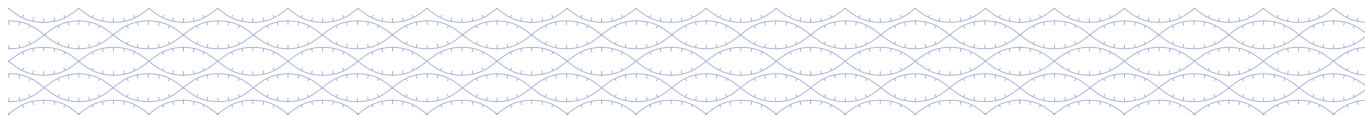
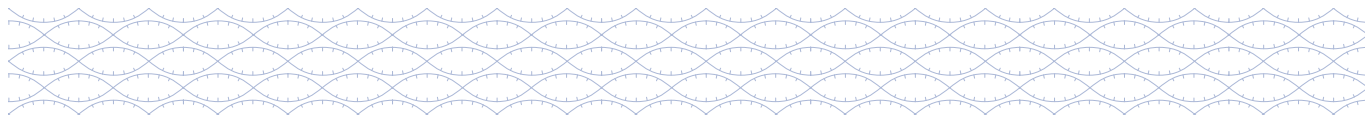


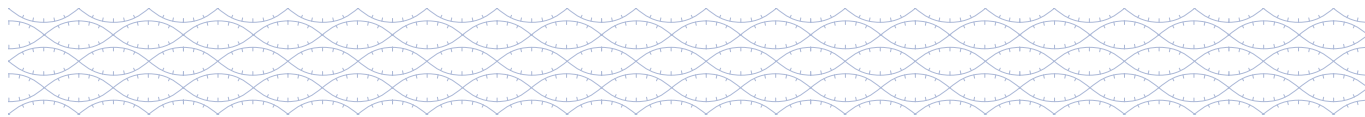
Podręcznik OGT

Rozwiązanie Universal NGS Workflow Solution V2



Spis treści





Wstęp

Rozwiązanie Universal NGS Workflow Solution V2 zostało opracowane i odpowiednio zoptymalizowane do użycia z genowymi tzw. „przynętami panelowymi” (ang. panel baits) SureSeq™ i CytoSure® zaprojektowanymi przez firmę Oxford Gene Technology (OGT) w celu zapewnienia dokładnego wykrywania szerokiego zakresu wariantów.

Technika sekwencjonowania nowej generacji (next-generation sequencing, NGS) firmy OGT jest zgodna z produktami MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ i NovaSeq™ firmy Illumina.

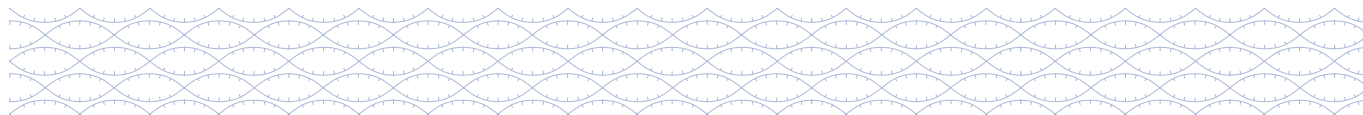
Zestaw przeznaczony do 24 reakcji zawiera ilość odczynników wystarczającą do trzykrotnego przetworzenia serii składających się z 8 próbek. Zestaw przeznaczony do 96 reakcji zawiera ilość odczynników wystarczającą do czterokrotnego przetworzenia serii składających się z 24 próbek.

Odczynniki, materiały zużywalne i sprzęt

Odczynniki dostarczane przez firmę OGT

Zawartość	Warunki transportowania/ przechowywania	Nr kat. (24 reakcje)	Nr kat. (96 reakcji)
Zestaw Universal Library Preparation Kit	Transport w temperaturze -20°C, przechowywanie w temperaturze -20°C	770100-24	770100-96
Adaptory Universal Index Adapters	Transport w temperaturze -20°C, przechowywanie w temperaturze -20°C	770200-24	770200-96
Zestaw Universal Hybridisation & Wash Kit V2	Transport w temperaturze -20°C, przechowywanie w temperaturze -20°C	770410-24	770410-96
Zestaw Pre-PCR Universal Bead Kit	Transport w temperaturze 4°C, przechowywanie w temperaturze 4°C	770310-24	770310-96
Zestaw Post-PCR Universal Bead Kit	Transport w temperaturze 4°C, przechowywanie w temperaturze 4°C	770315-24	770315-96
Panel SureSeq CLL-CNV V3 Panel			
Zestaw SureSeq Reference DNA	Transport w temperaturze -20°C, przechowywanie w temperaturze 4°C	770600	-

Zestaw Universal Library Preparation Kit
770100-24 i 770100-96Adaptory Universal Index Adapters
770200-24 i 770200-96Zestaw Universal Hybridisation & Wash Kit V2
770410-24 i 770410-96Zestaw Pre-PCR Universal Bead Kit
770310-24 i 770310-96Zestaw Post-PCR Universal Bead Kit
770315-24 i 770315-96Zestaw SureSeq Reference DNA
770600



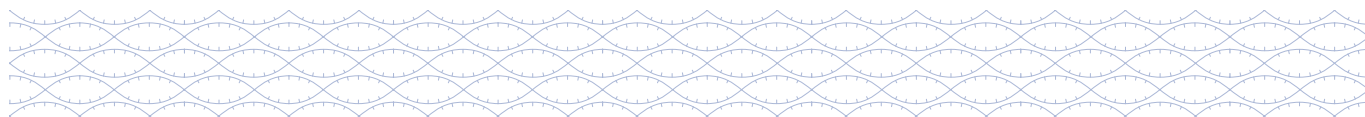
Odczynniki, materiały zużywalne i sprzęt

Odczynniki dostarczane przez użytkownika

Komponent	Sugerowany dostawca	Nr kat.*
Etanol do biologii molekularnej w stężeniu 100%	Dostawca sprzętu laboratoryjnego do ogólnego użytku	–
Woda do biologii molekularnej	Dostawca sprzętu laboratoryjnego do ogólnego użytku	–
Roztwór wodorotlenku sodu 5,0 M do biologii molekularnej	Dostawca sprzętu laboratoryjnego do ogólnego użytku	–
Zestaw Qubit® dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32854
Zestaw Qubit dsDNA Broad Range (BR) Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32853
Zestaw D1000 ScreenTape	Agilent Technologies	5067-5582
Odczynniki D1000 Reagents	Agilent Technologies	5067-5583
Zestaw High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent Technologies	5067-5584
Odczynniki High Sensitivity D1000 Reagents	Agilent Technologies	5067-5585
Zestaw MiSeq Reagent Kit V2 (300 cykli)	Illumina [†]	MS-102-2002
Zestaw MiSeq Reagent Kit V3 (600 cykli)	Illumina [†]	MS-102-3003
Zestaw NextSeq 500/550 Mid-Output Kit v2.5 (300 cykli)	Illumina [†]	20024905
Zestaw NextSeq 500/550 High-Output Kit v2.5 (300 cykli)	Illumina [†]	20024908
<i>Opcjonalnie: system Genomic DNA ScreenTape</i>	<i>Agilent Technologies</i>	<i>5067-5365</i>
<i>Opcjonalnie: odczynniki Genomic DNA Reagents</i>	<i>Agilent Technologies</i>	<i>5067-5366</i>

* Numery katalogowe są prawidłowe w przypadku Wielkiej Brytanii; mogą się różnić w innych krajach. Aby uzyskać więcej informacji, należy wystać wiadomość na adres support@ogt.com

[†] W zależności od używanego urządzenia do sekwencjonowania.



Odczynniki, materiały zużywalne i sprzęt

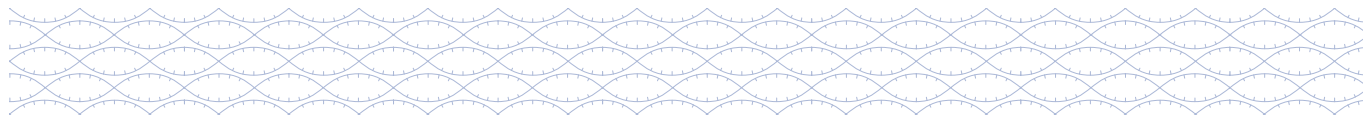
Materiały zużywalne dostarczane przez użytkownika

Komponent	Sugerowany dostawca	Nr kat.*
Probówki Qubit Assay Tubes	Thermo Fisher Scientific	Q32856
Probówki DNA LoBind® Tubes o pojemności 1,5 mL	Eppendorf	22431021
PCR-strips z przymocowanymi zatyczkami	Starlab	A1402-3700
Sterylnie końcówki do pipet z filtrami, odporne na aerozole (2, 10, 20, 200, 1000 µl)	Dostawca sprzętu laboratoryjnego do ogólnego użytku	–
Opcjonalnie: probówki o pojemności 15 mL lub 50 mL	Dostawca sprzętu laboratoryjnego do ogólnego użytku	–
Opcjonalnie: jednorazowe pojemniki na odczynniki	Dostawca sprzętu laboratoryjnego do ogólnego użytku	–

Sprzęt dostarczany przez użytkownika

Komponent	Etap użycia	Sugerowany dostawca	Nr kat.*
System 4200 TapeStation® firmy Agilent®	Po PCR	Agilent Technologies	G2991BA
2 x termocykler (96-dotkowy) z podgrzewaną pokrywą	Przed i po PCR	Dostawcy sprzętu laboratoryjnego do ogólnego użytku	–
Wytrząsarka laboratoryjna typu vortex — firma OGT zaleca wytrząsarkę cyfrową IKA™ MS 3 Digital	Przed i po PCR	IKA	IKA 0003319000
Adapter płytki do wytrząsarki typu vortex — firma OGT zaleca platformę do miareczkowania MS 3.4 firmy IKA	Po PCR	IKA	IKA 0003426400
Mikrowirówka do standardowych probówek o pojemności 1,5 mL i 8-probówkowych pasków do PCR	Przed i po PCR	Dostawca sprzętu laboratoryjnego do ogólnego użytku	–
Magnes do płytki 96-mikrodotkowej — firma OGT zaleca magnes DynaMag™-96 Side Magnet	Przed i po PCR	Thermo Fisher Scientific	12331D
Magnes do probówek o pojemności 1,5 mL — firma OGT zaleca magnes DynaMag-2 Magnet	Po PCR	Thermo Fisher Scientific	12321D
Fluorometr (Qubit 4)	Przed i po PCR	Thermo Fisher Scientific	Q33238
Spektrofotometr NanoDrop™ (spektrofotometr UV-Vis do pomiaru jednoobjętościowego)	Przed PCR	Thermo Fisher Scientific	ND-ONE-W
Pipeta 8-kanalowa o pojemności 20–200 µL i 1–10 µL	Przed i po PCR	Dostawca sprzętu laboratoryjnego do ogólnego użytku	–
Produkty MiniSeq, MiSeq, NextSeq lub NovaSeq firmy Illumina	Po PCR	Illumina	–

* Numery katalogowe są prawidłowe w przypadku Wielkiej Brytanii; mogą się różnić w innych krajach. Aby uzyskać więcej informacji, należy wystać wiadomość na adres support@ogt.com



Ogólne wytyczne

Zalecenia przed rozpoczęciem



Aby uzyskać najlepsze wyniki, firma OGT zaleca wykonywanie wszystkich etapów procedury w probówkach do PCR w paskach z przymocowanymi zatyczkami.

Zdecydowanie zalecane jest, aby sprawdzić warunki hybrydyzacji (termocykler i wyroby z tworzyw sztucznych) w celu zapewnienia jak najmniejszego parowania podczas nocnej inkubacji:

- Aby wykonać test, należy dodać po 17 μ L wody wolnej od nukleaz (bez DNA) do każdego używanego dołka i ustawić termocykler zgodnie z parametrami wskazanymi w Tabeli 9.
- Po nocnej inkubacji sprawdzić, czy ilość wyparowanego płynu nie przekroczyła 1–2 μ L na probówkę.
- W razie potrzeby dostosować ustawienia pokryw termocyklera i/lub zastosować przekładki odpowiednie dla danego modelu termocyklera.

Podczas całej procedury należy używać świeżego roztworu etanolu w stężeniu 80% przygotowanego przy użyciu etanolu do biologii molekularnej oraz wody do biologii molekularnej.

W razie potrzeby kulki Mag-Bind® TotalPure NGS i kulki magnetyczne Dynabeads™ M-270 Streptavidin należy przenieść z miejsca przechowywania 30 minut przed użyciem, aby mogły osiągnąć temperaturę pokojową.

Przechowywanie i używanie produktów

Zestaw należy zużyć przed upływem terminu ważności podanego na etykiecie zestawu.

Zestaw Universal Library Preparation Kit, adaptory Universal Index Adapters, panele SureSeq i NGS Constitutional Panels i zestaw Universal Hybridisation & Wash Kit V2 należy przechowywać w temperaturze -20°C .

Zestawy SureSeq Reference DNA, Pre-PCR i Post-PCR Universal Bead Kit należy przechowywać w temperaturze 4°C .

Ogólne wytyczne

Bezpieczeństwo

Przynęty panelowe firmy OGT powinny być używane wyłącznie przez przeszkolony personel laboratoryjny wyposażony w odpowiedni sprzęt ochronny, taki jak fartuchy laboratoryjne, okulary ochronne i rękawiczki, zgodnie z dobrą praktyką laboratoryjną.

Zestaw Universal Hybridisation & Wash Kit V2 zawiera środki chemiczne, które w przypadku nieprawidłowego użycia są potencjalnie niebezpieczne. Szczególną ostrożność należy zachować w przypadku formamidu i buforu hybrydyzacyjnego.

Przed wykonaniem protokołu należy upewnić się, że wszyscy użytkownicy zapoznali się z kartami charakterystyki substancji niebezpiecznych (safety data sheets, SDS) oraz odpowiednimi ocenami ryzyka.

Legenda symboli

Symbol	Definicja
	Ważne informacje: w przypadku tych uwag bardzo ważne jest, aby je przeczytać, zrozumieć i ściśle ich przestrzegać.
	Wskazówka umożliwiająca zaoszczędzenie czasu: opcjonalna sugestia służąca do zwiększenia efektywności protokołu.
	Krok: zimny: w przypadku tych kroków wszystkie komponenty należy trzymać na lodzie.
	Krok: na magnesie: w przypadku tych kroków wszystkie próbki powinny być umieszczone na magnesie.
	Informacje dotyczące sekwencjonowania: w przypadku tych uwag bardzo ważne jest, aby je przeczytać, zrozumieć i ściśle ich przestrzegać w celu optymalnego załadowania cyklu sekwencjonowania.
	Punkt bezpiecznego zatrzymania: na tym etapie próbki można bezpiecznie przechowywać bez wpływu na wyniki.

Przeznaczenie

Opisywane produkty są przeznaczone wyłącznie do użytku badawczego. Rozwiązanie Universal NGS Workflow Solution jest przeznaczone do stosowania przez odpowiednio przeszkolony personel, wykorzystujący DNA wyizolowany z różnych tkanek, w tym krwi i szpiku kostnego.

