SureSeq

Ein Unternehmen der Sysmex-Gruppe

OGT Handbuch

Universal NGS Workflow Solution V2

Nur für Forschungszwecke; nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren

Inhaltsverzeichnis

Einführung 4

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Ausrüstung 5

Von OGT gelieferte Reagenzien 5
Vom Benutzer bereitgestellte Reagenzien 6
Vom Benutzer bereitgestellte Verbrauchsmaterialien 7
Vom Benutzer bereitgestellte Ausrüstung 7

Allgemeine Leitlinien 8

Empfehlungen vor dem Start 8
Lagerung und Handhabung 8
Sicherheit 9
Bedeutung der Symbole 9

Bestimmungsgemäße Verwendung 9

Interpret NGS-Analyse-Software 10

Workflow-Übersicht 10

Anforderungen an die Proben 11

Anforderungen an die Proben 11
DNA – Probenvorbereitung 11
DNA-Konzentration – Qubit dsDNA HS Assay-Kit 11
DNA-Integrität – Genomic DNA ScreenTape 12
Reinheit – NanoDrop 13

Bibliotheksvorbereitung 14

Schritt 1: DNA-Fragmentierung, Endreparatur und 3'-End-A-Tailing 14
Schritt 2: Adapter-Ligation und Aufreinigung 17
Schritt 3: Pre-Capture-PCR 23
Universelle Hybridisierung 28
Universelle Capture und Waschen 32
Schritt 4: Post-Capture-PCR 40

Sequenzierung 45

Vorbereitung des Probenblatts 47
Denaturierung und Laden des Sequenzierungspools 48

Anhang 49

Adaptersequenzen 49
Indexsequenzen 49
Empfohlene Leitlinien für die Sequenzierung 54
Positionen der Reagenzröhrchen 55

Rechtliche Hinweise 56

Assay für die NGS-Bibliotheksvorbereitung 56
Marken 56
Pflichten des Kunden 56

Bestellinformationen 57

Kontaktinformationen 57

Einführung

Universal NGS Workflow Solution V2 wurde für die Verwendung mit SureSeq™ und CytoSure® Gen-Panel-Baits entwickelt und optimiert, die von Oxford Gene Technology (OGT) für einen genauen Nachweis einer breiten Palette von Varianten entwickelt wurden.

Das OGT Next Generation Sequencing (NGS)-Sortiment ist mit den Illumina MiniSeq™, MiSeq™, NextSeq™ und NovaSeq™ Chemikalien kompatibel.

Das Kit für 24 Reaktionen enthält ausreichend Reagenzien, um einen Satz von 8 Proben dreimal zu verarbeiten. Das Kit für 96 Reaktionen bietet ausreichend Reagenzien, um einen Satz von 24 Proben viermal zu verarbeiten.

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Ausrüstung

Von OGT gelieferte Reagenzien

Inhalt	Versand-/Lagerungsbedingungen	Kat.- Nr. (24 Reaktionen)	Kat.- Nr. (96 Reaktionen)
Universal Library Preparation Kit	Versand bei -20 °C, bei -20 °C lagern	770100-24	770100-96
Universal Index Adapters	Versand bei -20 °C, bei -20 °C lagern	770200-24	770200-96
Universal Hybridisation & Wash Kit V2	Versand bei -20 °C, bei -20 °C lagern	770410-24	770410-96
Pre-PCR Universal Bead Kit	Versand bei 4 °C, bei 4 °C lagern	770310-24	770310-96
Post-PCR Universal Bead Kit	Versand bei 4 °C, bei 4 °C lagern	770315-24	770315-96
SureSeq CLL-CNV V3 Panel			
SureSeq Reference DNA	Versand bei -20 °C, bei 4 °C lagern	770600	–

Universal Library Preparation Kit
770100-24 und 770100-96

Universal Index Adapters
770200-24 und 770200-96

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

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

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

SureSeq Reference DNA
770600

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Ausrüstung

Vom Benutzer bereitgestellte Reagenzien

Komponente	Vorgeschlagener Lieferant	Kat.- Nr.*
100%iges Ethanol in molekularbiologischer Qualität	Allgemeiner Laborlieferant	–
Wasser in molekularbiologischer Qualität	Allgemeiner Laborlieferant	–
5,0-M-Natriumhydroxidlösung in molekularbiologischer Qualität	Allgemeiner Laborlieferant	–
Qubit® dsDNA High Sensitivity (HS) Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32854
Qubit dsDNA Broad Range (BR) Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32853
D1000 ScreenTape	Agilent Technologies	5067-5582
D1000 Reagents	Agilent Technologies	5067-5583
High Sensitivity D1000 ScreenTape	Agilent Technologies	5067-5584
High Sensitivity D1000 Reagents	Agilent Technologies	5067-5585
MiSeq Reagent Kit V2 (300 Zyklen)	Illumina†	MS-102-2002
MiSeq Reagent Kit V3 (600 Zyklen)	Illumina†	MS-102-3003
NextSeq 500/550 Mid-Output Kit v2.5 (300 Zyklen)	Illumina†	20024905
NextSeq 500/550 High-Output Kit v2.5 (300 Zyklen)	Illumina†	20024908
Optional: Genomic DNA ScreenTape	*Agilent Technologies*	*5067-5365*
Optional: Genomic DNA Reagents	*Agilent Technologies*	*5067-5366*

* Die Katalognummern gelten für das Vereinigte Königreich und können in anderen Gebieten abweichen. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an support@ogt.com

† Je nach dem verwendeten Sequenziergerät.

