dal pannello ed è compresa tra 1 e 10 ng/µl. Per ulteriori dettagli, contattare il Field Application Specialist (FAS).

STOP **PUNTO DI INTERRUZIONE FACOLTATIVO:** se i campioni non devono essere utilizzati immediatamente, conservarli a 4°C durante la notte o a -20°C per una conservazione a lungo termine. Se si continua, procedere con "Sequenziamento".

Sequenziamento

Sequenziamento

Panoramica

I pool di cattura del DNA preparati nella sezione precedente (PCR post-cattura) devono essere combinati in modo che ogni pool sia presente in quantità equimolari quando viene caricato sul sequenziatore. Ciò richiede sia la determinazione accurata della dimensione del picco (bp), fornita da Agilent TapeStation (kit ad alta sensibilità), sia la determinazione accurata della concentrazione del campione (ng/µl), fornita dal test Thermo Fisher Scientific Qubit (ad alta sensibilità).

Preparazione del pool di sequenziamento

È possibile creare un foglio di lavoro utilizzando il modello "OGT_ULPK_Worksheet" fornito da OGT. In alternativa, utilizzare le formule riportate di seguito.

1. Utilizzare il foglio di lavoro descritto in precedenza o le formule seguenti per determinare il volume (µl) di ogni pool di cattura del DNA necessario per generare il pool di sequenziamento da 4 nM.

Questo protocollo è stato convalidato con letture finali da 150 coppie di basi utilizzando MiSeq Reagent Kit v2 da 300 cicli (Illumina, n. cat. MS-102-2002) e NextSeq 550 High-Output Kit 2 x 150 bp (Illumina, n. cat. 20024908).

2. Completare le tabelle "Parametri del pool di sequenziamento" e "Campioni" nella scheda "PCR2" del modello di raggruppamento. Le celle in verde devono essere modificate manualmente secondo necessità; i parametri contrassegnati con * devono essere forniti.

Sequenziamento

3. Aggiungere il volume appropriato di ogni pool di sequenziamento indicizzato a una nuova provetta LoBind da 1,5 ml etichettata "Pool di sequenziamento da 4 nM"; i volumi si trovano nella colonna "Volume of PCR2 product to pipette" (Volume del prodotto PCR2 da pipettare) nelle schede "Volumes to pipette" (Volumi da pipettare).
4. Regolare il volume finale del pool di sequenziamento con acqua priva di nucleasi fino alla concentrazione finale desiderata (4 nM). Si trova nella colonna B delle schede "Volumes to pipette" (Volumi da pipettare) accanto a "Volume of Nuclease-free water to pipette" (Volume di acqua priva di nucleasi da pipettare).
5. Validazione della concentrazione del pool di sequenziamento: Valutare la distribuzione delle dimensioni dei picchi del pool di sequenziamento utilizzando il sistema Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape e valutare la resa utilizzando il kit HS dsDNA Qubit. Completare la scheda "Convalida e diluizione del pool" per determinare la concentrazione molare del pool di sequenziamento.

STOP **PUNTO DI INTERRUZIONE FACOLTATIVO:** se il pool di sequenziamento non deve essere utilizzato immediatamente, conservarlo a -20˚C per una conservazione a lungo termine. Se si continua, procedere con "Preparazione del file dei campioni".

6. Il pool di sequenziamento è pronto per essere caricato sul sequenziatore.

Formula: 1 nM di ogni campione

$$nM = \frac{[Concentrazione\ del\ campione\ (ng/\mu l)] \times 10^6}{([Dimensione\ del\ campione\ in\ bp] \times 660) + 157{,}9}$$

Formula 2: volume di ogni campione di DNA indicizzato

$$Volume\ del\ campione\ indicizzato = \frac{Pool\ di\ sequenziamento\ (\mu l) \times Concentrazione\ del\ pool\ (4\ nM)}{Numero\ di\ campioni\ nel\ pool \times concentrazione\ nM\ del\ campione}$$

Sequenziamento

Preparazione del file dei campioni

È possibile creare un foglio per campioni MiSeq utilizzando la guida al pooling MiSeq fornita da OGT.

1. Aprire il foglio di lavoro compilato e fare clic sulla scheda Sample Sheet (File dei campioni) pertinente.

Questo foglio verrà compilato automaticamente con i parametri e i dati del campione inseriti nei fogli "PCR1" e "PCR2".