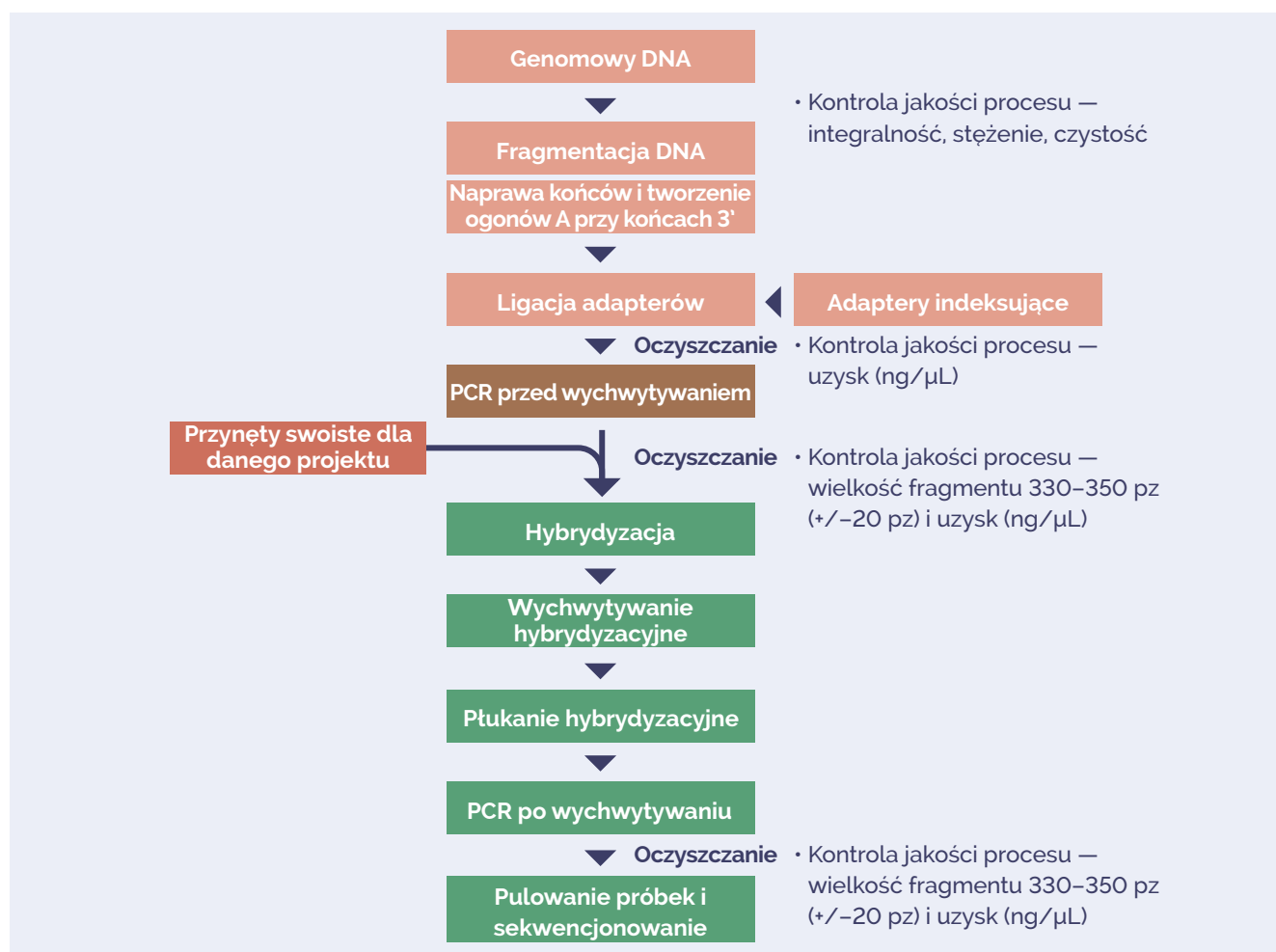
Oprogramowanie Interpret NGS Analysis Software

Pliki FASTQ zawierające dane surowe, które zostały wygenerowane przez sekwenatory firmy Illumina, można analizować przy użyciu oprogramowania Interpret NGS Analysis Software i przekształcać w interaktywne raporty do analizy NGS. Oprogramowanie to zaawansowany, samodzielny pakiet do analizy danych firmy OGT, dostarczany w zestawie.

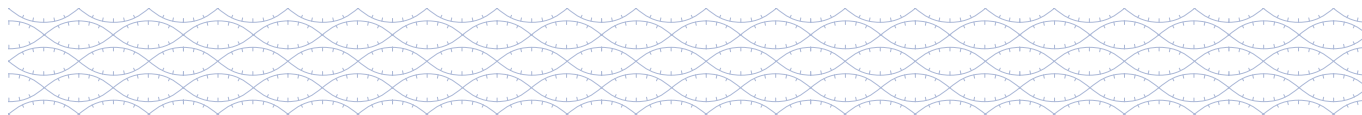
Przegląd procedury

Informacje na temat zamawiania produktów firmy OGT można znaleźć na stronie www.ogt.com.

Poniższe sekcje zawierają instrukcje dotyczące tworzenia bibliotek próbek odpowiednich dla platformy do sekwencjonowania firmy Illumina. Dla każdej próbki biblioteka jest przygotowywana oddzielnie. Każda próbka jest oznaczona sekwencją indeksującą (kodem kreskowym) oraz unikalnym identyfikatorem molekularnym (unique molecular identifier, UMI) w celu korekcji błędów i zwiększenia dokładności podczas sekwencjonowania. Próbkę są amplifikowane i łączone w pule po osiem. Każda pula jest hybrydyzowana do przynęt swoistych dla danego projektu, wychwytywana, a następnie amplifikowana i gotowa do sekwencjonowania.



Rysunek 1: Schemat przebiegu przygotowania biblioteki próbek, wskazujący oczekiwaną wielkość fragmentu DNA na każdym etapie procedury.



Wymagania dotyczące próbek

Wymagania dotyczące próbek

DNA: protokół został zoptymalizowany dla wejściowej ilości DNA wynoszącej 200–500 ng.

W przypadku panelu SureSeq CLL + CNV V3 Panel firmy SureSeq: należy uwzględnić 500 ng odczynnika SureSeq Reference Female oraz 500 ng odczynnika SureSeq Reference Male z zestawu SureSeq Reference DNA Kit. Na pulę hybrydyzacyjną



Zmiana zalecanej wejściowej ilości DNA będzie miała wpływ na wyniki dalszego sekwencjonowania.

wymagana jest jedna próbka referencyjna, przy czym w przypadku cyklu MiSeq obejmującego 16 próbek wymagane są łącznie dwie próbki.

DNA — przygotowanie próbki

Przed rozpoczęciem protokołu konieczne jest określenie stężenia gDNA w każdej próbce.

Ocena integralności i czystości DNA jest opcjonalna, ale zalecana.

Do oceny integralności, stężenia i czystości próbki zalecane jest zastosowanie poniższych produktów:

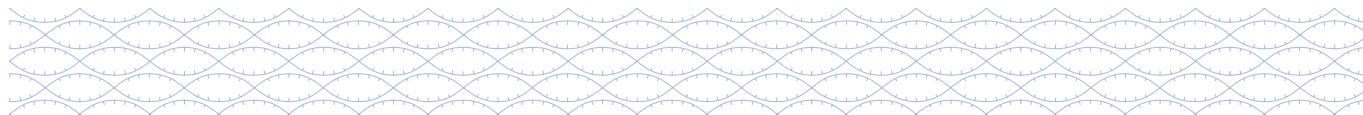
- Stężenie: Qubit firmy Thermo Fisher
- Integralność DNA: 4200 TapeStation firmy Agilent
- Czystość: NanoDrop firmy Thermo Scientific

Stężenie DNA — zestaw Qubit dsDNA HS Assay Kit

Należy zapoznać się z zapewnionym przez producenta podręcznikiem użytkownika oznaczenia Qubit firmy Thermo Fisher Scientific.

Najważniejsze kroki opisano poniżej:

1. Przygotować roztwór roboczy Qubit, rozcieńczając odczynnik Qubit w stosunku 1:200 w buforze Qubit.
2. Odmierzyć 190 μ L roztworu roboczego Qubit dla obu wzorców.
3. Dodać po 10 μ L każdego wzorca Qubit do odpowiedniej probówki.
4. Dla każdej badanej próbki odmierzyć 199 μ L roztworu roboczego Qubit.
5. Dodać 1 μ L próbki do odpowiedniej probówki.



Wymagania dotyczące próbek



Próbki o wejściowym stężeniu DNA wynoszącym >100 ng/ μ L należy wstępnie rozcieńczyć do stężenia 20–100 ng/ μ L przy użyciu buforu TE Buffer (dołączonego do zestawu). Potwierdzić stężenie DNA przy użyciu zestawu Qubit dsDNA HS Assay Kit. Dokładne oznaczenie ilościowe wejściowego DNA jest niezbędne dla uzyskania powtarzalnych wyników podczas fragmentacji.

6. Mieszać, delikatnie wytrząsając, przez 2–3 s; uważać, aby nie wytworzyły się pęcherzyki powietrza.
7. Inkubować próbki w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
8. Zmierzyć i zapisać stężenia DNA, postępując zgodnie z instrukcjami wyświetlanymi na ekranie.

Integralność DNA — system Genomic DNA ScreenTape

Opcjonalnie: Ten krok jest ważny, ponieważ umożliwia ocenę ewentualnego poziomu degradacji DNA.

Należy zapoznać się z zapewnionym przez producenta podręcznikiem użytkownika systemu 4200 TapeStation firmy Agilent. Najważniejsze kroki opisano poniżej:

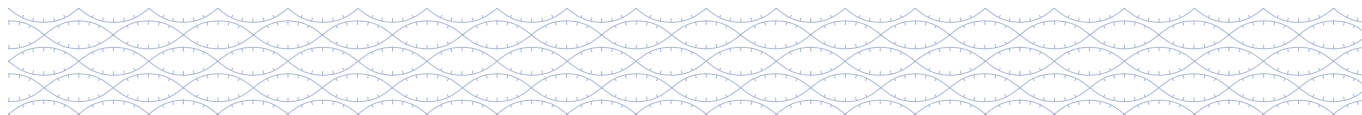
1. Przygotować drabinkę, mieszając 10 μ L buforu Genomic DNA Sample Buffer i 1 μ L drabinki Genomic DNA Ladder w pierwszej próbce paska lub pierwszym dołku płytki.

Uwaga: Do każdego cyklu wymagana jest drabinka. W przypadku oznaczeń genomowego DNA nie są dostępne drabinki elektroniczne.

2. W przypadku każdej badanej próbki dodać po 1 μ L próbki DNA do 10 μ L buforu do próbek.
3. Szczelnie zamknąć wszystkie próbki/dołki.
4. Wytrząsać próbki lub płytkę przez 1 minutę przy 2000 obr./min, a następnie krótko odwirować, aby zebrać płyn na dnie.
5. Krótko odwirować do pełnego zatrzymania, aby zebrać próbkę na dnie próbek/dołków.
6. Załadować pasek próbek lub płytkę do systemu TapeStation 4200 firmy Agilent.

Uwaga: W przypadku stosowania próbek w paskach należy pamiętać o zdjęciu zatyczek.

7. Zaznaczyć wymagane próbki w oprogramowaniu kontrolera i wprowadzić nazwy próbek w arkuszu próbek.
8. Wprowadzić nazwę pliku w polu „Prefix” (Przedrostek) w oprogramowaniu kontrolera, aby zapisać wyniki, i wybrać przycisk „Start”.



Wymagania dotyczące próbek

9. Sprawdzić, czy elektroforegram wskazuje na zachowanie integralności gDNA, przy równomiernym rozkładzie i maksymalnym rozmiarze pików >5000 pz.
10. Po elektroforezie DNA przy użyciu systemu 4200 TapeStation firmy Agilent generowany jest wskaźnik integralności DNA (DNA Integrity Number, DIN). Wskaźnik DIN >7 oznacza obecność nienaruszonego DNA, natomiast wskaźnik DIN <7 oznacza, że doszło do degradacji DNA. Jeśli dla próbki uzyskano wskaźnik DIN <7, należy skontaktować się z lokalnym specjalistą ds. aplikacyjnych.

Czystość — spektrofotometr NanoDrop

Opcjonalnie: Ten krok jest ważny, ponieważ umożliwia ocenę czystości próbki DNA.

Należy zapoznać się z zapewnionym przez producenta podręcznikiem użytkownika spektrofotometru NanoDrop.

Najważniejsze kroki opisano poniżej:

1. Użyć ustawień „Nucleic Acid” (Kwas nukleinowy) i „DNA-50”.
2. Wyczyścić końcówkę pomiarową wodą wolną od nukleaz.
3. Nanieść 1–2 µL buforu do próbek lub roztworu próby ślepej.
4. Kliknąć opcję „Measure blank” (Pomiar próby ślepej).
5. Wyczyścić końcówkę pomiarową przy użyciu niestrzępiącej się ściereczki.
6. Nanieść 1–2 µL każdej próbki na końcówkę pomiarową.
7. Kliknąć opcję „Measure” (Pomiar).
8. Zanotować odczyty przy 260/230, 260/280 nm i stężenie (ng/µL).

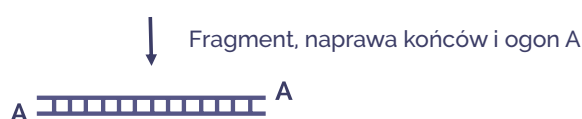
Zalecany stosunek OD przy 260/280 nm wynosi 1,8 do 2,0, a stosunek OD przy 260/230 nm wynosi 2,0 do 2,2. Użycie próbek DNA o niższych wartościach stosunków może skutkować słabą wydajnością.

W przypadku jakichkolwiek pytań dotyczących jakości badanych próbek należy skontaktować się z lokalnym specjalistą ds. aplikacyjnych firmy OGT.

Przygotowanie biblioteki: Krok 1

Fragmentacja DNA, naprawa końców i tworzenie ogonów A przy końcach 3'

Genomowy DNA



Informacje ogólne

Genomowy DNA jest poddawany fragmentacji enzymatycznej. Pofragmentowany dsDNA jest naprawiany za pomocą enzymów zawartych w mieszaninie do fragmentacji i naprawy końców (end repair, ER), dzięki czemu powstają tępe końce. Jednocześnie w celu przygotowania do ligacji adapterów na końcach 3' dodawane są dodatkowe nukleotydy adeninowe.

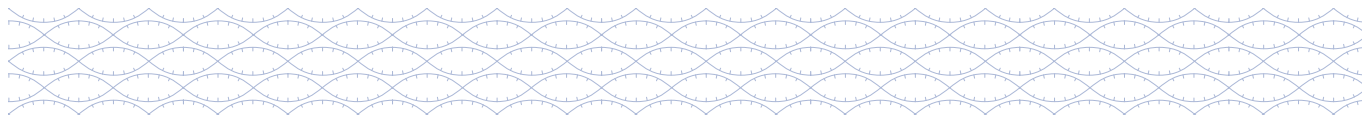
Przed rozpoczęciem:

- ❄ Wyjąć bufor TE Buffer (niebieska zatyczka; ●) z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C). Pozostawić do rozmrożenia i osiągnięcia temperatury pokojowej, a następnie umieścić na lodzie.



Do przygotowania próbek DNA należy używać wyłącznie buforu TE Buffer (niebieska zatyczka; ●) dostarczonego z zestawem (10 mM Tris, 1 mM EDTA). Stosowanie innych preparatów TE (np. 0,1x TE) lub wody może mieć wpływ na wyniki fragmentacji.

- ❄ Wyjąć odczynnik Krok 1: Frag + ER Buffer (pomarańczowa zatyczka; ●) z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C). Pozostawić do rozmrożenia i osiągnięcia temperatury pokojowej, a następnie umieścić na lodzie. Upewnić się, że doszło do rozpuszczenia wszystkich składników buforu.
W buforze może dochodzić do wytrącania się osadu. W takim przypadku należy kilkukrotnie pipetować bufor, aby rozbić osad, a następnie krótko go wytrząsać do rozpuszczenia osadu. Jeśli osad nadal występuje, należy unikać pipetowania go do mieszaniny Master Mix.
- ❄ Wyjąć odczynnik Krok 1: Frag + ER Enzyme (pomarańczowa zatyczka; ●) z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C) i umieścić na lodzie.
- Upewnić się, że próbka DNA została wstępnie rozcieńczona do stężenia 20–100 ng/ μL przy użyciu buforu TE Buffer (niebieska zatyczka; ●).



Przygotowanie biblioteki: Krok 1

Wykonanie kroku 1: Fragmentacja DNA, naprawa końców i tworzenie ogonów A przy końcach 3'

Szacowany czas: 1,25 godz. dla 8–24 próbek. Czas pracy użytkownika: 15 min.

1. Zaprogramować termocykler, korzystając z ustawień przedstawionych w Tabeli 1. Zapisać program jako „OGT Fragmentation” (Fragmentacja OGT).

Krok	Temperatura (°C)	Czas
1	37	20 min
2	65	30 min
3	4	Wstrzymanie

Tabela 1: Profil inkubacji w programie „OGT Fragmentation” (Fragmentacja OGT).

2. **Podgrzać** termocykler do temperatury 37°C. Jeśli to możliwe, ustawić podgrzewaną pokrywę na temperaturę 75°C; alternatywnie, aktywować wstępnie ustawioną podgrzewaną pokrywę.
- ❄ 3. W próbkach w pasku do PCR rozcieńczyć **200–500 ng** próbki DNA przy użyciu schłodzonego buforu TE Buffer (niebieska zatyczka; ●) do uzyskania całkowitej objętości wynoszącej **26,5 µL**. Mieszać na wytrząsarce przez **3–5 s**, odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości i umieścić na lodzie.

W przypadku panelu SureSeq CLL + CNV V3: Przygotować 1 x 500 ng odczynnika Human Reference DNA Female i 1 x 500 ng odczynnika Human Reference DNA Male, aby uzyskać łączną objętość **26,5 µL** dla każdej serii po 16 próbek. Przetworzyć dwie próbki referencyjne równolegle z 14 próbkami badanymi.

- ❄ 4. Oznaczyć nowy zestaw pasków próbek do PCR dla próbki i umieścić na lodzie.
- ❄ 5. Mieszać odczynniki Step 1: Frag + ER Buffer i Step 1: Frag + ER Enzyme na wytrząsarce przez **5–8 s**. Odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości i umieścić na lodzie.



Dokładne wymieszanie odczynnika Frag + ER Enzyme jest konieczne do osiągnięcia optymalnej wydajności analizy.