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Ausrüstung

Vom Benutzer bereitgestellte Verbrauchsmaterialien

Komponente	Vorgeschlagener Lieferant	Kat.- Nr.*
Qubit Assay-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific	Q32856
DNA 1,5 ml LoBind®-Röhrchen	Eppendorf	22431021
PCR-Streifen mit anhängenden Deckeln	Starlab	A1402-3700
Aerosolbeständige sterile Pipettenspitzen mit Filter 2, 10, 20, 200, 1.000 µl	Allgemeiner Laborlieferant	–
Optional: 15-ml- oder 50-ml-Röhrchen	*Allgemeiner Laborlieferant*	–
Optional: Einweg-Reagenzienreservoirs	*Allgemeiner Laborlieferant*	–

Vom Benutzer bereitgestellte Ausrüstung

Komponente	Benötigt für Schritt	Vorgeschlagener Lieferant	Kat.- Nr.*
Agilent® 4200 TapeStation®	Post-PCR	Agilent Technologies	G2991BA
2 x Thermocycler (96 Wells) mit beheiztem Deckel	Pre- und Post-PCR	Allgemeine Laborlieferanten	–
Labor-Vortexmischer – OGT empfiehlt den IKA™ MS 3 digitalen Vortexmischer	Pre- und Post-PCR	IKA	IKA 0003319000
Plattenadapter für Vortexmischer – OGT empfiehlt den IKA MS 3.4 Mikrotiteraufsatz	Post-PCR	IKA	IKA 0003426400
Mikrofuge für Standard-1,5-ml-Röhrchen und 8-Streifen-PCR-Röhrchen	Pre- und Post-PCR	Allgemeiner Laborlieferant	–
Magnet für 96-Well-Mikrotiterplatten – OGT empfiehlt den DynaMag™-96 Seitenmagneten	Pre- und Post-PCR	Thermo Fisher Scientific	12331D
Magnet für 1,5-ml-Röhrchen – OGT empfiehlt den DynaMag-2 Magneten	Post-PCR	Thermo Fisher Scientific	12321D
Fluorometer (Qubit 4)	Pre- und Post-PCR	Thermo Fisher Scientific	Q33238
NanoDrop™ One (Mikrovolumen-UV-Vis-Spektralphotometer)	Pre-PCR	Thermo Fisher Scientific	ND-ONE-W
8-Kanal-Pipette für 20–200 µl und 1–10 µl	Pre- und Post-PCR	Allgemeiner Laborlieferant	–
Illumina MiniSeq, MiSeq, NextSeq oder NovaSeq	Post-PCR	Illumina	–

* Die Katalognummern gelten für das Vereinigte Königreich und können in anderen Gebieten abweichen. Für weitere Informationen wenden Sie sich bitte an support@ogt.com

Allgemeine Leitlinien

Empfehlungen vor dem Start

Um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, empfiehlt OGT, alle Schritte in PCR-Streifen min anhängenden Deckeln mit anhängenden Deckeln durchzuführen.

Es wird dringend empfohlen, die Hybridisierungsbedingungen (Thermocycler und Plastikgefäße) zu testen, um sicherzustellen, dass während der Inkubation über Nacht nur eine minimale Evaporation stattfindet:

- Zum Testen 17 µl Nuklease-freies Wasser (ohne DNA) in jedes Well geben, das Sie verwenden könnten, und die Thermocycler-Einstellungen in Tabelle 9 verwenden.
- Nach der Inkubation über Nacht prüfen, dass die Evaporation nicht mehr als 1–2 µl pro Röhrchen beträgt.
- Gegebenenfalls die Einstellung der Thermocycler-Deckel anpassen und/oder für das Modell des Thermocyclers geeignete Abstandshalter verwenden.

Während des gesamten Workflows eine frische 80%ige Ethanollösung aus Ethanol und Wasser in molekularbiologischer Qualität verwenden.

Gegebenenfalls sollten die Mag-Bind® TotalPure NGS-Beads und die Dynabeads™ M-270 Streptavidin Magnetbeads mindestens 30 min vor der Verwendung aus der Lagerung genommen werden, damit sie sich auf Raumtemperatur aufwärmen.

Lagerung und Handhabung

Das Kit muss vor dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwendet werden.

Das Universal Library Preparation Kit, die Universal Index Adapters, die SureSeq und NGS Constitutional Panels und das Universal Hybridisation & Wash Kit V2 sind bei -20 °C zu lagern.

Die SureSeq Reference DNA, Pre-PCR und Post-PCR Universal Bead Kits sind bei 4 °C zu lagern.

Allgemeine Leitlinien

Sicherheit

Die OGT Panel-Baits sind durch geschultes Laborpersonal gemäß der guten Laborpraxis unter Verwendung geeigneter Schutzausrüstung wie Laborkittel, Schutzbrillen und Handschuhen zu handhaben.

Das Universal Hybridisation & Wash Kit V2 enthält Chemikalien, die bei unsachgemäßer Handhabung potenziell gefährlich sind. Besondere Vorsicht ist sowohl bei Formamid als auch bei dem Hybridisierungspuffer geboten.