2. Evidenziare tutte le celle che contengono testo, come mostrato nella Figura 7. Regolare il numero di righe evidenziate come opportuno.

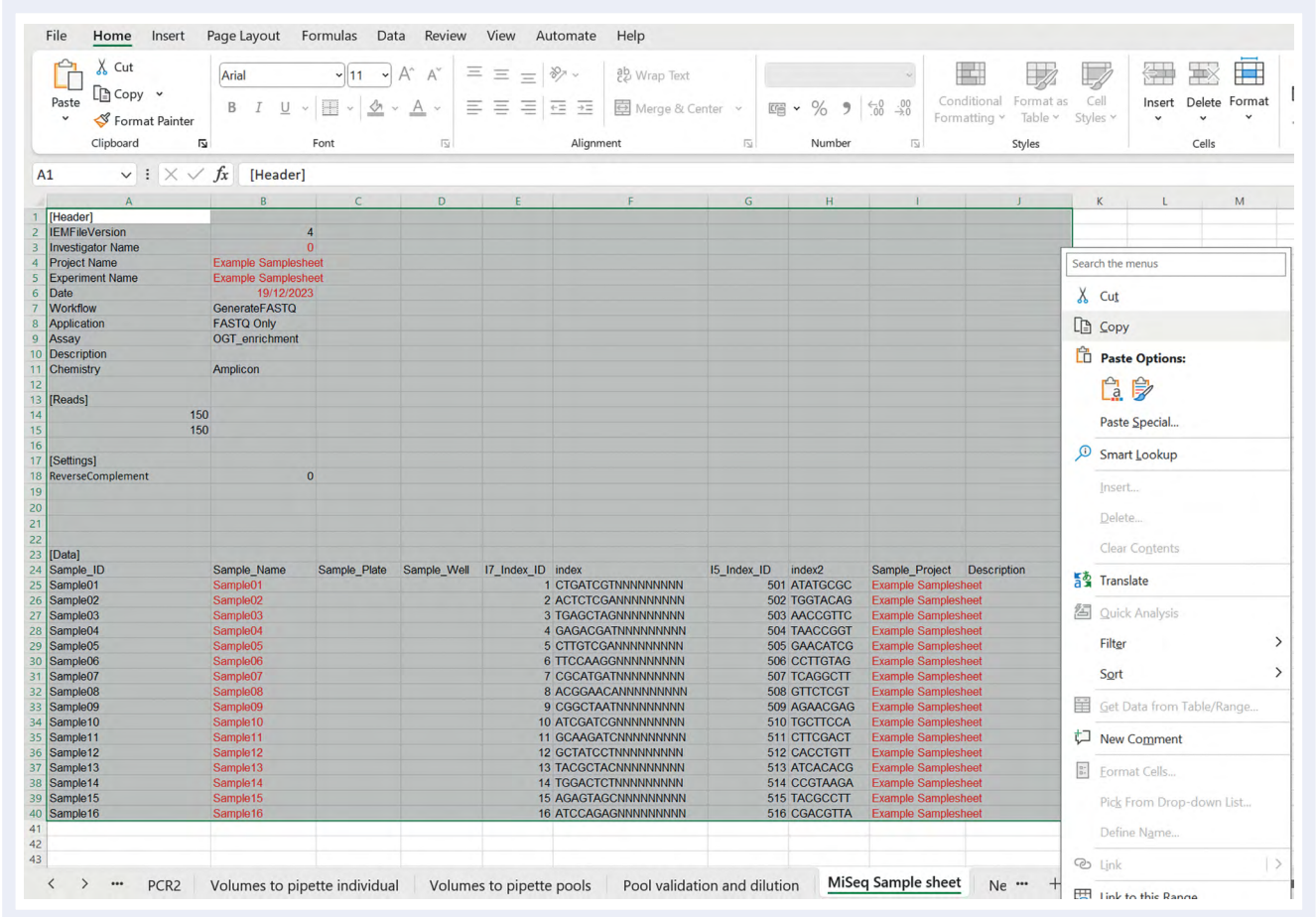


Figura 7: esempio di foglio dei campioni sul modello di pooling MiSeq.