Przygotowanie biblioteki: Krok 1

- ❄ 6. Przygotować mieszaninę Fragmentation and ER Master Mix zgodnie z parametrami podanymi w Tabeli 2 w świeżej probówce LoBind o pojemności 1,5 mL i umieścić ją na lodzie.

Odczynnik	Biblioteka 1x (μL)	Biblioteka 8x (μL) (z nadatkiem 2)	Biblioteka 16x (μL) (z nadatkiem 2)	Biblioteka 24x (μL) (z nadatkiem 3)
Próbka DNA	26,5	–	–	–
Krok 1: Frag + ER Buffer (pomarańczowa zatyczka; ●)	7	70	126	189
Krok 1: Frag + ER Enzyme (pomarańczowa zatyczka; ●)	1,5	15	27	40,5
ŁĄCZNIE	35	85	153	229,5

Tabela 2: Mieszanina Fragmentation and ER Master Mix.

- ❄ 7. Mieszać mieszaninę Fragmentation and ER Master Mix na wytrząsarce przez **3–5 s**, odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości i trzymać na lodzie.
- ❄ 8. Dodać po **8,5 μL** mieszaniny Fragmentation and ER Master Mix do poszczególnych pustych probówek przygotowanych w kroku 4 i trzymać na lodzie.
- ❄ 9. Dodać **26,5 μL** próbki DNA z kroku 3 do probówek z kroku 4 przy użyciu pipety wielokanałowej.



Aby uniknąć nadmiernej fragmentacji, należy postępować dość szybko, ponieważ enzym jest aktywny w temperaturze pokojowej. Trzymać próbki na lodzie, gdy nie są wytrząsane lub odwirowywane.

10. **Natychmiast** wymieszać na wytrząsarce (przez **3 s**).
11. Odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości i **natychmiast** przenieść do **podgrzanego** termocyklera. Uruchomić program „OGT Fragmentation” (Fragmentacja OGT).



Zalecenie: Przygotować mieszaninę Ligation Master Mix w ciągu ostatnich 10 minut programu termocyklera.

12. Po zakończeniu programu i ochłodzeniu termocyklera do temperatury 4°C wyjąć próbki i umieścić je na lodzie, aż do przejścia do etapu ligacji adapterów.

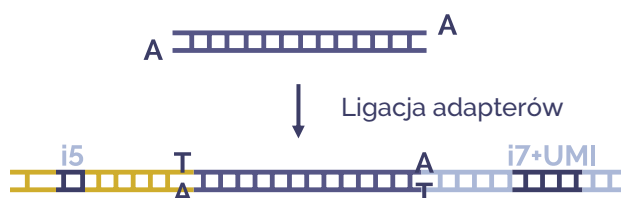


Zalecane jest, aby natychmiast przejść do „Kroku 2: Ligacja adapterów i oczyszczanie”. W razie potrzeby próbki można przechowywać w temperaturze –20°C, jednak uzysk może być mniejszy (~20%).

Przygotowanie biblioteki: Krok 2

Ligacja adapterów i oczyszczanie

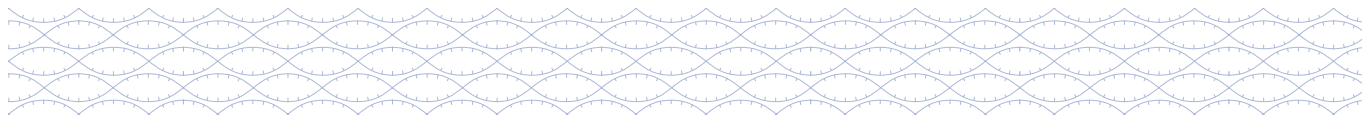
Informacje ogólne



Kompatybilne sekwencje adapterów firmy Illumina są poddawane ligacji do fragmentów dsDNA przy użyciu dodatkowych nukleotydów dodanych na końcach 3' podczas naprawiania końców / tworzenia ogonów A i ligazy DNA. Adaptery zawierają sekwencje unikalnych identyfikatorów molekularnych (unique molecular identifier, UMI) oraz unikalne indeksy próbek.

Przed rozpoczęciem:

- Wyjąć kulki Mag-Bind TotalPure NGS z zestawu Pre-PCR Universal Bead Kit z lodówki co najmniej **30 min przed użyciem**, aby mogły osiągnąć temperaturę pokojową.
- Przygotować świeży roztwór etanolu w stężeniu 80% przy użyciu etanolu do biologii molekularnej oraz wody do biologii molekularnej.
- Wyjąć bufor Step 2: Ligation Buffer (żółta zatyczka; ●) z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C) i rozmrozić do temperatury pokojowej. Upewnić się, że doszło do rozpuszczenia wszystkich składników buforu Ligase Buffer. W razie potrzeby inkubować w temperaturze 37°C do rozpuszczenia.
- ❄ • Wyjąć odczynnik Step 2: Ligase (żółta zatyczka; ●) z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C) i umieścić na lodzie.
- ❄ • Wyjąć płytkę Universal Index Adapter Plate z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C) **5–10 min przed użyciem** i pozostawić do rozmrożenia na lodzie. Odwirować pulsacyjnie płytkę z adapterami w wirówce, aby zebrać jej zawartość. Cały czas trzymać płytkę na lodzie. Nie podgrzewać do temperatury przewyższającej temperaturę pokojową.
- Adaptery Index Adapter są przeznaczone wyłącznie do jednorazowego użytku. Jeżeli wykorzystywana jest tylko część płytki, należy przykryć wykorzystywane dołki z adapterami, aby zapobiec wylaniu nadmiaru adapterów Index Adapter. Niewykorzystane adaptery można również podzielić na porcje, umieścić w probówkach w paskach i rozmrozić bezpośrednio przed użyciem.



Przygotowanie biblioteki: Krok 2

- Przypisać każdej próbce inny adapter Index Adapter. Lokalizację adapterów Index Adapter na płycie przedstawiono na Rysunkach 2 i 3.
- Firma OGT zaleca przetwarzanie próbek w partiach po osiem, tak aby dla każdej puli przypadała jedna cała kolumna z płytki indeksów.

Wykonanie kroku 2: Ligacja

Szacowany czas: 35 min dla 8–24 próbek. Czas pracy użytkownika: 15 min.

1. Zaprogramować termocykler, korzystając z ustawień przedstawionych w Tabeli 3. Zapisać program jako „OGT Ligation” (Ligacja OGT).

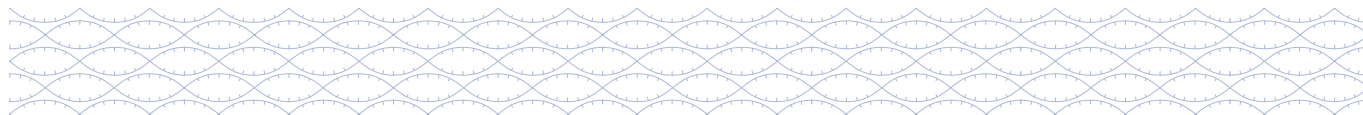


Nie używać podgrzewanej pokrywy. Jeżeli podgrzewanej pokrywy nie można wyłączyć, należy pozostawić ją otwartą.

Krok	Temperatura (°C)	Czas
1	20	20 min
2	4	Wstrzymanie

Tabela 3: Profil inkubacji w programie „OGT Ligation” (Ligacja OGT).

- ❄ 2. Mieszać odczynnik Krok 2: Ligase Buffer na wytrząsarce przez **3–5 s**, odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości i umieścić na lodzie.
- ❄ 3. Wymieszać odczynnik Krok 2: Ligase, ostukując probówkę palcem, odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości i umieścić na lodzie.



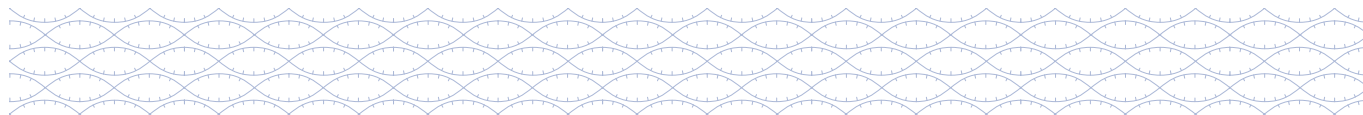
Przygotowanie biblioteki: Krok 2

- ❄ 4. Przygotować mieszaninę Ligation Master Mix zgodnie z parametrami podanymi w Tabeli 4 w świeżej probówce LoBind o pojemności 1,5 mL i umieścić ją na lodzie.

Odczynnik	Biblioteka 1x (μL)	Biblioteka 8x (μL) (z naddatkiem 2)	Biblioteka 16x (μL) (z naddatkiem 2)	Biblioteka 24x (μL) (z naddatkiem 3)
Próbka DNA	35	–	–	–
Index Adapter	2,5	–	–	–
Step 2: Ligase Buffer (żółta zatyczka; ●)	9	90	162	243
Step 2: Ligase (żółta zatyczka; ●)	2	20	36	54
ŁĄCZNIE	48,5	110	198	297

Tabela 4: Mieszanina Ligation Master Mix.

- ❄ 5. Mieszać mieszaninę Ligation Master Mix na wytrząsarce przez **3–5 s**, odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości i trzymać na lodzie.
- ❄ 6. Dodać po **11 μL** mieszaniny Ligation Master Mix do każdej schłodzonej probówki z próbką DNA zawierającą pofragmentowany produkt.
7. Dodać po **2,5 μL** adaptera Index Adapter do każdej probówki z próbką DNA z kroku 6.
8. Mieszać na wytrząsarce przez **3–5 s** i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
9. **Natychmiast** przenieść do termocyklera i uruchomić program „OGT Ligation” (Ligacja OGT).
10. Po zakończeniu programu i ochłodzeniu termocyklera do temperatury 4°C wyjąć próbki i **natychmiast przejść** do etapu „Oczyszczanie biblioteki po ligacji”.



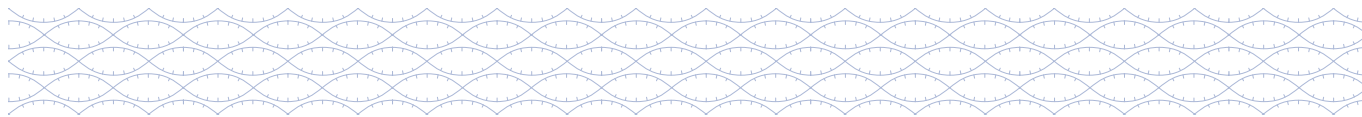
Przygotowanie biblioteki: Krok 2

	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

Rysunek 2: Układ płytki Universal Index Adapter Plate (1–24). X: pusty dołek.

	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

Rysunek 3: Układ płytki Universal Index Adapter Plate (1–96).



Przygotowanie biblioteki: Krok 2

Wykonanie oczyszczania biblioteki po ligacji

Szacowany czas pracy użytkownika: 50 min dla 8–24 próbek.



Przed użyciem należy mieszać kulki na wytrząsarce przez co najmniej 1 minutę lub do momentu, aż roztwór kulek stanie się jednorodny i będzie miał jednolity kolor.

Przed rozpoczęciem:

1. Przygotować **świeży** zestaw pasków próbek do PCR dla każdego paska próbek.
2. Dodać po **29 µL** zhomogenizowanych kulek Mag-Bind TotalPure NGS z zestawu Pre-PCR Universal Bead Kit, które wcześniej zostały doprowadzone do temperatury pokojowej, do każdej **pustej** próbówki i odstawić, dopóki nie będą potrzebne w kroku 6.

Probówki z próbkami DNA:

3. Dodać po **11 µL** zhomogenizowanych kulek Mag-Bind TotalPure NGS z zestawu Pre-PCR Universal Bead Kit, które wcześniej zostały doprowadzone do temperatury pokojowej, do każdej próbówki z próbką DNA. Wymieszać na wytrząsarce, aby zawiesić kulki, i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
4. Inkubować w temperaturze pokojowej przez **5 min**.



5. Umieścić próbówki w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. **3–5 min**).

6. Przenieść **60 µL oczyszczonego supernatantu zawierającego próbkę DNA** do próbek z kulkami przygotowanych w kroku 2. Zużyty osad z kulek można wyrzucić.

7. Wymieszać na wytrząsarce, aby zawiesić kulki, i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.

8. Inkubować w temperaturze pokojowej przez **5 min**.



9. Umieścić próbówki w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. **3–5 min**).

10. Omijając osad z kulek, usunąć i wyrzucić oczyszczony supernatant (**~88 µL**). **Zachować kulki zawierające próbkę DNA.**

11. Dodać po **200 µL** etanolu w stężeniu 80% do każdej próbówki bez ponownego zawieszania osadu z kulek.

12. Inkubować przez **30 s**, a następnie usunąć etanol.

Przygotowanie biblioteki: Krok 2

13. Jednokrotnie powtórzyć płukanie (kroki 11 i 12), aby łącznie uzyskać **dwa** płukania.
14. Szczelnie zamknąć probówki i odwirować pulsacyjnie, aby zebrać pozostały etanol. Umieścić probówki z powrotem w statywie magnetycznym. Usunąć resztki etanolu za pomocą pipety P20.
15. Suszyć osad z kulek w temperaturze pokojowej przez **1–2 min**.



W celu uniknięcia obniżenia uzysku nie należy przesuszać osadu. Osad z kulek jest suchy, gdy ich powierzchnia zmienia się z błyszczącej na matową. Przesuszenie powoduje pękanie osadu z kulek.

16. Wyjąć probówki ze statywu magnetycznego i dodać **34 µL** wody wolnej od nukleaz bezpośrednio do osadu z kulek w celu elucji próbki DNA. Wymieszać na wytrząsarce, aby zawiesić kulki, i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
17. Inkubować w temperaturze pokojowej przez **5 min**.



Zalecenie: W przypadku natychmiastowego przejścia do Kroku 3: PCR przed wychwytywaniem odczynniki Step 3: Primer Mix i Step 3: PCR Buffer można wyjąć z miejsca przechowywania i pozostawić do rozmrożenia i osiągnięcia temperatury pokojowej na tym etapie.

18. Oznaczyć nowy zestaw pasków probówek do PCR dla próbek i odłożyć, dopóki nie będą potrzebne w kroku 20.
19. Umieścić probówki w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. **2–3 min**).
20. Przenieść **32 µL** eluatu zawierającego oczyszczone, zligowane produkty do probówek z kroku 18. Na tym etapie probówki zawierające kulki można wyrzucić.
21. Ocenić uzysk przy użyciu **1 µL** zligowanych produktów i zestawu Qubit dsDNA HS Kit zgodnie z instrukcjami producenta. Oczekiwany uzysk wynosi **>2 ng/µL**.

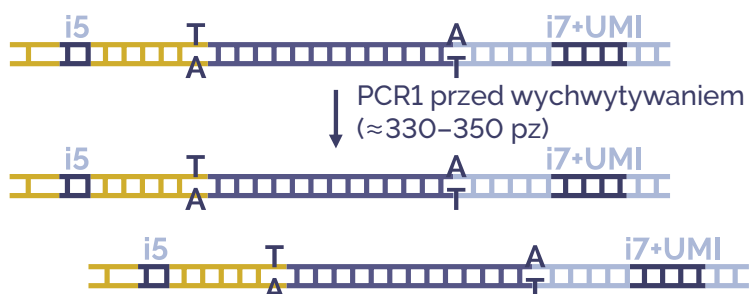


OPCJONALNY PUNKT ZATRZYMANIA: Jeśli próbki nie będą używane natychmiast, można je przechowywać w temperaturze **–20°C**. W przeciwnym razie należy przejść do etapu „PCR przed wychwytywaniem”.

Przygotowanie biblioteki: Krok 3

PCR przed wychwytywaniem

Informacje ogólne



Do amplifikacji biblioteki DNA przed hybrydyzacją i wychwytywaniem sekwencji docelowych stosuje się reakcję PCR o wysokiej dokładności (ang. high fidelity PCR). Liczba cykli reakcji PCR jest utrzymywana na minimalnym poziomie w celu ograniczenia liczby zduplikowanych odczytów (kopii z reakcji PCR tego samego oryginalnego fragmentu DNA) w danych sekwencjonowania.

Przed rozpoczęciem:

- Wyjąć odczynniki Krok 3: Primer Mix (czerwona zatyczka; ●) i Krok 3: PCR Buffer (czerwona zatyczka; ●) z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C) i pozostawić do rozmrożenia w temperaturze pokojowej.
- Upewnić się, że doszło do dokładnego rozpuszczenia wszystkich składników buforu PCR Buffer. W razie potrzeby wymieszać poprzez wytrząsanie i/lub inkubować w temperaturze 37°C do rozpuszczenia.
- ❄ • Wyjąć odczynnik Krok 3: PCR Polymerase (czerwona zatyczka; ●) z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C) i umieścić na lodzie.