Stellen Sie sicher, dass sich alle Nutzer mit den Sicherheitsdatenblättern (SDB) und den relevanten Risikobewertungen vertraut gemacht haben, bevor sie mit dem Protokoll fortfahren.

Bedeutung der Symbole

Symbol	Definition
	Wichtige Informationen: Es ist sehr wichtig, dass Sie diese Hinweise lesen, verstehen und genau befolgen.
	Zeitsparender Tipp: Optionaler Vorschlag zur Steigerung der Protokolleffizienz.
	Kaltschritt: Bewahren Sie alle Komponenten für diese Schritte auf Eis auf.
	Magnetschritt: Belassen Sie alle Röhrchen während dieser Schritte auf dem Magneten.
	Sequenzierungsspezifische Informationen: Es ist sehr wichtig, dass Sie diese Hinweise lesen, verstehen und genau befolgen, um den Sequenzierungslauf optimal zu laden.
	Sicherer Stopppunkt: Die Proben können in diesem Schritt sicher gelagert werden, ohne dass die Ergebnisse beeinträchtigt werden.

Bestimmungsgemäße Verwendung

Diese Produkte sind nur für Assays zur Verwendung in der Forschung bestimmt. Die Universal NGS Workflow Solution ist für die Verwendung durch entsprechend geschultes Personal unter Verwendung von DNA vorgesehen, die aus einer Vielzahl von Geweben extrahiert wurde, einschließlich Blut und Knochenmark.

Interpret NGS-Analyse-Software

Rohdaten-FASTQ-Dateien, die von Illumina Sequenzern erzeugt werden, können mit der Interpret NGS-Analyse-Software analysiert und in interaktive NGS-Analyseberichte umgewandelt werden. Die Software ist das leistungsstarke eigenständige Datenanalysepaket von OGT, das mit dem Kit geliefert wird.

Workflow-Übersicht

Wenn Sie Informationen über OGT-Produkte anfordern möchten, besuchen Sie **www.ogt.com**.

Der folgende Abschnitt enthält Anweisungen zur Herstellung von Probenbibliotheken, die speziell für die Illumina Sequenzierungsplattform vorgesehen sind. Für jede Probe wird eine individuelle Bibliotheksvorbereitung durchgeführt. Jede Probe ist mit einer Indexsequenz (Barcode) sowie einem Unique Molecular Identifier (UMI) versehen, um Fehlerkorrekturen zu ermöglichen und die Genauigkeit bei der Sequenzierung zu erhöhen. Die Proben werden amplifiziert und dann in Achtergruppen gepoolt. Jeder Pool wird mit designspezifischen Baits hybridisiert, erfasst und dann für die Sequenzierung amplifiziert.