Sequenziamento

3. Copiare le celle evidenziate e incollarle in un nuovo file Excel.

Tutto il testo in rosso è destinato all'utente e alle informazioni specifiche per il campione. Tutto il testo in nero è necessario per garantire che il sequenziatore riconosca il file.

4. Salvare il nuovo foglio come file CSV (delimitato da virgole).
5. Ora è possibile caricare il file dei campioni nel sequenziatore tramite "Manual sample sheet upload" (Caricamento manuale del file dei campioni).

STOP **PUNTO DI INTERRUZIONE FACOLTATIVO:** se il pool di sequenziamento non deve essere utilizzato immediatamente, conservarlo a -20°C per una conservazione a lungo termine. Se si continua, procedere con "Denaturing and loading the sequencing pool" (Denaturazione e caricamento del pool di sequenziamento) o consultare al protocollo Illumina appropriato.

Denaturazione e caricamento del pool di sequenziamento

1. Seguire il protocollo Illumina adeguato per denaturare il pool di sequenziamento.

Se il sequenziatore prevede un solo step di diluizione, seguire il protocollo Illumina per il caricamento. Se il sequenziatore richiede uno step di diluizione secondaria, ad esempio la diluizione del pool denaturato da 20 pM nel pool di caricamento da 12 pM su un MiSeq, continuare con lo step 2.

2. Dopo la denaturazione, aumentare il volume del pool fino a 1 ml con HT1 ghiacciato per diluire il pool denaturato a ~20 pM e mantenere in ghiaccio.

I volumi di HT1 richiesti variano a seconda del volume del pool denaturato, determinato dal tipo di sequenziatore. La concentrazione effettiva del pool di ~20 pM si trova nella scheda "Pool validation and dilution" (Convalida e diluizione del pool) nel foglio di lavoro e dipenderà dalla concentrazione del pool di sequenziamento.

3. Immettere la concentrazione di caricamento del sequenziatore richiesta nella scheda "Pool validation and dilution" (Convalida e diluizione del pool) nel foglio di lavoro.

La densità dei cluster può variare da macchinario a macchinario. Si consiglia di caricare una concentrazione finale di 8–12 pM se si utilizza un kit MiSeq V2 da 300 cicli e di 1,4 pM se si utilizza NextSeq 500/550 High-Output Kit.

4. Diluire il pool denaturato da 20 pM a questa concentrazione di caricamento pipettando i volumi indicati nella scheda "Pool validation and dilution" (Convalida e diluizione del pool) nel foglio di lavoro.

Se si effettua l'analisi con un NextSeq, il pool di sequenziamento deve essere combinato con PhiX denaturato al 5% prima dell'analisi, secondo il protocollo Illumina.

Sequenziamento

5. Pipettare il pool di caricamento nella cartuccia del sequenziatore e impostare il ciclo di sequenziamento secondo il protocollo Illumina.
6. Se si utilizza BaseSpace, selezionare "+ Custom Library Prep Kit" (+kit di preparazione personalizzato della libreria) nel menu a discesa Library Prep Kit (Kit di preparazione della libreria).
7. Utilizzare le informazioni nella Tabella 14 e nella Tabella 15 nell'Appendice per creare il "Universal NGS Library Preparation Kit" (Kit di preparazione universale della libreria NGS).
8. Ora "Universal NGS Library Preparation Kit".(Kit di preparazione universale della libreria NGS) sarà disponibile per l'uso per l'esecuzione del sequenziamento.

Appendice

Sequenze degli adattatori

Adattatore	Sequenza
1	AGATCGGAAGAGCACGACAGGTCTGAACTCCAGTCA
2	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

Tabella 14: Sequenze degli adattatori – configurazione avanzata. Si noti che alcuni strumenti di sequenziamento Illumina richiedono il complemento inverso della sequenza degli adattatori di Indice 2 (i5).