Przygotowanie biblioteki: Krok 3

Wykonanie kroku 3: PCR przed wychwytywaniem

Szacowany czas: 45 min dla 8–24 próbek. Czas pracy użytkownika: 15 min.

1. Zaprogramować termocykler, korzystając z ustawień przedstawionych w Tabelach 5 i 6. Zapisać program jako „OGT PCR1”. Jeśli to możliwe, ustawić podgrzewaną pokrywę na temperaturę 105°C; alternatywnie, aktywować wstępnie ustawioną podgrzewaną pokrywę.

Krok	Temperatura (°C)	Czas
1	98	3 min
2	98	30 s
3	65	30 s
4	72	1 min
5	Powtórzyć kroki od 2 do 4 zgodnie z liczbą cykli podaną w Tabeli 6	
6	72	10 min
7	4	Wstrzymanie

Tabela 5: Profil inkubacji w programie „OGT PCR1”.

Wejściowy DNA	Łączna liczba cykli w reakcji PCR
200–350 ng	6
351–500 ng	5

Tabela 6: Łączna liczba cykli w reakcji PCR dla zalecanego zakresu wejściowego DNA.

2. Wytrząsać odczynniki krok trzeci „step 3”: Primer Mix i Step 3: PCR Buffer na wytrząsarce przez **3–5 s** i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
- ❄ 3. Wymieszać odczynnik krok trzeci „step 3”: PCR Polymerase, ostukując probówkę palcem, odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości i trzymać na lodzie.

Przygotowanie biblioteki: Krok 3

- Przygotować mieszaninę Pre-capture PCR Master Mix zgodnie z parametrami podanymi w Tabeli 7 w świeżej próbówce LoBind o pojemności 1,5 mL.

Odczynnik	Biblioteka 1x (μL)	Biblioteka 8x (μL) (z nadatkiem 2)	Biblioteka 16x (μL) (z nadatkiem 2)	Biblioteka 24x (μL) (z nadatkiem 3)
Próbka DNA ze zligowanymi adapterami	31	–	–	–
Woda wolna od nukleaz (przezroczysta zatyczka; ○)	9,5	95	171	256,5
Krok trzeci „step 3”: PCR Buffer (czerwona zatyczka; ●)	5	50	90	135
Krok trzeci „step 3”: Primer Mix (czerwona zatyczka; ●)	2,5	25	45	67,5
Krok trzeci „step 3”: PCR Polymerase (czerwona zatyczka; ●)	2	20	36	54
ŁĄCZNIE	50	190	342	513

Tabela 7: Mieszanina Pre-capture PCR Master Mix.

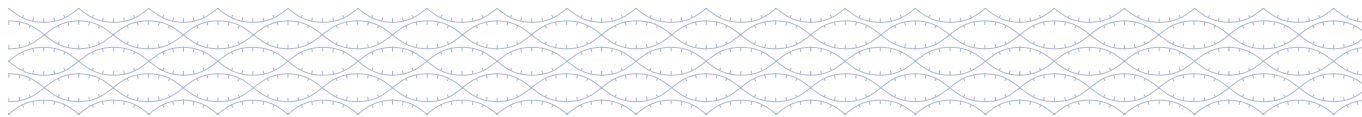
- Mieszać mieszaninę Pre-capture PCR Master Mix na wytrząsarce przez **3–5 s** i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
- Dodać po **19 μL** mieszaniny Pre-capture PCR Master Mix do każdej próbki zawierającej próbkę DNA ze zligowanymi produktami.
- Mieszać na wytrząsarce przez **3–5 s** i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
- Przenieść do termocyklera i uruchomić program „OGT PCR1”.

Wykonanie oczyszczania po reakcji PCR przed wychwytywaniem

Szacowany czas pracy użytkownika: 40 min dla 8–24 próbek.



Przed użyciem należy mieszać kulki na wytrząsarce przez co najmniej 1 minutę lub do momentu, aż roztwór kulek stanie się jednorodny i będzie miał jednolity kolor.



Przygotowanie biblioteki: Krok 3

Probówki z próbkami DNA:

1. Dodać po **45 µL** zhomogenizowanych kulek Mag-Bind TotalPure NGS z zestawu Post-PCR Universal Bead Kit, które wcześniej zostały doprowadzone do temperatury pokojowej, do każdej probówki z próbką DNA. Wymieszać na wytrząsarce, aby zawiesić kulki, i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
2. Inkubować w temperaturze pokojowej przez **5 min**.
3. Umieścić probówki w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. **3–5 min**).
4. Omijając osad z kulek, usunąć i wyrzucić oczyszczony supernatant (**~90 µL**). **Zachować kulki zawierające próbkę DNA.**
5. Dodać po **200 µL** etanolu w stężeniu 80% do każdej probówki bez ponownego zawieszania osadu z kulek.
6. Inkubować przez **30 s**, a następnie usunąć etanol.
7. Jednokrotnie powtórzyć płukanie (kroki 5 i 6), aby łącznie uzyskać dwa płukania.
8. Szczelnie zamknąć probówki i odwirować pulsacyjnie, aby zebrać pozostały etanol. Umieścić probówki z powrotem w statywie magnetycznym. Usunąć resztki etanolu za pomocą pipety P20.
9. Suszyć osad z kulek w temperaturze pokojowej przez **1–2 min**.

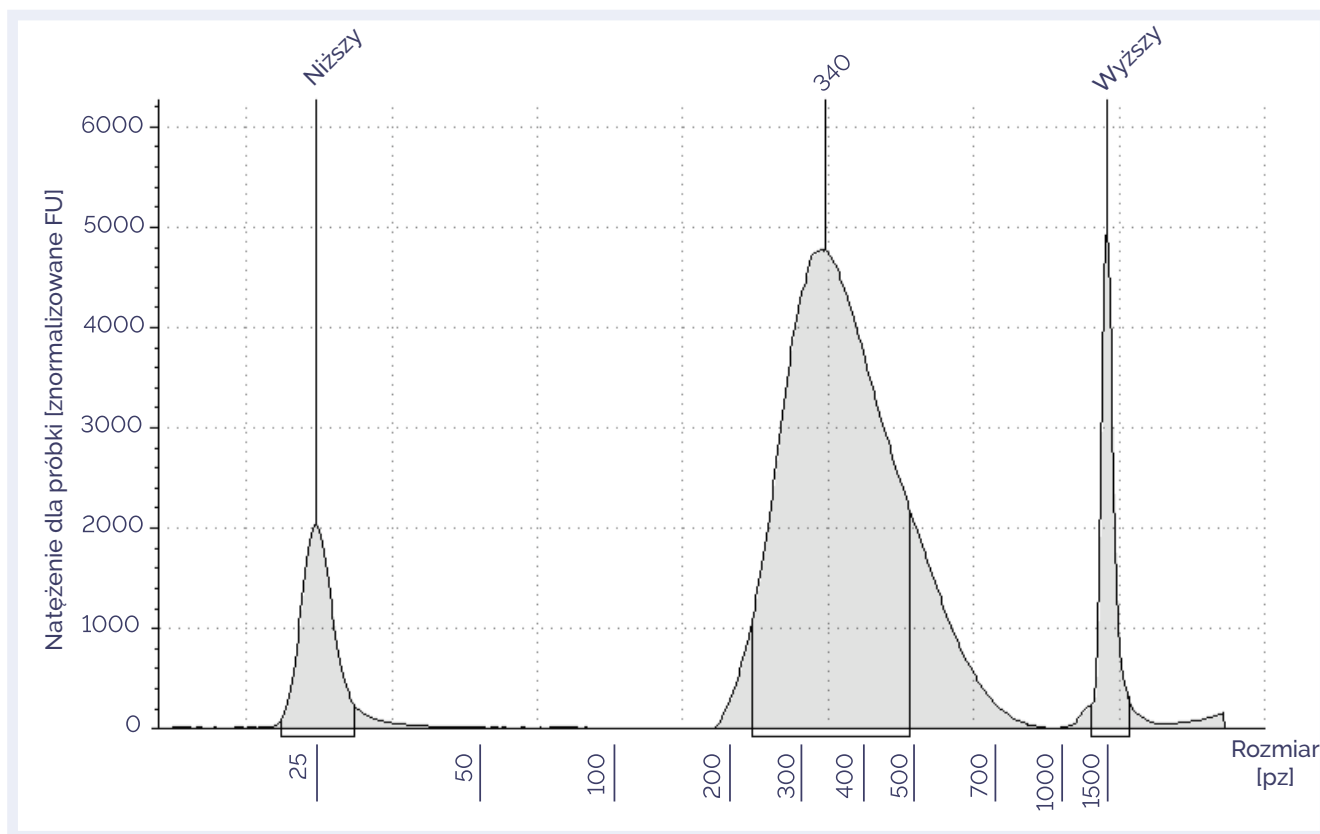


W celu uniknięcia obniżenia uzysku nie należy przesuszać osadu. Osad z kulek jest suchy, gdy ich powierzchnia zmieni się z błyszczącej na matową. Przesuszenie powoduje pękanie osadu z kulek.

10. Wyjąć probówki ze statywu magnetycznego i dodać **25 µL** wody wolnej od nukleaz bezpośrednio do osadu z kulek w celu elucji próbki DNA. Wymieszać na wytrząsarce, aby zawiesić kulki, i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
11. Inkubować w temperaturze pokojowej przez **5 min**.
12. Oznaczyć nowy zestaw pasków probówek do PCR dla próbek i odłożyć, dopóki nie będą potrzebne w kroku 14.
13. Umieścić probówki w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. **2–3 min**).
14. Przenieść **24 µL** eluatu zawierającego oczyszczone amplifikowane produkty do probówek z kroku 12. Na tym etapie probówki zawierające kulki można wyrzucić.

Przygotowanie biblioteki: Krok 3

- Oceń wielkość amplifikowanego produktu przy użyciu systemu D1000 ScreenTape System firmy Agilent. Elektroforegram powinien przedstawiać pik o wielkości 330–350 pz (± 20 pz) (Rysunek 4). Ustawić urządzenie oraz przygotować taśmę, próbki i drabinę zgodnie z instrukcjami producenta.



Rysunek 4: Elektroforegram oczyszczonych produktów z reakcji PCR przed wychwytywaniem wygenerowany przy użyciu oznaczenia D1000 ScreenTape firmy Agilent. Elektroforegram przedstawia maksymalny pik o wielkości z zakresu około 330–350 pz (± 20 pz).



Fragmenty o rozmiarach wykraczających poza ten zakres mogą pogorszyć jakość danych sekwencjonowania. Jeśli wymagane jest dalsze wsparcie, należy skontaktować się z lokalnym specjalistą ds. aplikacyjnych.

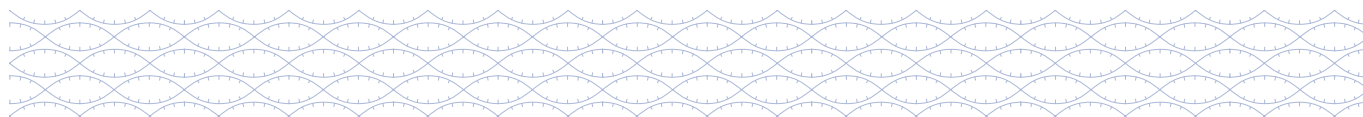
- Oceń uzysk przy użyciu **1 μ L** amplifikowanych produktów i zestawu Qubit dsDNA HS Kit zgodnie z instrukcjami producenta. Oczekiwany uzysk wynosi >18 ng/ μ L (~ 400 ng na bibliotekę).



W celu uniknięcia niedokładnych odczytów, które mogłyby wpływać na pulowanie, zalecane jest, aby korzystać z pipety jednokanałowej i upewnić się, czy po bokach końcówki nie wypływa nadmiar płynu.



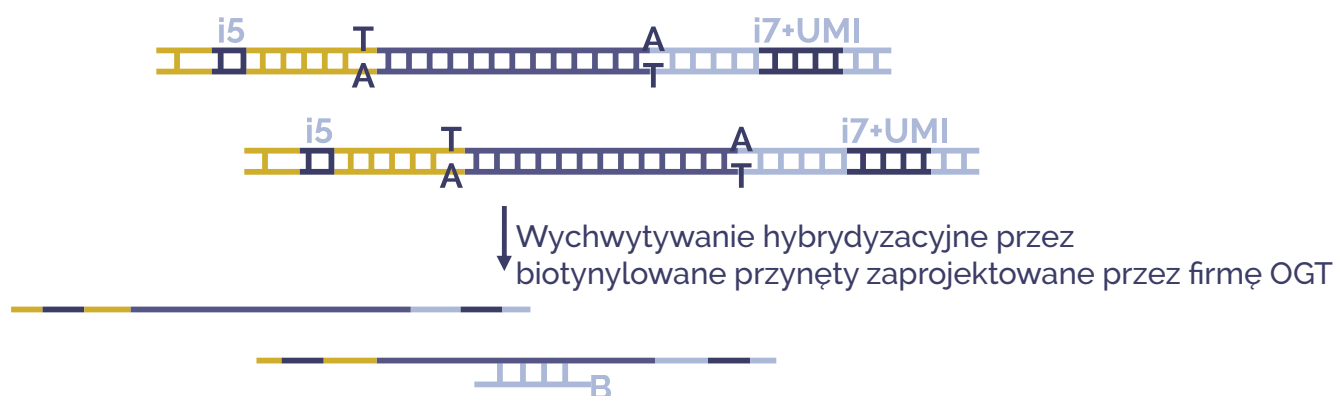
OPCJONALNY PUNKT ZATRZYMANIA: Jeśli próbki nie będą używane natychmiast, można je przechowywać przez noc w temperaturze 4°C lub przez dłuższy czas w temperaturze -20°C . W przeciwnym razie należy przejść do etapu „Hybrydyzacja Universal”.



Przygotowanie biblioteki: Hybrydyzacja Universal

Hybrydyzacja Universal

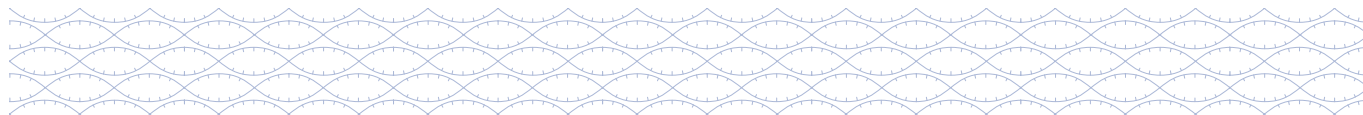
Informacje ogólne



Amplifikowana biblioteka zostaje poddana denaturacji oraz wychwytywaniu przez (biotynylowane) przynęty NGS SureSeq lub CytoSure.

Przed rozpoczęciem:

- Wyjąć kulki Mag-Bind TotalPure NGS z zestawu Post-PCR Universal Bead Kit z lodówki co najmniej **30 min przed użyciem**, aby mogły osiągnąć temperaturę pokojową.
- Przygotować świeży roztwór etanolu w stężeniu 80% przy użyciu etanolu do biologii molekularnej oraz wody do biologii molekularnej.
- Wyjąć odczynniki Hybridisation Buffer (czerwona zatyczka; ●), Formamide (żółta zatyczka; ●), Cot Human DNA (zielona zatyczka; ●) i Index Blockers (niebieska zatyczka; ●) oraz wodę wolną od nukleaz (przezroczysta zatyczka; ○) z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C) i pozostawić do rozmrożenia i osiągnięcia temperatury pokojowej.
- Wyjąć przynęty SureSeq lub CytoSure z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C) i pozostawić do rozmrożenia i osiągnięcia temperatury pokojowej.
- Upewnić się, że doszło do rozpuszczenia wszystkich składników buforu Hybridisation Buffer. W razie potrzeby inkubować w temperaturze 37°C do rozpuszczenia.



Przygotowanie biblioteki: Hybrydyzacja Universal

Przygotowanie mieszaniny Hybridisation Master Mix

Szacowany czas: 5 min dla 8–24 próbek. Czas pracy użytkownika: 5 min.

1. Wytrząsać odczynniki Hybridisation Buffer, Formamide, Cot Human DNA i Index Blockers oraz przynęty swoiste dla danego panelu na wytrząsarce przez **3–5 s** i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
2. Przygotować mieszaninę Hybridisation Master Mix zgodnie z parametrami podanymi w Tabeli 8 w świeżej probówce LoBind o pojemności 1,5 mL.

Odczynnik	Pula 1x (μL)	Pula 2x (μL) (z naddatkiem 0,5)	Pula 3x (μL) (z naddatkiem 0,5)
Woda wolna od nukleaz (przezroczysta zatyczka; ○)	2,5	6,25	8,75
Hybridisation Buffer (czerwona zatyczka; ●)	7,5	18,75	26,25
Formamide (żółta zatyczka; ●)	3,5	8,75	12,25
ŁĄCZNIE	13,5	33,75	47,25

Tabela 8: Mieszanina Hybridisation Master Mix.