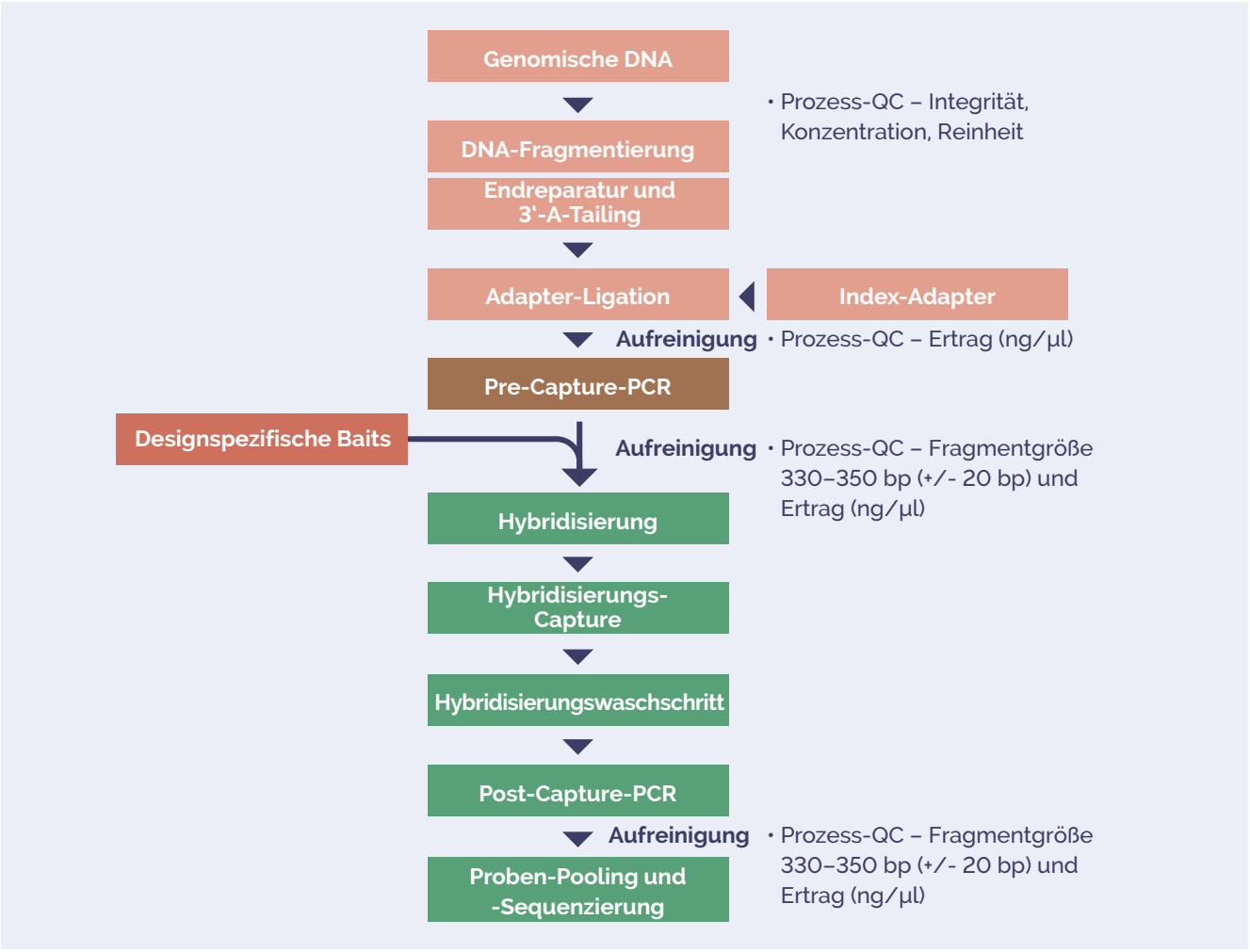


Abbildung 1: Workflow für die Probenbibliotheksvorbereitung mit Angabe der erwarteten DNA-Fragmentgröße bei jedem Schritt der Prozedur.

Anforderungen an die Proben

DNA: Das Protokoll wurde für DNA-Einträge von 200–500 ng optimiert.

Für das SureSeq CLL + CNV V3 Panel: 500 ng SureSeq Reference Female und 500 ng SureSeq Reference Male aus dem SureSeq Reference DNA Kit hinzugeben. Pro Hybridisierungspool ist eine Referenzprobe erforderlich, d. h. insgesamt zwei in einem MiSeq-Lauf mit 16 Proben.

Eine Änderung des empfohlenen DNA-Eintrags wirkt sich auf die nachfolgenden Sequenzierungsergebnisse aus.

DNA – Probenvorbereitung

Für alle Proben muss vor Beginn des Protokolls die Konzentration der gDNA-Probe bestimmt werden.

Die Bewertung der DNA-Integrität und -Reinheit ist optional, wird aber empfohlen.

Wir empfehlen die folgenden Tests, um die Integrität, Konzentration und Reinheit der Proben zu beurteilen:

- Konzentration: Thermo Fisher Scientific Qubit
- DNA-Integrität: Agilent 4200 TapeStation
- Reinheit: Thermo Scientific NanoDrop

DNA-Konzentration – Qubit dsDNA HS Assay Kit

Beziehen Sie sich auf die Bedienungsanleitung des Herstellers für das Thermo Fisher Scientific Qubit. Die wichtigsten Schritte werden im Folgenden beschrieben:

1. Zur Vorbereitung der Qubit Arbeitslösung das Qubit Reagenz 1:200 in Qubit Puffer verdünnen.
2. 190 µl der Qubit Arbeitslösung für die beiden Standards aliquotieren.
3. 10 µl von jedem Qubit Standard in das entsprechende Röhrchen geben.
4. 199 µl der Qubit Arbeitslösung für jede zu untersuchende Probe aliquotieren.
5. 1 µl der Probe in das entsprechende Röhrchen geben.

Anforderungen an die Proben

⚠ Proben mit einer anfänglichen DNA-Konzentration > 100 ng/µl sollten mit TE-Puffer (im Kit enthalten) auf 20–100 ng/µl vorverdünnt werden. Die DNA-Konzentration mit dem Qubit dsDNA HS Assay Kit bestätigen. Die genaue Quantifizierung des DNA-Eintrags ist für reproduzierbare Fragmentierungsergebnisse entscheidend.

6. Die Probe für 2–3 s durch Vortexen mischen und darauf achten, dass keine Blasen entstehen.
7. Die Röhrchen für 2 min bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die DNA-Konzentrationen gemäß den Anweisungen auf dem Bildschirm messen und erfassen.

DNA-Integrität – Genomic DNA ScreenTape

Optional: Dieser Schritt ist wichtig, um das Ausmaß eines etwaigen DNA-Abbaus zu beurteilen.

Beziehen Sie sich auf das Benutzerhandbuch des Herstellers für die Agilent 4200 TapeStation. Die wichtigsten Schritte werden im Folgenden beschrieben:

1. Zur Vorbereitung der Leiter 10 µl Genomic DNA Sample Buffer mit 1 µl Genomic DNA Ladder im ersten Röhrchen/Well des Röhrchenstreifens oder der Platte mischen.

Hinweis: Für jeden Lauf ist eine Leiter erforderlich. Für den Genomic DNA Assay ist keine elektronische Leiter verfügbar.

2. Für jede zu untersuchende Probe 1 µl der DNA-Probe zu 10 µl Probenpuffer hinzugeben.
3. Alle Röhrchen/Wells verschließen.
4. Die Röhrchen oder die Platte für 1 Minute bei 2.000 U/min vortexen und dann kurz zentrifugieren, damit sich die Flüssigkeit am Boden der Platte sammelt.
5. Die Probe kurz zentrifugieren, damit sie sich am Boden der Röhrchen/Wells sammelt.
6. Den Röhrchenstreifen oder die Platte in die Agilent 4200 TapeStation laden.

Hinweis: Bei Verwendung von Röhrchenstreifen daran denken, die Kappen zu entfernen.