Sequenze degli indici

I7_Index_ID	Sequenza Indice 1	I5_Index_ID	Sequenza indice 2
1	CTGATCGTNNNNNNNN	501	ATATCGGC
2	ACTCTCGANNNNNNNNN	502	TGGTACAG
3	TGAGCTAGNNNNNNNNNN	503	AACCGTTC
4	GAGACGATNNNNNNNNN	504	TAACCGGT
5	CTTGTCGANNNNNNNNN	505	GAACATCG
6	TTCCAAGGNNNNNNNNN	506	CCTTGTAG
7	CGCATGATNNNNNNNNN	507	TCAGGCTT

Appendice

I7_Index_ID	Sequenza Indice 1	I5_Index_ID	Sequenza indice 2
8	ACGGAACANNNNNNNNN	508	GTTCTCGT
9	CGGCTAATNNNNNNNNN	509	AGAACGAG
10	ATCGATCGNNNNNNNNN	510	TGCTTCCA
11	GCAAGATCNNNNNNNNN	511	CTTCGATTO
12	GCTATCCTNNNNNNNNN	512	CACCTGTT
13	TACGCTACNNNNNNNN	513	ATCACACG
14	TGGACTCTNNNNNNNNNN	514	CCGTAAGA
15	AGAGTAGCNNNNNNNNN	515	TACGCCTT
16	ATCCAGAGNNNNNNNNN	516	CGACGTTA
17	GACGATCTNNNNNNNNN	517	ATGCACGA
18	AACTGAGCNNNNNNNN	518	CCTGATTG
19	CTTAGGACNNNNNNNNN	519	GTAGGAGT
20	GTGCCATANNNNNNNNN	520	AZIONE
21	GAATCCAGANNNNNNNNN	521	CACTAGCT
22	TCGCTGTTNNNNNNNNN	522	ACGACTTG
23	TTCGTTGGNNNNNNNNNN	523	CGTGTGTA
24	AAGCACTGNNNNNNNNN	524	GTTGACCT
25	CCTTGATCNNNNNNNNNN	525	ATTOCATC
26	GTCGAAGANNNNNNNNN	526	CAATGTGG
27	ACCACGATNNNNNNNNN	527	TTGCAGAC
28	GATTACCGNNNNNNNNN	528	CAGTCCAA
29	GCACAACTNNNNNNNN	529	ACGTTCAG
30	GCGTCATTNNNNNNNN	530	AACGTCTG
31	ATCCGGTANNNNNNNNN	531	TATCGGTC

Appendice

I7_Index_ID	Sequenza Indice 1	I5_Index_ID	Sequenza indice 2
32	CGTTGCAANNNNNNNNN	532	CGCTCTAT
33	GTGAAGTGNNNNNNNN	533	GATTGCTC
34	CATGGCTANNNNNNNNN	534	GATGTGTG
35	ATGCCTGTNNNNNNNNN	535	CGCAATCT
36	CAACACCTNNNNNNNN	536	TGGTAGCT
37	TGTGACTGNNNNNNNNN	537	GATAGGCT
38	GTCATCGANNNNNNNNN	538	AGTGGATC
39	AGCACTTCNNNNNNNN	539	TTGGACGT
40	GAAGGAAGNNNNNNNN	540	ATGACGTC
41	GTTGTTCGNNNNNNNNN	541	GAAGTTGG
42	CGGTTGTTNNNNNNNNN	542	CATACCA
43	ACTGAGGTNNNNNNNNN	543	CTGTTGAC
44	TGAAGACGNNNNNNNNN	544	TGGCATGT
45	GTTACGCANNNNNNNNNN	545	ATCGCCAT
46	AGCGTGTTNNNNNNNN	546	TTGCGAAG
47	GATTCGAGTNNNNNNNNN	547	AGTTCGTC
48	ACAGCTCANNNNNNNNN	548	GAGCAGTA
49	GAGCAGTANNNNNNNNN	549	ACAGCTCA
50	AGGTTCCGTCNNNNNNNNN	550	GATCGAGT
51	TTCGCAAGNNNNNNNNNN	551	AGCGTGTT
52	ATCGCCATNNNNNNNNN	552	GTTACGCA
53	TGGCATGTNNNNNNNNN	553	TGAAGACG
54	CTGTTGACNNNNNNNNN	554	ACTGAGGT
55	CATACCACNNNNNNNNN	555	CGGTTGTT