3. Wymieszać na wytrząsarce i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
4. **Natychmiast przejść** do etapu „Pulowanie próbek i hybrydyzacja do przynęt wychwytyjących”.

Pulowanie próbek i hybrydyzacja do przynęt wychwytyjących

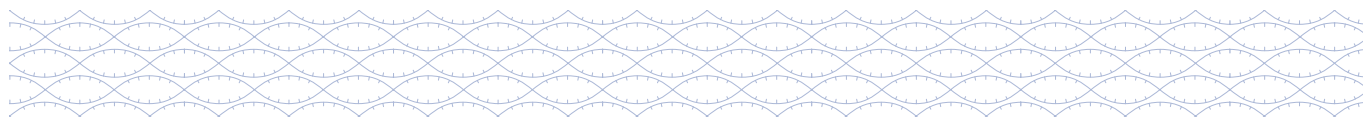
Szacowany czas: 40 min dla 8–24 próbek.

Do reakcji hybrydyzacji wymagane jest, aby wejściowy DNA z każdej próbki występował w takiej samej ilości, a następnie został połączony w pule składające się z materiału z 8 próbek. Dla każdej puli wykonywane jest jedno wychwytywanie hybrydyzacyjne. Hybrydyzację najlepiej wykonuje się przy maksymalnej ilości wejściowej wynoszącej 500 ng na próbkę. W przypadku uzysków bibliotek wynoszących mniej niż 500 ng należy dostosować ilości wejściowe wszystkich próbek do najniższej ilości wejściowej w puli hybrydyzacyjnej.

1. Obliczyć objętości produktów z reakcji PCR przed wychwytywaniem potrzebne do połączenia ośmiu bibliotek w celu utworzenia puli hybrydyzacyjnej.



Nie należy stosować ilości wejściowych mniejszych niż 300 ng na próbkę; w celu uzyskania dalszej pomocy należy skontaktować się z [działem wsparcia firmy OGT](#).



Przygotowanie biblioteki: Hybrydyzacja Universal

- Odmierzyć równe porcje oczyszczonego, amplifikowanego produktu z kroku 3 (**300–500 ng**) z każdej z ośmiu bibliotek w puli do probówki LoBind o pojemności 1,5 mL.

W przypadku panelu SureSeq CLL+CNV V3 Panel: Uwzględnić 1 x bibliotekę referencyjną SureSeq Reference na pulę razem z 7 pozostałymi bibliotekami. 1 x odczynnik SureSeq Reference Female i 1 x odczynnik SureSeq Reference Male — w sumie w cyklu sekwencjonowania obejmującym 16 próbek powinny zostać uwzględnione 2 próbki referencyjne.

- Dodać po **10 µL** odczynnika Cot Human DNA (zielona zatyczka; ●) do każdej puli.
- Wymieszać na wytrząsarce i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.



Przed użyciem należy mieszać kulki na wytrząsarce przez co najmniej 1 minutę lub do momentu, aż roztwór kulek stanie się jednorodny i będzie miał jednolity kolor.

- Dodać **2-krotną** objętość kulek Mag-Bind TotalPure NGS z zestawu Post-PCR Universal Bead Kit do każdej puli.
Przykład: do puli hybrydyzacyjnej o objętości 60 µL (+10 µL odczynnika Cot Human DNA) dodać 140 µL kulek.
- Wymieszać na wytrząsarce i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
- Inkubować w temperaturze pokojowej przez **5 min**.



- Umieścić probówki w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. **3–5 min**).
- Omijając osad z kulek, usunąć i wyrzucić oczyszczony supernatant.
Zachować kulki zawierające próbkę DNA.
- Dodać po **500 µL** etanolu w stężeniu 80% do każdej probówki bez ponownego zawieszania osadu z kulek.
- Inkubować przez **30 s**, a następnie usunąć etanol.
- Suszyć osad przez **ok. 5 min** lub do całkowitego odparowania pozostałego etanolu.



W celu uniknięcia obniżenia uzysku nie należy przesuszać osadu. Osad z kulek jest suchy, gdy ich powierzchnia zmieni się z błyszczącej na matową. Przesuszenie powoduje pękanie osadu z kulek.

- Wyjąć probówki ze statywu magnetycznego i dodać **13,5 µL** mieszaniny Hybridisation Master Mix bezpośrednio do osadu z kulek w celu elucji spulowanych bibliotek DNA. Wymieszać na wytrząsarce, aby zawiesić kulki, i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.



Upewnić się, że kulki zostały całkowicie zawieszone. Większe objętości kulek mogą wymagać dłuższego wytrząsania w celu uzyskania pełnego zawieszenia.

Przygotowanie biblioteki: Hybrydyzacja Universal

14. Inkubować w temperaturze pokojowej przez **5 min**.
15. Oznaczyć nowy zestaw pasków próbek do PCR dla pul i odłożyć, dopóki nie będą potrzebne w kroku 17.



Zalecenie: Zaprogramować termocykler, korzystając z ustawień przedstawionych w Tabeli 9. Zapisać program jako „OGT Hybridisation” (Hybrydyzacja OGT).



16. Umieścić próbki w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. **2–3 min**).
17. Przenieść **13 µL** eluatu do pustych próbek z kroku 15. Na tym etapie próbki zawierające kulki można wyrzucić.
18. Dodać **2 µL** odczynnika Index Blockers (niebieska zatyczka; ●) do pul.
19. Dodać **2 µL** przynęt swoistych dla danego panelu do pul.
20. Szczelnie zamknąć próbki, wymieszać na wytrząsarce i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości. Końcowa objętość powinna wynosić **17 µL**.
21. Upewnić się, że wszystkie zatyczki są szczelnie zamknięte.
22. Umieścić próbki w termocyklerze i uruchomić program „OGT Hybridisation” (Hybrydyzacja OGT) przedstawiony w Tabeli 9. Jeśli to możliwe, ustawić podgrzewaną pokrywę na temperaturę 105°C; alternatywnie, aktywować wstępnie ustawioną podgrzewaną pokrywę.

Krok	Temperatura (°C)	Czas
1	95	5 min
2	65	Wstrzymanie

Tabela 9: Profil inkubacji w programie „OGT Hybridisation” (Hybrydyzacja OGT).

23. Inkubować mieszaninę hybrydyzacyjną przez noc (**16–20 godz.**) w temperaturze 65°C.



Unikać przekraczania 24 godzin, ponieważ zwiększa to ryzyko parowania.

24. Przejść do etapu „Wychwytywanie i płukanie Universal”.



Wyjąć bufony Hyb Wash Buffer (niebieska kropka; ●) i Bead Priming Buffer (pomarańczowa zatyczka/kropka; ●) z miejsca przechowywania (od –15°C do –25°C) i pozostawić do rozmrożenia i osiągnięcia temperatury pokojowej. W celu rozmrożenia można je pozostawić na noc na blacie.

Przygotowanie biblioteki: Wychwytywanie i płukanie Universal

Wychwytywanie i płukanie Universal

Informacje ogólne



Zhybrydyzowane sekwencje docelowe są przyłączane do kulek ze streptawidyną, a następnie przepłukiwane w celu usunięcia DNA niebędącego materiałem docelowym.

Szacowany czas: 1,25 godz. dla 8–24 próbek. Czas pracy użytkownika: 45 min.

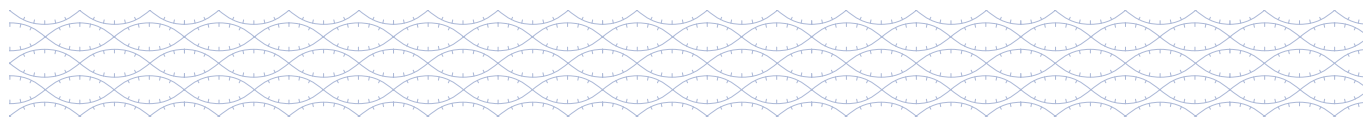
Przed rozpoczęciem:

- Rozgrzać termocykler do temperatury 65°C co najmniej **30 min przed użyciem**.
- Rozgrzać termocykler do temperatury 35°C co najmniej **30 min przed użyciem**.



Ważne jest utrzymanie prawidłowej temperatury; zaleca się sprawdzenie temperatury za pomocą skalibrowanego termometru.

- Wyjąć kulki magnetyczne Dynabeads M-270 Streptavidin z zestawu Post-PCR Universal Bead Kit z lodówki co najmniej **30 min przed użyciem**, aby mogły osiągnąć temperaturę pokojową.
- Wyjąć bufor Hyb Wash Buffer (niebieska kropka; ●) i Bead Priming Buffer (pomarańczowa zatyczka/kropka; ●) z miejsca przechowywania (od –15°C do –25°C) i pozostawić do rozmrożenia i osiągnięcia temperatury pokojowej. W celu rozmrożenia można je pozostawić na noc na blacie.



Przygotowanie biblioteki: Wychwytywanie i płukanie Universal

Przygotowanie buforu Hyb Wash Buffer przeznaczonego do stosowania wyłącznie z panelem CytoSure Constitutional NGS Panel

- W przypadku panelu CytoSure Constitutional NGS Panel wymagane jest, aby do butelek z buforem Hyb Wash Buffer dodać odczynnik Component A (brązowa zatyczka; ●).



W przypadku paneli SureSeq Cancer Panels odczynnik Component A **nie** jest wymagany

- Wyjąć odczynnik Component A (brązowa zatyczka; ●) z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C) i pozostawić do rozmrożenia i osiągnięcia temperatury pokojowej.
- Zastosować objętość wymaganą dla danego rozmiaru zestawu, wskazaną w Tabeli 10.

Rozmiar zestawu	Objętość odczynnika Component A, jaką należy dodać do butelki z buforem Hyb Wash Buffer (μL)
24 reakcje	100
96 reakcji	180 (na butelkę z buforem Hyb Wash Buffer)

Tabela 10: Objętość odczynnika Component A, jaką należy dodać do butelki z buforem Hyb Wash Buffer.

- Odpowiednio oznaczyć butelkę, aby wskazać, że odczynnik Component A został dodany.
- Po dodaniu odczynnika Component A odwrócić butelkę 10 razy.

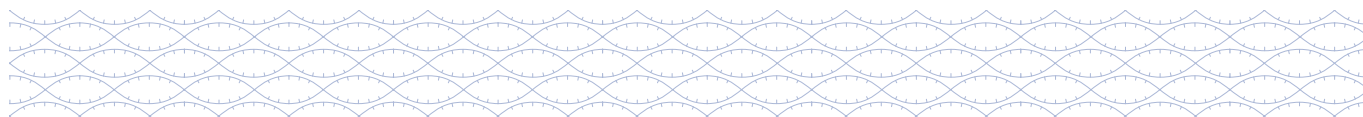
Przygotowanie buforów do wychwytywania sekwencji i płukania kulek

- Upewnić się, że bufor Hyb Wash Buffer i Bead Priming Buffer są całkowicie rozmrożone.



Inkubować w temperaturze 37°C przez 5–10 min, aby zawiesić cały osad. Bufory te można rozmrozić w temperaturze pokojowej podczas nocnej inkubacji.

- Odmierzyć porcje **6 x 200 μL** buforu Hyb Wash Buffer na pulę hybrydyzacyjną do probówek do PCR w paskach, w sposób wskazany na Rysunku 5, dla jednej puli hybrydyzacyjnej.



Przygotowanie biblioteki: Wychwytywanie i płukanie Universal

3. Podgrzewać porcje na bloku grzewczym do temperatur wskazanych poniżej przez co najmniej **30 min przed użyciem**:
 - 3 x 200 μ L w temp. 65°C/pulę
 - 3 x 200 μ L w temp. 35°C/pulę

Pula 1	Pula 1
W1 ●	W1 ●
W2 ●	W2 ●
W3 ●	W3 ●
Płukania w temperaturze 65°C	Płukania w temperaturze 35°C

Rysunek 5: Przygotowanie porcji buforu Hyb Wash Buffer dla jednej puli hybrydyzacyjnej.

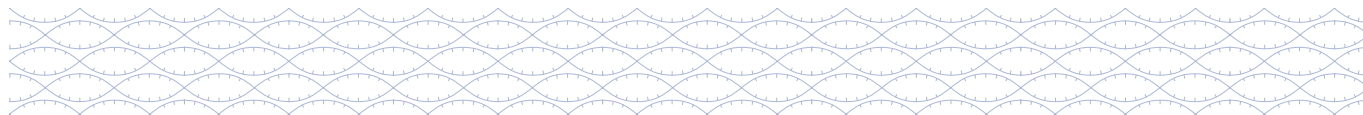
Przygotowanie kulek magnetycznych

1. Wytrząsać kulki magnetyczne Dynabeads M-270 Streptavidin przez **1 min**; zmieniać położenie probówki co **15 s**.



Należy upewnić się, że zbite kulki w żadnym stopniu nie przylegają do dna lub ścianek probówki, ponieważ nadmiar kulek ma negatywny wpływ na dalsze procesy. Po wymieszaniu kulek magnetycznych nie należy ich wirować pulsacyjnie.

2. Bezpośrednio przed użyciem zawiesić kulki magnetyczne Dynabeads M-270 Streptavidin o temperaturze pokojowej, wykonując mieszanie poprzez pipetowanie za pomocą pipety o pojemności **200 μ L** ustawionej na **100 μ L**. Należy pobrać i wypuścić roztwór pipetą co najmniej **10 razy**.



Przygotowanie biblioteki: Wychwytywanie i płukanie Universal

3. Dodać **100 µL** kulek magnetycznych Dynabeads M-270 Streptavidin do nowej probówki do PCR — jednej na pulę hybrydyzacyjną.



Alternatywnie: W jednej probówce LoBind o pojemności 1,5 mL można jednocześnie przepłukać do 400 µL kulek (dla czterech pul hybrydyzacyjnych).



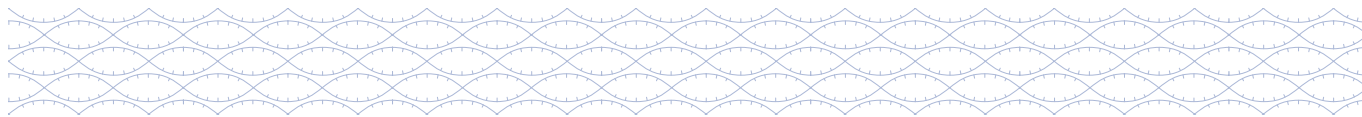
4. Umieścić probówki w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. **10 s**).
5. Omijając osad z kulek, usunąć i wyrzucić oczyszczony supernatant (~**100 µL**).
6. Dodać **200 µL** porcji buforu 1x Bead Priming Buffer na **100 µL** kulek. Wymieszać na wytrząsarce i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
7. Umieścić probówki z powrotem w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. **10 s**).
8. Omijając osad z kulek, usunąć i wyrzucić oczyszczony supernatant (~**200 µL**).
9. Jednokrotnie powtórzyć kroki 6–8, aby łącznie uzyskać **dwa** płukania.
10. Wyjąć probówki ze statywu magnetycznego i dodać pierwotną objętość buforu Bead Priming Buffer (tj. 100 µL buforu Bead Priming Buffer na 100 µL kulek), wymieszać na wytrząsarce i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
11. Jeśli płukanych ma być więcej niż **100 µL** kulek na probówkę, należy oznaczyć nowy zestaw pasków probówek do PCR i przenieść kulki do nowych probówek do PCR (100 µL/pulę).



12. Umieścić probówki w statywie magnetycznym, odczekać, aż kulki oddzielą się od supernatantu, po czym ostrożnie usunąć i wyrzucić supernatant.



Natychmiast przejść do etapu „Wykonanie wychwytywania hybrydyzacyjnego”. Nie dopuścić do wyschnięcia kulek. Niewielkie ilości pozostającego buforu Bead Priming Buffer nie będą zakłócać dalszego wiązania DNA z kulkami magnetycznymi Dynabeads M-270 Streptavidin.



Przygotowanie biblioteki: Wychwytywanie i płukanie Universal

Wykonanie wychwytywania hybrydizacyjnego

1. Po nocnej inkubacji trzymać zhybrydyzowane próbki w termocyklerze i przenieść wszystkie zhybrydyzowane próbki (objętość ~17 μL) do przygotowanych kulek ze streptawidyną.
2. Dokładnie mieszać na wytrząsarce przez **3–5 s** i upewnić się, że kulki zostały zawieszone. Odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
3. Włożyć probówki z powrotem do termocyklera, na którym nadal uruchomiony jest program „OGT Hybridisation” (Hybrydyzacja OGT), na **45 min**.
4. **Co 15 min** mieszać na wytrząsarce przez **3 s** i krótko odwirowywać pulsacyjnie w celu zebrania zawartości. Dzięki temu kulki pozostaną zawieszone. Umieścić probówki z powrotem w termocyklerze z uruchomionym programem „OGT Hybridisation” (Hybrydyzacja OGT).
5. Po 45 minutach inkubacji wyjąć probówki z termocyklera i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości. **Natychmiast przejść** do następnego kroku „Płukanie kulek ze streptawidyną w celu usunięcia niezwiązanego DNA”.