7. Die gewünschten Proben in der Steuerungssoftware markieren und die Probennamen in das Probenblatt eintragen.
8. Einen Dateinamen in das Feld „Prefix“ (Präfix) der Steuerungssoftware ein eingeben, um die Ergebnisse zu speichern, und „Start“ wählen.

9. Überprüfen, ob das Elektropherogramm zeigt, dass die Integrität der gDNA intakt ist, mit einer gleichmäßigen Verteilung und einer maximalen Peakgröße > 5.000 bp.
10. Nach der DNA-Elektrophorese mit der Agilent 4200 TapeStation wird eine DNA Integrity Number (DIN) erzeugt. Eine DIN > 7 gibt das Vorhandensein intakter DNA an, während eine DIN < 7 aussagt, dass die DNA zersetzt ist. Wenn eine Probe eine DIN < 7 hat, wenden Sie sich an Ihren Field Application Specialist (FAS).

Reinheit – NanoDrop

Optional: Dieser Schritt ist wichtig, um die Reinheit der DNA-Probe zu beurteilen.

Beziehen Sie sich auf die Bedienungsanleitung des Herstellers für das NanoDrop. Die wichtigsten Schritte werden im Folgenden beschrieben:

1. Die Einstellungen „Nucleic Acid“ (Nukleinsäure) und „DNA-50“ verwenden.
2. Den unteren Messplatz mit Nuklease-freiem Wasser reinigen.
3. 1–2 µl Probenpuffer oder Leerlösung auf den unteren Messplatz pipettieren.
4. Auf „Measure blank“ (Leerlösung messen) klicken.
5. Den unteren Messplatz mit einem fusselfreien Wischtuch reinigen.
6. 1–2 µl von jeder Probe auf den unteren Messplatz pipettieren.
7. Auf „Measure“ (Messen) klicken.
8. Die Messwerte für 260/230, 260/280 und die Konzentration (ng/µl) notieren.

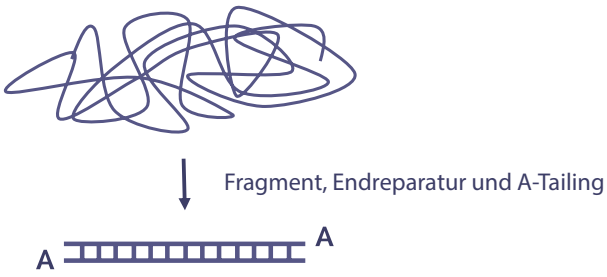
Es werden ein OD 260/280-Verhältnis von 1,8 bis 2,0 und ein OD 260/230-Verhältnis von 2,0 bis 2,2 empfohlen. Die Verwendung von DNA-Proben mit niedrigeren Verhältnissen kann die Leistung beeinträchtigen.

Wenn Sie eine Beratung zur Qualität Ihrer Proben benötigen, wenden Sie sich an Ihren zuständigen OGT Field Application Specialist (FAS).

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 1

DNA-Fragmentierung, Endreparatur und 3‘-End-A-Tailing

Genomische DNA



Übersicht

Die genomische DNA wird enzymatisch fragmentiert. Die fragmentierte dsDNA wird mit den Enzymen im Fragmentierungs- und Endreparatur (ER)-Mix repariert, um glatte Enden zu erzeugen. Gleichzeitig wird ein 3‘-Adenin-Überhang als Vorbereitung für die Adapter-Ligation erzeugt.

Vor dem Start:

- TE-Puffer (blauer Deckel; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen. Auf Raumtemperatur auftauen lassen und auf Eis stellen.

Nur den TE-Puffer (blauer Deckel; ●) aus dem Kit für die Vorbereitung von DNA-Proben (10 mM Tris, 1 mM EDTA) verwenden. Die Verwendung anderer TE-Formulierungen (z. B. 0,1x TE) oder von Wasser kann die Fragmentierungsergebnisse beeinträchtigen.

- Schritt 1: Fragmentierungs- und ER-Puffer (oranger Deckel; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen. Auf Raumtemperatur auftauen lassen und auf Eis stellen. Sicherstellen, dass alle Bestandteile des Puffers aufgelöst sind.

  Es ist nicht ungewöhnlich, dass es im Puffer zu Ausfällung kommt. Sollte dies der Fall sein, den Puffer mehrmals pipettieren, um die Ausfällung aufzubrechen, und anschließend kurz vortexen, bis er aufgelöst ist. Wenn die Ausfällung bestehen bleibt, das Pipettieren von Ausfällungen in den Mastermix vermeiden.

- Schritt 1: Fragmentierungs- und ER-Enzym (oranger Deckel; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und auf Eis stellen.
- Sicherstellen, dass die DNA-Probe(n) mit TE-Puffer (blauer Deckel; ●) auf 20–100 ng/µl vorverdünnt ist/sind.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 1

Schritt 1 durchführen: DNA-Fragmentierung, Endreparatur und 3'-End-A-Tailing

Geschätzte Dauer: 1,25 h für 8–24 Proben. Arbeitszeit: 15 min.

1. Den Thermocycler mit den in Tabelle 1 angegebenen Einstellungen programmieren. Das Programm als „OGT Fragmentierung" speichern.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1	37	20 min
2	65	30 min
3	4	Halten

Tabelle 1: Inkubationsprofil des Programms „OGT Fragmentierung".