Appendice

I7_Index_ID	Sequenza Indice 1	I5_Index_ID	Sequenza indice 2
56	GAAGGTGGNNNNNNNNNN	556	GTTGTTCG
57	ATGACGTCNNNNNNNNNN	557	GAAGGAAG
58	TTGGAGGTNNNNNNNNNN	558	AGCACTTC
59	AGTGGATCNNNNNNNNN	559	GTCATCGA
60	GATAGGCTNNNNNNNNN	560	TGTGACTG
61	TGGTAGCTNNNNNNNNNN	561	CAACACCT
62	CGCAATCTTNNNNNNNNN	562	ATGCCTGT
63	GATGTGTGNNNNNNNNN	563	CATGGCTA
64	GATTGCTCNNNNNNNNN	564	GTGAAGTG
65	CGCTCTATNNNNNNNNN	565	CGTTGCAA
66	TATCGGTCNNNNNNNNNN	566	ATCCGGTA
67	AACGTCTGNNNNNNNNN	567	GCGTCATT
68	ACGTTCAGNNNNNNNNN	568	GCACAATTO
69	CAGTCCAANNNNNNNN	569	GATTACCO
70	TTGCAGACNNNNNNNNNN	570	ACCACGAT
71	CAATGTGGNNNNNNNNN	571	GTCGAAGA
72	ACTCCATCNNNNNNNNN	572	CCTTGATC
73	GTTGACCTNNNNNNNNN	573	AAGGCACTG
74	CGTGTGTANNNNNNNNN	574	TTCGTTGG
75	ACGACTTTGNNNNNNNNN	575	TCGCTGTT
76	CACTAGCTNNNNNNNNNN	576	GAATCCGA
77	ATTOGGAGGNNNNNNNNN	577	GTGCCATA
78	GTAGGAGTNNNNNNNNN	578	CTTAGGAC
79	CCTGATTGNNNNNNNNN	579	AACTGAGC

Appendice

I7_Index_ID	Sequenza Indice 1	I5_Index_ID	Sequenza indice 2
80	ATGCACGANNNNNNNNN	580	GACGATCT
81	CGACGTTANNNNNNNNN	581	ATCCAGAG
82	TACGCCTTNNNNNNNNNN	582	AGAGTAGC
83	CCGTAAGANNNNNNNNN	583	TGGATTOCT
84	ATCACACGNNNNNNNNN	584	TACGCTAC
85	CACCTGTTNNNNNNNN	585	GCTATCCT
86	CTTCGACTNNNNNNNN	586	GCAAGATCO
87	TGCTTCCANNNNNNNNN	587	ATCGATCG
88	AGAACGAGNNNNNNNNN	588	CGGCTAAT
89	GTTTCGTGNNNNNNNNN	589	ACGGAACA
90	TCAGGCTTNNNNNNNNN	590	CGCATGAT
91	CCTTGTAGNNNNNNNNNN	591	TTCCAAGG
92	GAACATCGNNNNNNNNN	592	CTTGTCGA
93	TAACCGGTNNNNNNNNN	593	GAGAGAGA
94	AACCGTTCNNNNNNNNNN	594	TAGGAGCTAG
95	TGGTACAGNNNNNNNNN	595	ACTTCGA
96	ATATGCGCNNNNNNNNN	596	CTGATCGT

Tabella 15: sequenze degli indici. N indica UMI. Si noti che alcuni strumenti di sequenziamento Illumina richiedono il complemento inverso della sequenza degli adattatori di Indice 2 (i5).

Appendice

Linee guida consigliate per il sequenziamento

Pannello	Piattaforma di sequenziamento consigliata	Numero di campioni per Corsa di sequenziamento	Proposta per le dimensioni del pool	Dimensioni del kit consigliate per l'acquisto	Numero di sessioni in base alle dimensioni del kit acquistato
770001 – CoreMPN	MiSeq 300 V2	48	6 x 8-plex	2 x 24 reazioni	1 corsa
				1 x 96 reazioni	2 corse
770002 – Myeloid Plus	MiSeq 300 V2	16	2 x 8-plex	2 x 24 reazioni	3 corse
				1 x 96 reazioni	6 corse
770027 – CLL+CNV v3	MiSeq 300 V2	16	2 x 8-plex	2 x 24 reazioni	3 corse
				1 x 96 reazioni	6 corse
770003 – Pan Myeloid	MiSeq 300 V2	8	1 x 8-plex	1 x 24 reazioni	3 corse
	MiSeq 600 V3	16	2 x 8-plex	2 x 24 reazioni	3 corse
				1 x 96 reazioni	6 corse
	NextSeq Mid-Output	48	6 x 8-plex	2 x 24 reazioni	1 corsa
				1 x 96 reazioni	2 corse
502003 – NGS costituzionale CytoSure	NextSeq High-Output	24	3 x 8-plex	1 x 24 reazioni	1 corsa
770007 - CytoSure Comprehensive Familial Hypercholesterolaemia (FH) NGS	MiSeq 300 V2	16	3 x 8-plex	2 x 24 reazioni e 1 x 96 reazioni	3 e 6 corse

Tabella 16: linee guida consigliate per il sequenziamento.