W termocyklerze pozostawić włączony program „OGT Hybridisation” (Hybrydyzacja OGT).

Płukanie kulek ze streptawidyną w celu usunięcia niezwiązanego DNA



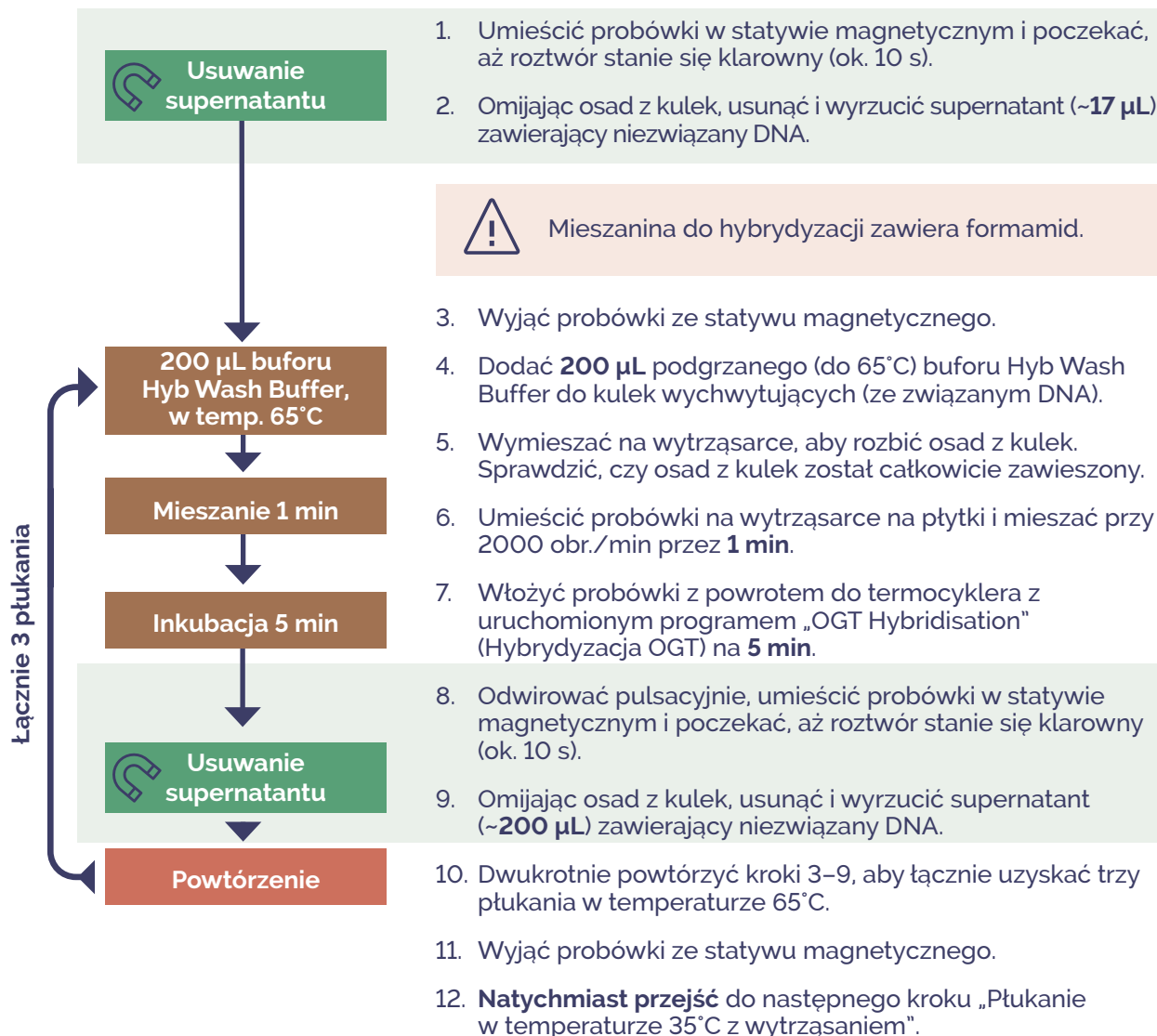
Należy pracować szybko, aby temperatura nie spadła znacznie poniżej 65°C. W tym celu zalecane jest wykonywanie wszystkich kroków płukania w probówkach do PCR w paskach i stosowanie pipety wielokanałowej.



Po dodaniu świeżego buforu należy upewnić się, że osad został całkowicie zawieszony poprzez krótkie mieszanie na wytrząsarce, a następnie kontrolę wzrokową. Do mieszania nie należy używać pipety.

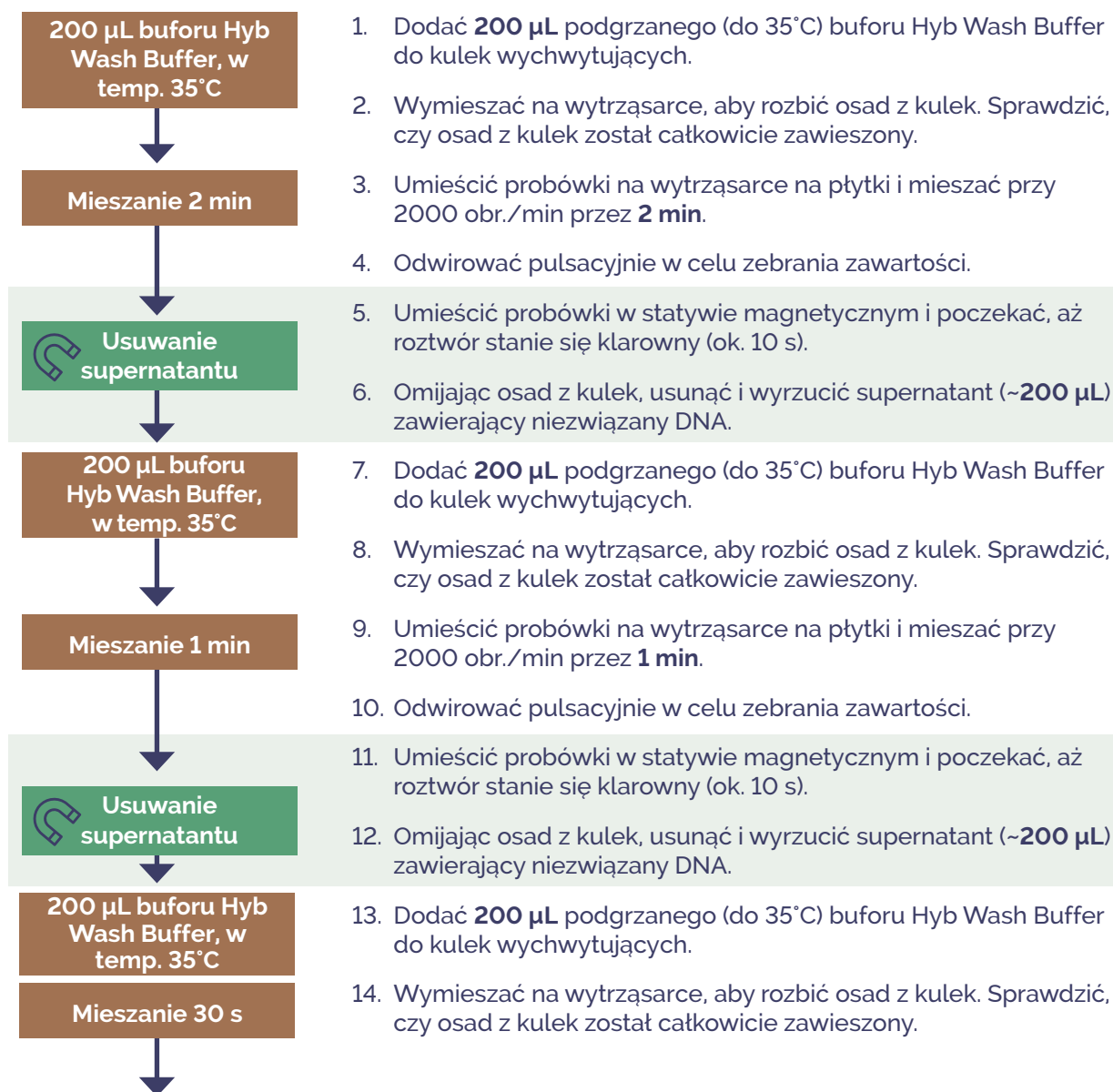
Przygotowanie biblioteki: Wychwytywanie i płukanie Universal

Płukanie gorące w temperaturze 65°C



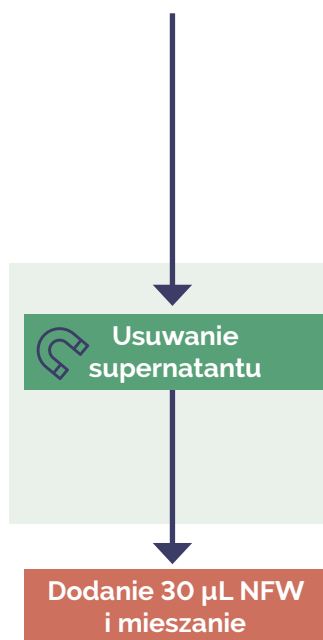
Przygotowanie biblioteki: Wychwytywanie i płukanie Universal

Płukanie w temperaturze 35°C z wytrząsaniem



Przygotowanie biblioteki: Wychwytywanie i płukanie Universal

Płukanie w temperaturze 35°C z wytrząsaniem (ciąg dalszy)



15. Umieścić probówki na wytrząsarce na płytce i mieszać przy 2000 obr./min przez **30 s**.



Nie mieszać dłużej niż 30 sekund.

16. Odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
17. Umieścić probówki w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. 10 s).
18. Omijając osad z kulek, usunąć i wyrzucić supernatant (~200 µL).
19. Odwirować pulsacyjnie w celu zebrania pozostałości buforu płuczącego. Umieścić probówki w statywie magnetycznym i usunąć resztki buforu płuczącego za pomocą pipety P20.
20. Wyjąć probówki ze statywu magnetycznego i dodać **30 µL** wody wolnej od nukleaz, aby zawiesić osad z kulek.
21. Wymieszać na wytrząsarce do uzyskania zawiesiny kulek (ang. bead slurry).



Zalecenie: W przypadku natychmiastowego przejścia do Kroku 4: PCR po wychwytywaniu odczynniki Step 4: Primer Mix i Step 4: PCR Buffer można wyjąć z miejsca przechowywania i pozostawić do rozmrożenia i osiągnięcia temperatury pokojowej na tym etapie.

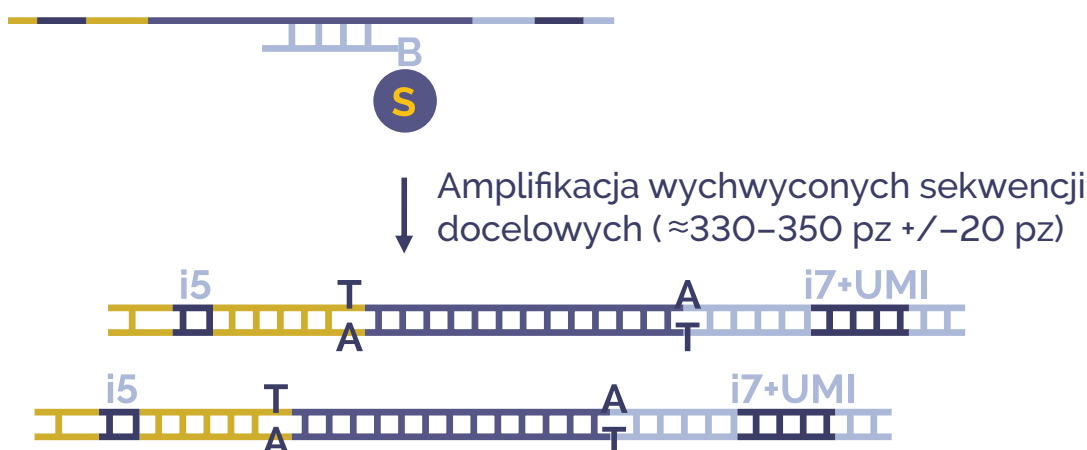


OPCJONALNY PUNKT ZATRZYMANIA: Jeśli próbki nie będą używane natychmiast, zawiesinę kulek można przechowywać w temperaturze 4°C. Nie należy jej zamrażać. W przeciwnym razie należy przejść do etapu „PCR po wychwytywaniu”.

Przygotowanie biblioteki: Krok 4

PCR po wychwytywaniu

Informacje ogólne



Po wychwyceniu fragmentów docelowych ssDNA związany z kulkami ze streptawidyną jest amplifikowany.

Przed rozpoczęciem:

- Wyjąć kulki Mag-Bind TotalPure NGS z zestawu Post-PCR Universal Bead Kit z lodówki co najmniej **30 min przed użyciem**, aby mogły osiągnąć temperaturę pokojową.
- Przygotować świeży roztwór etanolu w stężeniu 80% przy użyciu etanolu do biologii molekularnej oraz wody do biologii molekularnej.
- Wyjąć odczynniki Step 4: Primer Mix (fioletowa zatyczka; ●) i Step 4: PCR Buffer (fioletowa zatyczka; ●) z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C) i pozostawić do rozmrożenia w temperaturze pokojowej.
- Upewnić się, że doszło do rozpuszczenia wszystkich składników buforu PCR Buffer. W razie potrzeby wymieszać poprzez wytrząsanie i/lub inkubować w temperaturze 37°C do rozpuszczenia.
- ❄ Wyjąć odczynnik Step 4: PCR Polymerase (fioletowa zatyczka; ●) z miejsca przechowywania (od -15°C do -25°C) i umieścić na lodzie.

Przygotowanie biblioteki: Krok 4

Wykonanie kroku 4: PCR po wychwytywaniu

Szacowany czas: 1,25 godz. dla 8–24 próbek. Czas pracy użytkownika: 15 min.

1. Zaprogramować termocykler, korzystając z ustawień przedstawionych w Tabelach 11 i 12. Zapisać program jako „OGT PCR2”. Jeśli to możliwe, ustawić podgrzewaną pokrywę na temperaturę 105°C; alternatywnie, aktywować wstępnie ustawioną podgrzewaną pokrywę.

Krok	Temperatura (°C)	Czas
1	98	3 min
2	98	30 s
3	65	30 s
4	72	1 min
5	Powtarzać kroki od 2 do 4 zgodnie z łączną liczbą cykli przedstawioną w Tabeli 12	
6	72	10 min
7	4	Wstrzymanie

Tabela 11: Profil inkubacji w programie „OGT PCR2”.

Łączna liczba cykli w reakcji 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

Tabela 12: Łączna liczba cykli w reakcji PCR dla różnych paneli NGS firmy OGT. Uwaga: Jeśli używany jest niestandardowy panel MyPanel, aby uzyskać informacje na temat liczby cykli w reakcji PCR, należy skontaktować się ze specjalistą ds. aplikacyjnych.

2. Mieszać odczynniki Step 4: Primer Mix i Step 4: PCR Buffer na wytrząsarce przez **3–5 s** i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
- ❄ 3. Wymieszać odczynnik Step 4: PCR Polymerase, ostukując probówkę palcem, odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości i trzymać na lodzie.

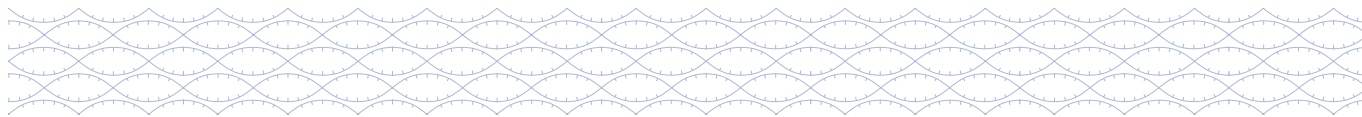
Przygotowanie biblioteki: Krok 4

4. W przypadku wielu pul przygotować mieszaninę Post-capture PCR Master Mix zgodnie z parametrami podanymi w Tabeli 13 w świeżej próbówce LoBind o pojemności 1,5 mL.

Odczynnik	Pula 1x (μL)	Pula 2x (μL) (z naddatkiem 0,5)	Pula 3x (μL) (z naddatkiem 0,5)
Wychwycony cDNA w zawiesinie kulek	14	–	–
Woda wolna od nukleaz (przezroczysta zatyczka; ○)	26,5	66,25	92,75
Step 4: PCR Buffer (fioletowa zatyczka; ●)	5	12,5	17,5
Step 4: Primer Mix (fioletowa zatyczka; ●)	2,5	6,25	8,75
Step 4: PCR Polymerase (fioletowa zatyczka; ●)	2	5	7
ŁĄCZNIE	50	90	126

Tabela 13: Mieszanina Post-capture PCR Master Mix.