2. Den Thermocycler auf 37 °C **vorheizen**. Wenn möglich, den beheizten Deckel auf 75 °C einstellen, oder den voreingestellten beheizten Deckel aktivieren.

3. In PCR-Röhrchenstreifen **200–500 ng** der Proben-DNA mit dem mitgelieferten gekühlten TE-Puffer (blauer Deckel; ●) auf ein Gesamtvolumen von **26,5 µl** verdünnen. In einem Vortexmischer für **3–5 s** mischen, kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen, und auf Eis stellen.

Für SureSeq CLL + CNV V3: 1 x 500 ng Human Reference DNA Female und 1 x 500 ng Human Reference DNA Male in einem Gesamtvolumen von **26,5 µl** für jeden Lauf mit 16 Proben vorbereiten. Die beiden Referenzproben parallel zu den 14 Testproben verarbeiten.

4. Einen neuen Satz PCR-Röhrchenstreifen für die Probe beschriften und auf Eis stellen.

5. Schritt 1: Fragmentierungs- und ER-Puffer und Schritt 1: Fragmentierungs- und ER-Enzym mit einem Vortexmischer für **5–8 s** mischen. Kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen, und auf Eis legen stellen.

⚠ Es ist wichtig, das Fragmentierungs- und ER-Enzym gründlich zu mischen, um eine optimale Leistung zu erzielen.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 1

6. Den Fragmentierungs- und ER-Mastermix gemäß Tabelle 2 in einem frischen 1,5-ml-LoBind-Röhrchen zubereiten und auf Eis stellen.

Reagenz	1x Bibliothek (µl)	8x Bibliothek (µl) (einschließlich 2 Überschüsse)	16x Bibliothek (µl) (einschließlich 2 Überschüsse)	24x Bibliothek (µl) (einschließlich 3 Überschüsse)
DNA-Probe	26,5	–	–	–
Schritt 1: Fragmentierungs- und ER-Puffer (oranger Deckel; ●)	7	70	126	189
Schritt 1: Fragmentierungs- und ER-Enzym (oranger Deckel; ●)	1,5	15	27	40,5
GESAMT	35	85	153	229,5

Tabelle 2: Fragmentierungs- und ER-Mastermix.

7. Den Fragmentierungs- und ER-Mastermix **3–5 s** mit einem Vortexmischer mischen, kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen, und auf Eis aufbewahren.
8. **8,5 µl** Fragmentierungs- und ER-Mastermix in jedes der vorbereiteten leeren Röhrchen aus Schritt 4 geben und auf Eis aufbewahren.
9. Mit einer Mehrkanalpipette **26,5 µl** der DNA-Probe aus Schritt 3 in die Röhrchen aus Schritt 4 geben.

Zügig vorgehen, um eine Überfragmentierung zu vermeiden, da das Enzym bei Raumtemperatur aktiv ist. Die Proben auf Eis aufbewahren, wenn sie nicht im Vortexmischer gemischt oder zentrifugiert werden.

10. Das Röhrchen **sofort für 3 s** mit einem Vortexmischer mischen.
11. Kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen und **sofort** in den **vorgeheizten** Thermocycler übertragen. Das Programm „OGT Fragmentierung“ starten.

Empfehlung: Den Ligations-Mastermix in den letzten 10 min des Thermocycler-Programms vorbereiten.

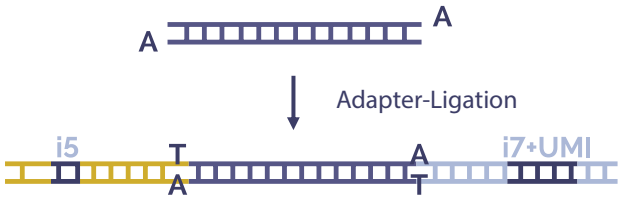
12. Wenn das Programm abgeschlossen ist und der Thermocycler 4 °C erreicht hat, die Proben herausnehmen und auf Eis stellen, bis Sie bereit sind, mit der Adapter-Ligation fortzufahren.

Wir empfehlen, unmittelbar mit „Schritt 2: Adapter-Ligation und Aufreinigung“ fortzufahren. Falls erforderlich, können die Proben bei -20 °C gelagert werden; dadurch verringert sich jedoch möglicherweise der Ertrag (~20 %).

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 2

Adapter-Ligation und Aufreinigung

Übersicht



Unter Verwendung des 3'-Überhangs, der bei der Endreparatur/dem A-Tailing entsteht, und der DNA-Ligase werden Illumina-kompatible Adaptersequenzen an dsDNA-Fragmente ligiert. Die Adapter enthalten Unique Molecular Identifier-Sequenzen (UMI) und eindeutige Probenindizes.