Appendice

Posizioni delle provette dei reagenti

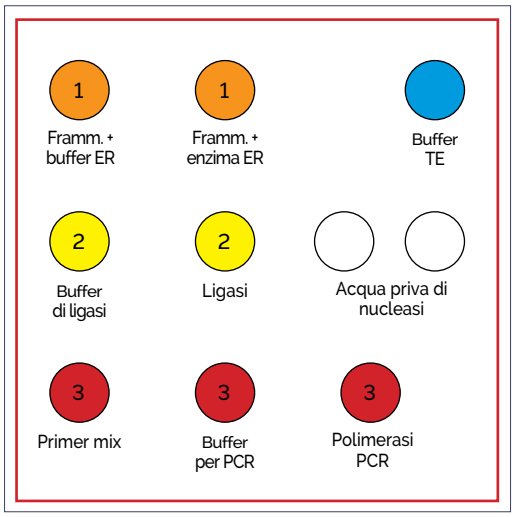


Figura 8: posizione delle provette nel kit di preparazione della libreria da 24 reazioni (770100-24).

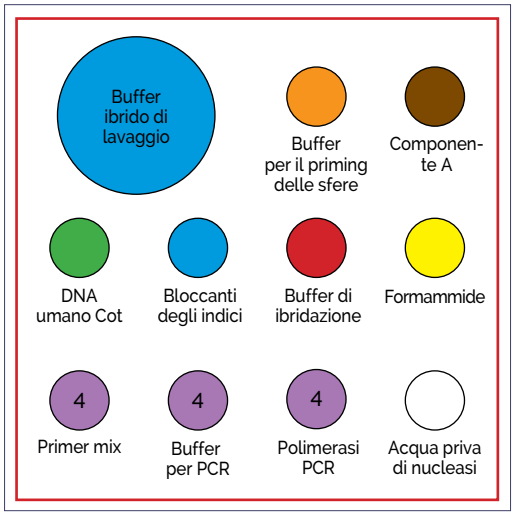


Figura 9: posizione delle provette nel kit V2 di ibridazione e lavaggio da 24 reazioni (770410-24).

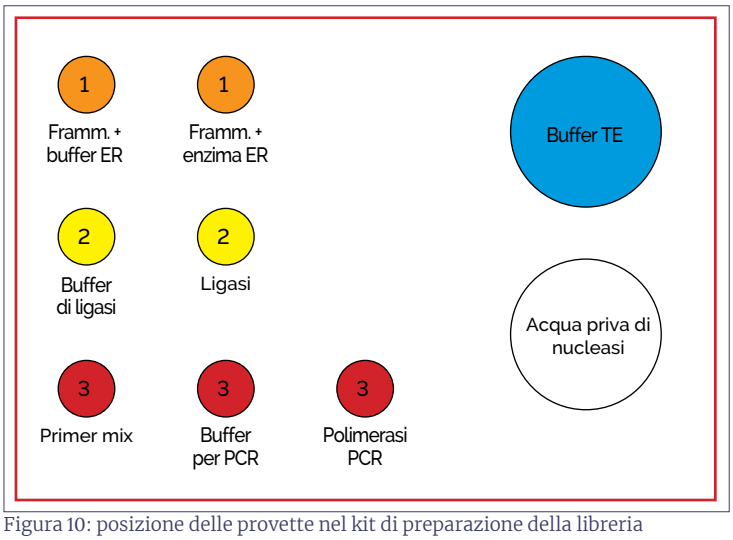


Figura 10: posizione delle provette nel kit di preparazione della libreria da 96 reazioni (770100-96).