5. Mieszać mieszaninę Post-capture PCR Master Mix na wytrząsarce przez **3–5 s** i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
6. Oznaczyć nowy zestaw pasków próbek do PCR dla poszczególnych reakcji PCR.
7. Dodać **36 μL** mieszaniny Post-capture PCR Master Mix do próbek z kroku 5.
8. Ponownie zawiesić zawiesinę kulek, wykonując mieszanie poprzez pipetowanie. Należy pobrać i wypuścić roztwór pipetą co najmniej 10 razy, aby upewnić się, że uzyskany roztwór jest homogeny. **Natychmiast** dodać po **14 μL** dobrze wymieszanej zawiesiny kulek do każdej próbki.
9. Wymieszać poprzez pipetowanie co najmniej 10 razy.
10. Przenieść do termocyklera i uruchomić program „OGT PCR2”.



Przygotowanie biblioteki: Krok 4

Wykonanie oczyszczania po reakcji PCR po wychwytywaniu

Szacowany czas: 40 min dla 8–24 próbek.



Przed użyciem należy mieszać kulki na wytrząsarce przez co najmniej 1 minutę lub do momentu, aż roztwór kulek stanie się jednorodny i będzie miał jednolity kolor.

Probówki z próbkami DNA:

1. Dodać po **45 µL** zhomogenizowanych kulek Mag-Bind TotalPure NGS z zestawu Post-PCR Universal Bead Kit, które wcześniej zostały doprowadzone do temperatury pokojowej, do każdej probówki z próbką DNA. Wymieszać na wytrząsarce, aby zawiesić kulki, i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
2. Inkubować w temperaturze pokojowej przez **5 min**.
3. Umieścić probówki w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. **3–5 min**).
4. Omijając osad z kulek, usunąć i wyrzucić oczyszczony supernatant (**~95 µL**). **Zachować kulki zawierające próbkę DNA.**
5. Dodać po **200 µL** etanolu w stężeniu 80% do każdej probówki bez ponownego zawieszania osadu z kulek.
6. Inkubować przez **30 s**, a następnie usunąć etanol.
7. Jednokrotnie powtórzyć płukanie (kroki 5 i 6), aby łącznie uzyskać dwa płukania.
8. Szczelnie zamknąć probówki i odwirować pulsacyjnie, aby zebrać pozostały etanol. Umieścić probówki z powrotem w statywie magnetycznym na **30 s**. Usunąć resztki etanolu za pomocą pipety P20.
9. Suszyć osad z kulek w temperaturze pokojowej przez **1–2 min**.



W celu uniknięcia obniżenia uzysku nie należy przesuszać osadu. Osad z kulek jest suchy, gdy ich powierzchnia zmieni się z błyszczącej na matową. Przesuszenie powoduje pękanie osadu z kulek.

10. Wyjąć probówki ze statywu magnetycznego i dodać **32 µL** wody wolnej od nukleaz bezpośrednio do osadu z kulek w celu elucji próbki DNA. Wymieszać na wytrząsarce i odwirować pulsacyjnie w celu zebrania zawartości.
11. Inkubować w temperaturze pokojowej przez **5 min**.

Przygotowanie biblioteki: Krok 4

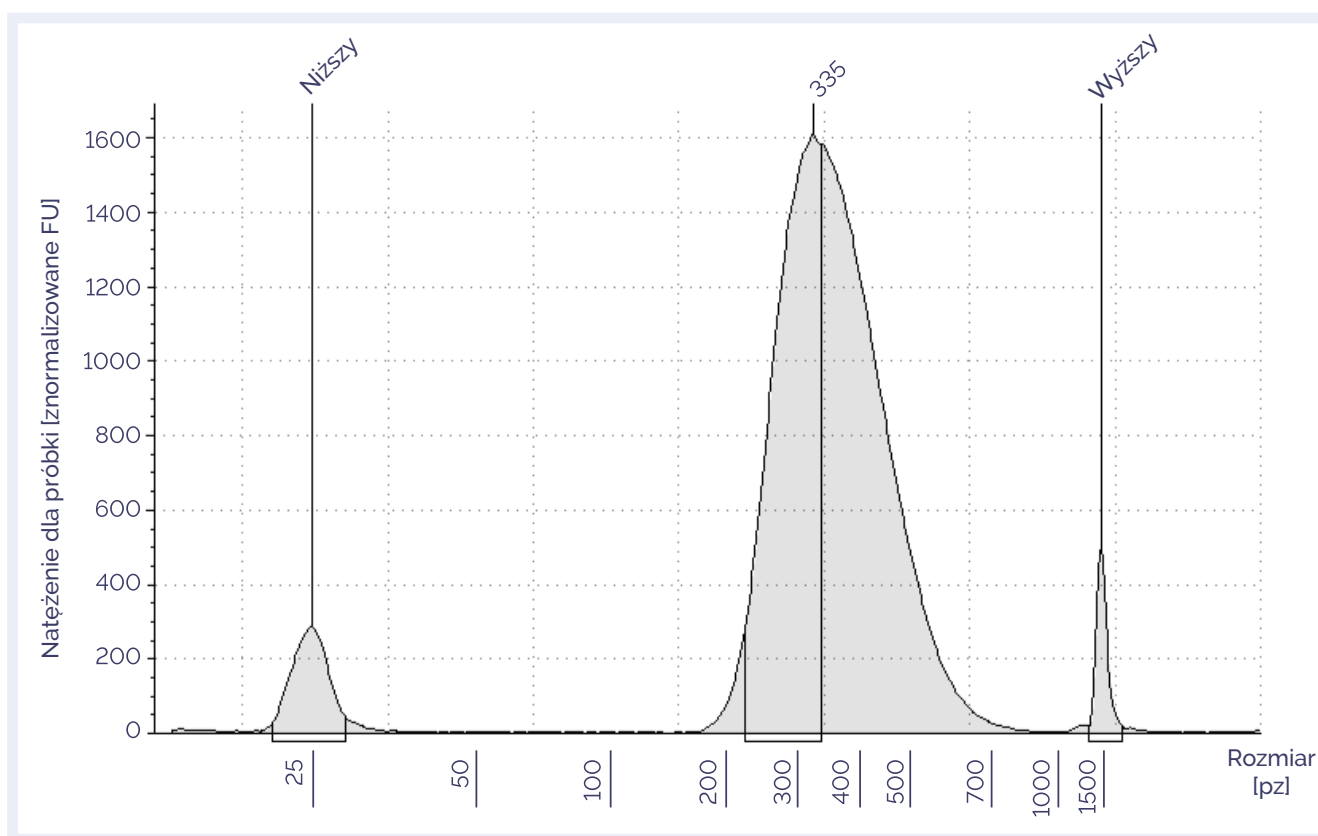
12. Oznaczyć nowy zestaw pasków próbek do PCR dla eluatów i odłożyć, dopóki nie będą potrzebne w kroku 14.



13. Umieścić próbki w statywie magnetycznym i poczekać, aż roztwór stanie się klarowny (ok. **2–3 min**).

14. Przenieść **30 µL** eluatu zawierającego oczyszczone produkty reakcji PCR po wychwytywaniu do próbek z kroku 12. Na tym etapie próbki zawierające kulki można wyrzucić.

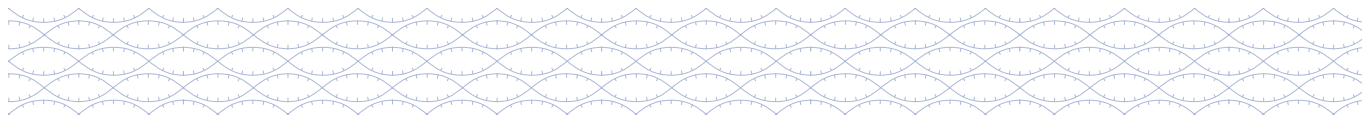
15. Ocenić wielkość amplifikowanego produktu przy użyciu systemu High Sensitivity D1000 ScreenTape System firmy Agilent. Elektroforegram powinien przedstawiać pik o wielkości 330–350 pz (± 20 pz) (Rysunek 6). Ustawić urządzenie oraz przygotować taśmę, próbki i drabinkę zgodnie z instrukcjami producenta.



Rysunek 6: Elektroforegram oczyszczonych produktów reakcji PCR po wychwytywaniu wygenerowany przy użyciu oznaczenia High Sensitivity D1000 ScreenTape firmy Agilent. Elektroforegram przedstawia maksymalny pik o wielkości z zakresu około 330–350 pz (± 20 pz).



Fragmenty o rozmiarach wykraczających poza ten zakres mogą pogorszyć jakość danych sekwencjonowania. Więcej szczegółów można uzyskać u lokalnego specjalisty ds. aplikacyjnych.



Przygotowanie biblioteki: Krok 4

- Oceń uzysk przy użyciu **1 µL** amplifikowanych produktów i zestawu Qubit dsDNA HS Kit zgodnie z instrukcjami producenta. Oczekiwany uzysk jest zależny od panelu i wynosi 1–10 ng/µL. Więcej szczegółów można uzyskać u lokalnego specjalisty ds. aplikacyjnych.



OPCJONALNY PUNKT ZATRZYMANIA: Jeśli próbki nie będą używane natychmiast, można je przechowywać przez noc w temperaturze 4°C lub przez dłuższy czas w temperaturze –20°C. W przeciwnym razie należy przejść do etapu „Sekuencjonowanie”.

Sekuencjonowanie

Sekuencjonowanie

Informacje ogólne

Pule wychwyconego DNA, które zostały przygotowane w poprzedniej sekcji (PCR po wychwytywaniu), muszą zostać połączone w taki sposób, aby podczas ładowania do sekwencjatora każda z nich występowała w takiej samej ilości. W tym celu wymagane jest dokładne określenie wielkości piku (pz) przy użyciu systemu TapeStation firmy Agilent (High Sensitivity Kit) oraz dokładne określenie stężenia próbki (ng/µL) przy użyciu oznaczenia Qubit firmy Thermo Fisher Scientific (High Sensitivity).

Przygotowanie puli sekwencjonowania



Arkusze kalkulacyjne można utworzyć przy użyciu szablonu „OGT_ULPK_Worksheet” zapewnionego przez firmę OGT. Alternatywnie można użyć poniższych wzorów.

- Użyć arkusza kalkulacyjnego opisanego powyżej lub wzorów wskazanych poniżej w celu określenia objętości (µL) każdej puli wychwyconego DNA potrzebnej do wygenerowania puli sekwencjonowania 4 nM.



Protokół ten został zwalidowany na podstawie sparowanych odczytów 150 zasad przy użyciu zestawu MiSeq Reagent Kit v2 (300 cykli) (Illumina, nr kat. MS-102-2002) i zestawu NextSeq 550 High-Output Kit 2 x 150 pz (Illumina, nr kat. 20024908).

- Uzupełnić tabele „Sequencing Pool Parameters” (Parametry puli sekwencjonowania) i „Samples” (Próbki) w zakładce „PCR2” szablonu pulowania. Komórki w kolorze zielonym należy zmieniać ręcznie odpowiednio do potrzeb; parametry oznaczone gwiazdką * muszą zostać podane.

Sekuencjonowanie

3. Dodać odpowiednią objętość poszczególnych zaindeksowanych pul sekwencjonowania do świeżej probówki LoBind o pojemności 1,5 mL oznaczonej etykietą „4 nM Sequencing Pool” (Pula sekwencjonowania 4 nM); objętości można znaleźć w kolumnie „Volume of PCR2 product to pipette” (Objętość produktu z reakcji PCR2 do pipetowania) w zakładkach „Volumes to pipette” (Objętości do pipetowania).
4. Dostosować końcową objętość puli sekwencjonowania przy użyciu wody wolnej od nukleaz w celu osiągnięcia pożądanego stężenia końcowego (4 nM). Odpowiednie informacje można znaleźć w kolumnie B w zakładce „Volumes to pipette” (Objętości do pipetowania) obok pozycji „Volume of Nuclease-free water to pipette” (Objętość wody wolnej od nukleaz do pipetowania).
5. Walidacja stężenia puli sekwencjonowania: ocenić rozkład wielkości pików puli sekwencjonowania przy użyciu systemu High Sensitivity D1000 ScreenTape System firmy Agilent oraz ocenić uzysk przy użyciu zestawu Qubit dsDNA HS Kit. Uzupełnić zakładkę „Pool validation and dilution” (Walidacja i rozcieńczenie puli), aby określić stężenie molowe puli sekwencjonowania.
6. Pula sekwencjonowania jest gotowa do załadowania do sekwenatora.



OPCJONALNY PUNKT ZATRZYMANIA: Jeśli pula sekwencjonowania nie będzie używana natychmiast, można ją przechowywać przez dłuższy czas w temperaturze -20°C . W przeciwnym razie należy przejść do etapu „Przygotowanie arkusza próbek”.

Wzór 1 — wartość nM poszczególnych próbek

$$nM = \frac{\text{Stężenie próbki (ng/}\mu\text{L)}}{([\text{Wielkość próbki w pz}] \times 660) + 157,9} \times 10^6$$

Wzór 2 — objętość poszczególnych zaindeksowanych próbek DNA

$$\text{Objętość zaindeksowanej próbki} = \frac{\text{Pula sekwencjonowania (}\mu\text{L)} \times \text{Stężenie puli (4 nM)}}{\text{Liczba próbek w puli} \times \text{Stężenie próbki w nM}}$$

Sekwencjonowanie

Przygotowanie arkusza próbek



Arkusz próbek MiSeq można utworzyć, korzystając z instrukcji pulowania MiSeq dostarczonej przez firmę OGT.

1. Otworzyć wypełniony arkusz kalkulacyjny i kliknąć odpowiednią kartę arkusza próbek.



Arkusz ten zostanie automatycznie wypełniony parametrami i danymi dotyczącymi próbek wprowadzonymi w arkuszach „PCR1” i „PCR2”.

2. Zaznaczyć wszystkie komórki zawierające tekst, jak pokazano na Rysunku 7. Odpowiednio dostosować liczbę zaznaczonych wierszy.

Rysunek 7: Przykładowy arkusz próbek w szablonie pulowania MiSeq.

Sekuencjonowanie

3. Skopiować zaznaczone komórki i wkleić je do nowego pliku Excel.



Cały tekst w kolorze czerwonym stanowi informacje dotyczące użytkownika i próbki. Cały tekst w kolorze czarnym jest wymagany do rozpoznania pliku przez sekwenator.

4. Zapisać nowy arkusz jako plik CSV (rozdzielany przecinkami).
5. Arkusz próbek można teraz przesłać do sekwenatora przy użyciu opcji „Manual sample sheet upload” (Ręczne przesyłanie arkusza próbek).



OPCJONALNY PUNKT ZATRZYMANIA: Jeśli pula sekwencjonowania nie będzie używana natychmiast, można ją przechowywać przez dłuższy czas w temperaturze -20°C . W przeciwnym razie należy przejść do etapu „Denaturacja i ładowanie puli sekwencjonowania” lub zapoznać się z odpowiednim protokołem firmy Illumina.

Denaturacja i ładowanie puli sekwencjonowania

1. W celu przeprowadzenia denaturacji puli sekwencjonowania należy postępować zgodnie z odpowiednim protokołem firmy Illumina.



Jeśli w sekwenatorze dostępny jest tylko jeden krok rozcieńczania, należy postępować zgodnie z protokołem ładowania firmy Illumina. Jeśli sekwenator wymaga wykonania drugiego kroku rozcieńczenia, np. rozcieńczenia denaturowanej puli 20 pM w celu uzyskania puli ładowania 12 pM na platformie MiSeq, należy przejść do kroku 2.



2. Po denaturacji zwiększyć objętość puli do 1 mL przy użyciu lodowatego odczynnika HT1 w celu rozcieńczenia denaturowanej puli do stężenia ~ 20 pM; następnie trzymać na lodzie.



Wymagane objętości odczynnika HT1 różnią się w zależności od objętości denaturowanej puli wymaganej dla danego typu sekwenatora. Rzeczywiste stężenie puli ~ 20 pM można sprawdzić w zakładce „Pool validation and dilution” (Walidacja i rozcieńczenie puli) w arkuszu kalkulacyjnym; jest ono zależne od stężenia puli sekwencjonowania.

3. Wprowadzić stężenie wymagane do załadowania sekwenatora w zakładce „Pool validation and dilution” (Walidacja i rozcieńczenie puli) w arkuszu kalkulacyjnym.



Gęstość klastra może się różnić w zależności od urządzenia. Zalecane jest załadowanie końcowego stężenia wynoszącego 8–12 pM w przypadku zestawu MiSeq V2 (300 cykli) lub 1,4 pM w przypadku zestawu NextSeq 500/550 High-Output Kit.