Vor dem Start:

- Die Mag-Bind TotalPure NGS-Beads aus dem Pre-PCR Universal Bead Kit mindestens **30 min vor dem Gebrauch** aus dem Kühlschrank nehmen, damit sie sich auf Raumtemperatur erwärmen können.
- Eine frische 80%ige Ethanollösung aus Ethanol und Wasser in molekularbiologischer Qualität ansetzen.
- Den Schritt 2: Ligation Buffer (gelber Deckel; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und auf Raumtemperatur auftauen. Sicherstellen, dass alle Bestandteile des Ligase-Puffers aufgelöst sind. Falls erforderlich, bei 37 °C inkubieren, bis sie sich aufgelöst haben.
- Die Schritt 2: Ligase (gelber Deckel; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und auf Eis stellen.
- Die Universal Index Adapter-Platte aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und **5–10 min vor dem Gebrauch** auf Eis auftauen lassen. Die Adapterplatte in einer Zentrifuge kurz zentrifugieren. Die Platte immer auf Eis aufbewahren. Nicht über Raumtemperatur erwärmen.
- Index-Adapter sind nur zum einmaligen Gebrauch bestimmt. Wenn nur ein Teil der Platte verwendet wird, die benutzten Adapter-Wells abdecken, um ein Verschütten von überschüssigem Index-Adapter zu vermeiden. Nicht verwendete Adapter können auch in Röhrchenstreifen aliquotiert und unmittelbar vor dem Gebrauch aufgetaut werden.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 2

- Jeder Probe einen anderen Index-Adapter zuweisen. Die Position der Index-Adapter auf der Platte ist Abbildung 2 und Abbildung 3 zu entnehmen.
- OGT empfiehlt die Verarbeitung in Chargen von acht Proben, wobei jeder Pool eine komplette Spalte von der Indexplatte enthält.

Schritt 2 durchführen: Ligation

Geschätzte Dauer: 35 min für 8–24 Proben. Arbeitszeit: 15 min.

1. Den Thermocycler mit den in Tabelle 3 angegebenen Einstellungen programmieren. Das Programm als „OGT Ligation“ speichern.

⚠ Den beheizten Deckel nicht verwenden. Wenn der beheizte Deckel nicht ausgeschaltet werden kann, den Deckel offen lassen.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1	20	20 min
2	4	Halten

Tabelle 3: Inkubationsprofil des Programms „OGT Ligation“.

2. Den Schritt 2: Ligase-Puffer mit einem Vortexmischer für **3–5 s** mischen, kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen, und auf Eis stellen.
3. Die Schritt 2: Ligase durch Schnippen mischen, kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen, und auf Eis stellen.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 2

4. Den Ligations-Mastermix gemäß Tabelle 4 in einem frischen 1,5-ml-LoBind-Röhrchen zubereiten und auf Eis stellen.

Reagenz	1x Bibliothek (µl)	8x Bibliothek (µl) (einschließlich 2 Überschüsse)	16x Bibliothek (µl) (einschließlich 2 Überschüsse)	24x Bibliothek (µl) (einschließlich 3 Überschüsse)
DNA-Probe	35	–	–	–
Index-Adapter	2,5	–	–	–
Schritt 2: Ligase-Puffer (gelber Deckel;)	9	90	162	243
Schritt 2: Ligase (gelber Deckel;)	2	20	36	54
GESAMT	**48,5**	**110**	**198**	**297**

Tabelle 4: Ligations-Mastermix.

5. Den Ligations-Mastermix für **3–5 s** mit einem Vortexmischer mischen, kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen, und auf Eis aufbewahren.
6. **11 µl** des Ligations-Mastermixes zu jedem gekühlten DNA-Probenröhrchen mit dem/den fragmentierten Produkt(en) hinzugeben.
7. **2,5 µl** Index-Adapter zu jedem DNA-Probenröhrchen aus Schritt-6 hinzugeben.
8. Für **3–5 s** mit einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
9. Die Röhrchen **sofort** in den Thermocycler übertragen und das Programm „OGT Ligation“ starten.
10. Wenn das Programm abgeschlossen ist und der Thermocycler 4 °C erreicht hat, die Proben herausnehmen und **sofort** mit dem Schritt „Aufreinigung der ligierten Bibliothek“ fortfahren.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 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

Abbildung 2: Layout der Universal Index Adapter-Platte (1–24). X: leeres Well.

	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

Abbildung 3: Layout der Universal Index Adapter-Platte (1–96).

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 2

Aufreinigung der ligierten Bibliothek durchführen

Geschätzte Arbeitszeit: 50 min für 8–24 Proben.

⚠ Die Beads vor dem Gebrauch mit einem Vortexmischer mindestens für 1 min oder bis die Bead-Lösung homogen und von gleichmäßiger Farbe ist mischen.

Vor dem Start:

1. Einen **frischen** Satz PCR-Röhrchenstreifen für jeden Probenstreifen vorbereiten.
2. **29 µl** homogene Mag-Bind TotalPure NGS-Beads auf Raumtemperatur aus dem Pre-PCR Universal Bead Kit in jedes **leere** Röhrchen geben und die Röhrchen bis zur Verwendung in Schritt 6 beiseite stellen.

Zu den DNA-Probenröhrchen:

3. **11 µl** homogene Mag-Bind TotalPure NGS-Beads auf Raumtemperatur aus dem Pre-PCR Universal Bead Kit in jedes DNA-Probenröhrchen geben. Auf einem Vortexmischer mischen, um die Beads zu resuspendieren, und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
4. Für **5 min** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. **3–5 min**).
6. **60 µl des klaren Überstands, der die DNA-Probe enthält,** in die in Schritt 2 vorbereiteten Röhrchen mit den Beads übertragen. Die benutzten Bead-Pellets können entsorgt werden.
7. Die Röhrchen mit einem Vortexmischer mischen, um die Beads zu resuspendieren, und dann kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
8. Die Röhrchen für **5 min** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. **3–5 min**).
10. Den klaren Überstand ohne das Bead-Pellet (**~88 µl**) entfernen und entsorgen. **Die Beads mit der DNA-Probe behalten.**
11. **200 µl** 80%iges Ethanol in jedes Röhrchen geben, ohne das Bead-Pellet zu resuspendieren.
12. Für **30 s** inkubieren und dann das Ethanol entfernen.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 2

13. Die Waschschritte (Schritt 11 und 12) einmal wiederholen, d. h. insgesamt **zweimal** waschen.
14. Die Röhrchen verschließen und kurz zentrifugieren, um das restliche Ethanol aufzufangen. Die Röhrchen wieder in den Magnetständer stellen. Das restliche Ethanol mit einer P20-Pipette entfernen.
15. Die Bead-Pellets **1–2 min** bei Raumtemperatur trocknen.