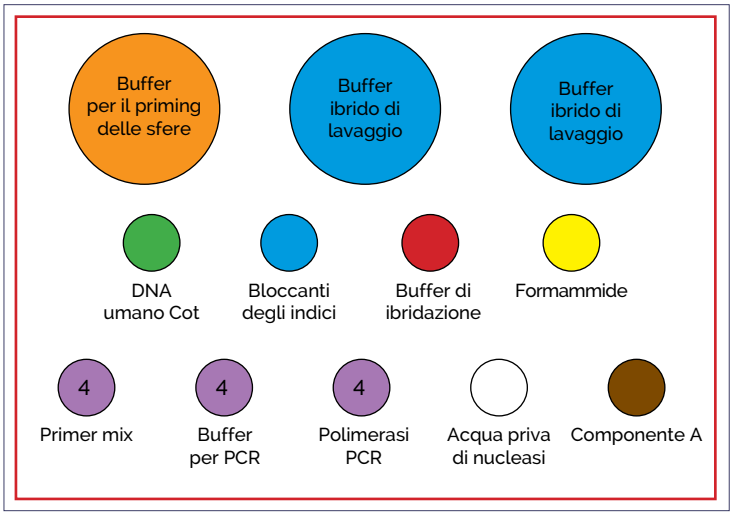


Figura 11: posizione delle provette nel kit V2 di ibridazione e lavaggio a 96 reazioni (770410-96).

Informazioni legali

Il presente manuale e il suo contenuto appartengono a © Oxford Gene Technology (Operations) Limited 2024. Tutti i diritti riservati. È vietata la riproduzione di tutto il contenuto o di una parte sostanziale in qualsiasi forma, fatta eccezione per la possibilità per i singoli utenti di stampare o salvare parti del protocollo per uso personale. Questa licenza non consente agli utenti di incorporare il materiale o una parte sostanziale in nessun altro lavoro o pubblicazione, sia in forma cartacea sia elettronica o in qualsiasi altra forma. In particolare (ma senza limitazioni), nessuna parte sostanziale del manuale può essere distribuita o copiata per scopi commerciali.

Dosaggio NGS di preparazione della libreria

Il kit di preparazione universale della libreria NGS è stato sviluppato da Oxford Gene Technology. L'acquirente ha il diritto non trasferibile di utilizzare e consumare il prodotto ESCLUSIVAMENTE PER USO DI RICERCA E NON PER PROCEDURE DIAGNOSTICHE. Non è destinato all'uso, e non deve essere utilizzato, per la diagnosi, la prevenzione, il monitoraggio, il trattamento o l'attenuazione di malattia o condizioni, né per l'indagine di alcun processo fisiologico, in alcun essere umano identificabile, né per qualsiasi altro scopo medico.

Marchi commerciali

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

Obblighi del cliente

Il Cliente riconosce che Oxford Gene Technology (Operations) Limited (o le società del suo gruppo) detiene tutti i diritti di proprietà intellettuale sulla progettazione del Prodotto, compresa la scelta e la configurazione delle sequenze oligonucleotidiche utilizzate nel Prodotto. Il Prodotto può essere riprodotto o fabbricato solo da Oxford Gene Technology (Operations) Limited o con la sua autorizzazione.

Informazioni sugli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
Soluzione Universale V2 per workflows NGS	Pacchetto con 1 kit universale di preparazione della libreria, 1 adattatori universali per indici, 1 kit universale di ibridazione e lavaggio, 1 kit universale di sfere	770510-24 770510-96

Tabella 17: informazioni sugli ordini

Per un elenco aggiornato dei prodotti e le ultime informazioni sui prodotti, visitare il sito ogt.com

Informazioni di contatto

Regno Unito: +44 (0) 1865 856826
Stati Uniti: +1 914 467 5285
Supporto tecnico: support@ogt.com
contact@ogt.com
ogt.com

Oxford Gene Technology Ltd.
Unit 5, Oxford Technology Park, 4A Technology Drive, Kidlington, Oxfordshire, OX5 1GN, Regno Unito

Una società del gruppo Sysmex

What binds us, makes us.

SureSeq™ e CytoSure®: Solo per uso di ricerca; non utilizzare nelle procedure diagnostiche. Il presente documento e il suo contenuto appartengono a © Oxford Gene Technology IP Limited – 2024. Tutti i diritti riservati. OGT™, CytoSure® and SureSeq™ sono marchi commerciali di Oxford Gene Technology IP Limited.

Oxford Gene Technology (Operations) Ltd. registrata in Inghilterra con il numero: 03845432 Unit 5, Oxford Technology Park, 4A Technology Drive, Kidlington, Oxfordshire, OX5 1GN, Regno Unito

990370 09/24