4. Rozcieńczyć denaturowaną pulę 20 pM do usunąć słowo stężenia wymaganego do załadowania, poprzez pipetowanie objętości wskazanych w zakładce „Pool validation and dilution” (Walidacja i rozcieńczenie puli) w arkuszu kalkulacyjnym.



W przypadku korzystania z produktu NextSeq przed użyciem puli sekwencjonowania należy ją połączyć z denaturowanym odczynnikiem PhiX w stężeniu 5%, zgodnie z protokołem firmy Illumina.

Sekuencjonowanie

5. Przy użyciu pipety przenieść pulę ładowania do kasety sekwenatora i skonfigurować cykl sekwencjonowania zgodnie z protokołem firmy Illumina.
6. Jeśli używane jest oprogramowanie BaseSpace, wybrać opcję „+ Custom Library Prep Kit” (+ Zestaw do przygotowania biblioteki niestandardowej) z menu rozwijanego zestawu do przygotowania biblioteki.
7. W celu utworzenia zestawu „Universal NGS Library Preparation Kit” użyć informacji przedstawionych w Tabelach 14 i 15 w załączniku.
8. Zestaw „Universal NGS Library Preparation Kit” będzie od teraz dostępny do użycia w cyklu sekwencjonowania.

Załącznik

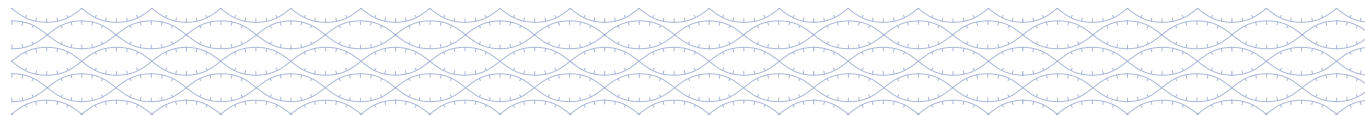
Sekuencje adapterów

Adapter	Sekuencja
1	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA
2	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

Tabela 14: Sekwencje adapterów — konfiguracja forward. Należy pamiętać, że w przypadku niektórych urządzeń do sekwencjonowania firmy Illumina wymagana jest sekwencja odwrotna i komplementarna (ang. reverse complement) do sekwencji adaptera Index 2 (i5) Adapter.

Sekuencje indeksów

I7_Index_ID	Sekuencja indeksu 1	I5_Index_ID	Sekuencja indeksu 2
1	CTGATCGTNNNNNNNNNN	501	ATATGCGC
2	ACTCTCGANNNNNNNNNNN	502	TGGTACAG
3	TGAGCTAGNNNNNNNNNN	503	AACCGTTC
4	GAGACGATNNNNNNNNNN	504	TAACCGGT
5	CTTGTCGANNNNNNNNNNN	505	GAACATCG
6	TTCCAAGGNNNNNNNNNN	506	CCTTGTAG
7	CGCATGATNNNNNNNNNN	507	TCAGGCTT



Załącznik

I7_Index_ID	Sekwencja indeksu 1	I5_Index_ID	Sekwencja indeksu 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	ACGTTGAG
30	GCGTCATTNNNNNNNNNN	530	AACGTCTG
31	ATCCGGTANNNNNNNNNN	531	TATCGGTC

Załącznik

I7_Index_ID	Sekwencja indeksu 1	I5_Index_ID	Sekwencja indeksu 2
32	CGTTGCAANNNNNNNNNN	532	CGCTCTAT
33	GTGAAGTGNNNNNNNNNN	533	GATTGCTC
34	CATGGCTANNNNNNNNNN	534	GATGTGTG
35	ATGCCTGTNNNNNNNNNN	535	CGCAATCT
36	CAACACCTNNNNNNNNNN	536	TGGTAGCT
37	TGTGACTGNNNNNNNNNN	537	GATAGGCT
38	GTCATCGANNNNNNNNNN	538	AGTGGATC
39	AGCACTTCNNNNNNNNNN	539	TTGGACGT
40	GAAGGAAGNNNNNNNNNN	540	ATGACGTC
41	GTTGTTCGNNNNNNNNNN	541	GAAGTTGG
42	CGGTTGTTNNNNNNNNNN	542	CATACCAC
43	ACTGAGGTNNNNNNNNNN	543	CTGTTGAC
44	TGAAGACGNNNNNNNNNN	544	TGGCATGT
45	GTTACGCANNNNNNNNNN	545	ATCGCCAT
46	AGCGTGTTNNNNNNNNNN	546	TTGCGAAG
47	GATCGAGTNNNNNNNNNN	547	AGTTCGTC
48	ACAGCTCANNNNNNNNNN	548	GAGCAGTA
49	GAGCAGTANNNNNNNNNN	549	ACAGCTCA
50	AGTTCGTCNNNNNNNNNN	550	GATCGAGT
51	TTGCGAAGNNNNNNNNNN	551	AGCGTGTT
52	ATCGCCATNNNNNNNNNN	552	GTTACGCA
53	TGGCATGTNNNNNNNNNN	553	TGAAGACG
54	CTGTTGACNNNNNNNNNN	554	ACTGAGGT
55	CATACCACNNNNNNNNNN	555	CGGTTGTT

Załącznik

I7_Index_ID	Sekwencja indeksu 1	I5_Index_ID	Sekwencja indeksu 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	ACGTTCAAGNNNNNNNNNN	568	GCACAACT
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

Załącznik

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

Tabela 15: Sekwencje indeksów. N oznacza identyfikator UMI. Należy pamiętać, że w przypadku niektórych urządzeń do sekwencjonowania firmy Illumina wymagana jest sekwencja odwrotna i komplementarna (ang. reverse complement) do sekwencji adaptera Index 2 (i5) Adapter.

Załącznik

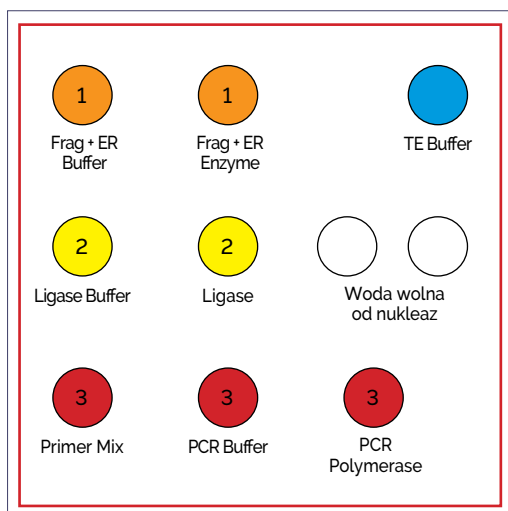
Zalecane wytyczne dotyczące sekwencjonowania

Panel	Zalecana platforma do sekwencjonowania	Liczba próbek na cykl sekwencjonowania	Proponowana wielkość puli	Zalecany rozmiar zestawu do zakupu	Liczba cykli w zależności od zakupionego rozmiaru zestawu
770001 — CoreMPN	MiSeq 300 V2	48	6 x 8-pleks.	2 x 24 reakcje	1 cykl
				1 x 96 reakcji	2 cykle
770002 — Myeloid Plus	MiSeq 300 V2	16	2 x 8-pleks.	2 x 24 reakcje	3 cykle
				1 x 96 reakcji	6 cykli
770027 — CLL+CNV v3	MiSeq 300 V2	16	2 x 8-pleks.	2 x 24 reakcje	3 cykle
				1 x 96 reakcji	6 cykli
770003 — Pan Myeloid	MiSeq 300 V2	8	1 x 8-pleks.	1 x 24 reakcje	3 cykle
	MiSeq 600 V3	16	2 x 8-pleks.	2 x 24 reakcje	3 cykle
				1 x 96 reakcji	6 cykli
	NextSeq Mid-Output	48	6 x 8-pleks.	2 x 24 reakcje	1 cykl
				1 x 96 reakcji	2 cykle
502003 — CytoSure Constitutional NGS	NextSeq High-Output	24	3 x 8-pleks.	1 x 24 reakcje	1 cykl
770007 — CytoSure Comprehensive Familial Hypercholesterolaemia (FH) NGS	MiSeq 300 V2	16	3 x 8-pleks.	2 x 24 reakcje i 1 x 96 reakcji	3 i 6 cykli

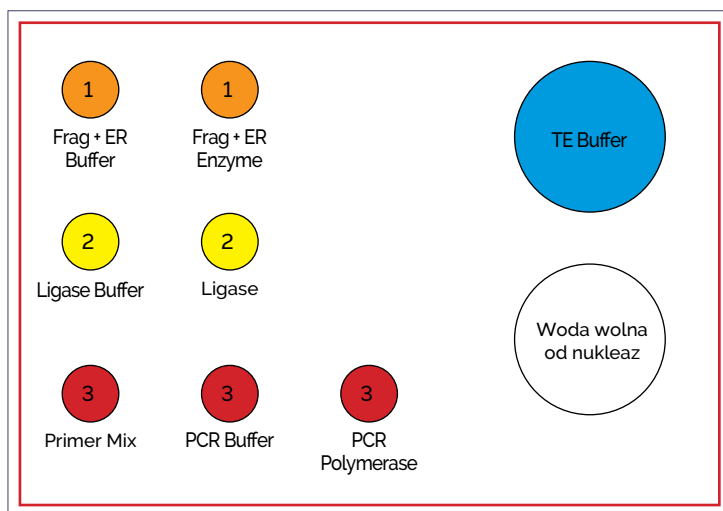
Tabela 16: Zalecane wytyczne dotyczące sekwencjonowania.

Załącznik

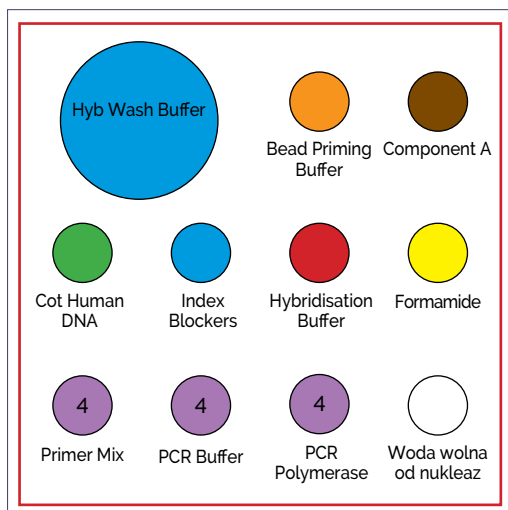
Lokalizacja probówek z odczynnikami



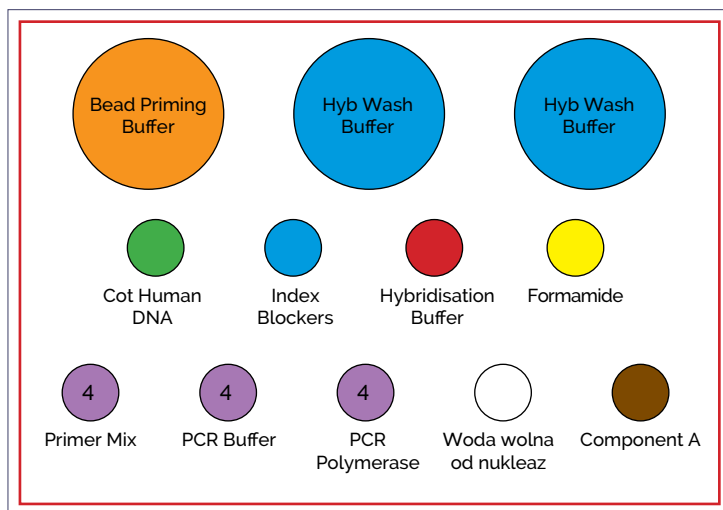
Rysunek 8: Lokalizacja probówek w przypadku zestawu Library Preparation Kit do 24 reakcji (770100–24).



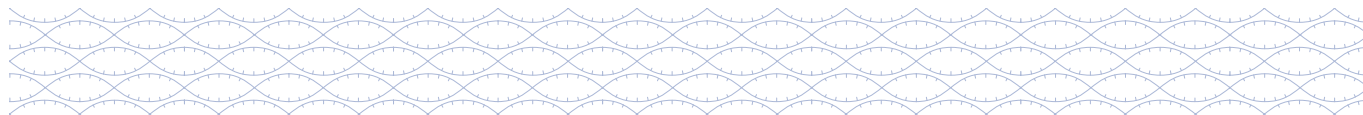
Rysunek 10: Lokalizacja probówek w przypadku zestawu Library Preparation Kit do 96 reakcji (770100–96).



Rysunek 9: Lokalizacja probówek w przypadku zestawu Hybridisation & Wash Kit V2 do 24 reakcji (770410–24).



Rysunek 11: Lokalizacja probówek w przypadku zestawu Hybridisation & Wash Kit V2 do 96 reakcji (770410–96).



Informacje prawne

Niniejszy podręcznik i jego zawartość są objęte prawem autorskim © firmy Oxford Gene Technology (Operations) Limited 2024. Wszelkie prawa zastrzeżone. Powielanie całości lub jakiegokolwiek istotnej części niniejszego podręcznika w jakiegokolwiek formie jest zabronione, z wyjątkiem sytuacji, w których indywidualni użytkownicy drukują lub zapisują fragmenty protokołów na własny użytek. Niniejsza licencja nie zezwala użytkownikom na uwzględnianie opisywanych materiałów ani ich istotnej części w żadnych innych pracach lub publikacjach, zarówno w formie drukowanej, elektronicznej, jak i każdej innej formie. W szczególności żadna istotna część podręcznika (między innymi) nie może być rozpowszechniana ani kopiowana w celach komercyjnych.

Oznaczenie NGS Library Preparation

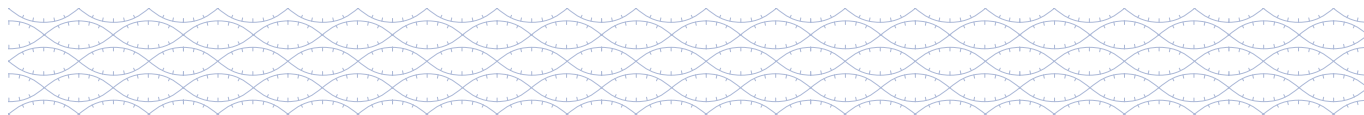
Zestaw Universal NGS Library Preparation Kit został opracowany przez firmę Oxford Gene Technology. Nabywca ma niezbywalne prawo do stosowania i wykorzystywania produktu WYŁĄCZNIE W CELACH BADAWCZYCH, A NIE DO PROCEDUR DIAGNOSTYCZNYCH. Produkt nie jest przeznaczony i nie może być stosowany do diagnozowania, prewencji, monitorowania lub leczenia jakiegokolwiek choroby lub jakiegokolwiek stanu oraz łagodzenia ich przebiegu. Produkt nie jest przeznaczony i nie może być również stosowany do badań jakichkolwiek procesów fizjologicznych u możliwej do zidentyfikowania osoby ani w żadnym innym celu medycznym.

Znaki towarowe

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).

Zobowiązania klienta

Klient potwierdza, że firma Oxford Gene Technology (Operations) Limited (lub firmy należące do tej grupy) posiada wszystkie prawa własności intelektualnej do projektu Produktu, w tym wyboru i konfiguracji sekwencji oligonukleotydów użytych w Produkcie. Produkt może być powielany lub wytwarzany wyłącznie przez firmę Oxford Gene Technology (Operations) Limited lub za jej zgodą.



Informacje dotyczące zamówień

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Rozwiązanie Universal NGS Workflow Solution V2	Pakiet zawiera: 1 x zestaw Universal Library Preparation Kit, 1 x adaptery Universal Index Adapters, 1 x zestaw Universal Hybridisation & Wash Kit, 1 x zestaw Universal Bead Kit	770510-24 770510-96

Tabela 17: Informacje dotyczące zamawiania.

Aktualną listę produktów oraz najnowsze informacje o produktach można znaleźć na stronie ogt.com

Informacje kontaktowe

Wielka Brytania +44 (0) 1865 856826

Stany Zjednoczone +1 914 467 5285

Wsparcie techniczne: support@ogt.com

contact@ogt.com

ogt.com

Oxford Gene Technology Ltd.

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

Wielka Brytania



Firma z grupy Sysmex

**What binds us,
makes us.**

SureSeq™ i CytoSure®: Produkt wyłącznie do użytku badawczego; nie może być stosowany w procedurach diagnostycznych. Niniejszy podręcznik i jego zawartość są objęte prawem autorskim © firmy Oxford Gene Technology IP Limited – 2024. Wszelkie prawa zastrzeżone. OGT™, CytoSure® i SureSeq™ są znakami towarowymi firmy Oxford Gene Technology IP Limited.

Firma Oxford Gene Technology (Operations) Ltd. zarejestrowana w Wielkiej Brytanii pod numerem: 03845432, Unit 5, Oxford Technology Park, 4A Technology Drive, Kidlington, Oxfordshire, OX5 1GN, Wielka Brytania

990370 09/24