Nicht zu stark trocknen, da dies den Ertrag verringert. Das Bead-Pellet ist trocken, wenn das Aussehen der Oberfläche sich von glänzend zu matt ändert. Eine übermäßige Trocknung führt zu Rissen im Bead-Pellet.

16. Vom Magnetständer nehmen und **34 µl** Nuklease-freies Wasser direkt zum Bead-Pellet hinzufügen, um die DNA-Probe zu eluieren. In einem Vortexmischer mischen, um die Beads zu resuspendieren, und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
17. Für **5 min** bei Raumtemperatur inkubieren.

Empfehlung: Wenn Sie mit Schritt 3: Pre-Capture-PCR sofort fortfahren, können der Schritt 3: Primer-Mix und Schritt 3: PCR-Puffer jetzt aus der Lagerung genommen und auf Raumtemperatur aufgetaut werden.

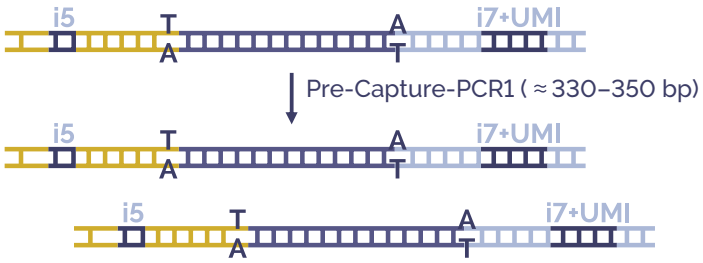
18. Einen neuen Satz PCR-Röhrchenstreifen für die Proben beschriften und beiseite stellen, bis er in Schritt 20 benötigt wird.
19. Die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. **2–3 min**).
20. **32 µl** des Eluats, das die aufgereinigten ligierten Produkte enthält, in die Röhrchen aus Schritt 18 übertragen. Röhrchen mit Beads können zu diesem Zeitpunkt entsorgt werden.
21. Den Ertrag bei Verwendung von **1 µl** ligiertem Produkt mit dem Qubit dsDNA HS Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers beurteilen. Der erwartete Ertrag beträgt > 2 ng/µl.

STOP **OPTIONALER STOPPPUNKT:** Wenn die Proben nicht sofort verwendet werden sollen, bei -20 °C lagern. Falls direkt fortgefahren wird, mit dem Schritt „Pre-Capture-PCR" fortfahren.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 3

Pre-Capture-PCR

Übersicht



Die DNA-Bibliothek wird vor der Hybridisierung und der Target-Capture mittels High Fidelity PCR amplifiziert. Die Anzahl der PCR-Zyklen wird so gering wie möglich gehalten, um die Anzahl der doppelten Reads (PCR-Kopien desselben ursprünglichen DNA-Fragments) in den Sequenzierungsdaten zu reduzieren.

Vor dem Start:

- Den Schritt 3: Primer-Mix (roter Deckel; ●) und Schritt 3: PCR-Puffer (roter Deckel; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und bei Raumtemperatur auftauen lassen.
- Sicherstellen, dass alle Bestandteile des PCR-Puffers gut aufgelöst sind. Falls erforderlich, vortexmischen und/oder bei 37 °C inkubieren, bis sie sich aufgelöst haben.
- Die Schritt 3: PCR-Polymerase (roter Deckel; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und auf Eis stellen.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 3

Schritt 3: Pre-Capture-PCR

Geschätzte Dauer: 45 min für 8–24 Proben. Arbeitszeit: 15 min.

1. Den Thermocycler mit den in Tabelle 5 und Tabelle 6 angegebenen Einstellungen programmieren. Das Programm als „OGT PCR1“ speichern. Wenn möglich, den beheizten Deckel auf 105 °C einstellen, oder den voreingestellten beheizten Deckel aktivieren.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1	98	3 min
2	98	30 s
3	65	30 s
4	72	1 min
5	Schritt 2 bis Schritt 4 entsprechend der in Tabelle 6 angegebenen Anzahl von Zyklen wiederholen.	
6	72	10 min
7	4	Halten

Tabelle 5: Inkubationsprofil des Programms „OGT PCR1“.

DNA-Eintrag	Gesamtzahl der PCR-Zyklen
200–350 ng	6
351–500 ng	5

Tabelle 6: Gesamtzahl der PCR-Zyklen für den empfohlenen Bereich von DNA-Einträgen.

2. Schritt 3: Primer-Mix und Schritt 3: PCR-Puffer für **3–5 s** mit einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
3. Die Schritt 3: PCR-Polymerase durch Schnippen mischen, kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen, und auf Eis aufbewahren.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 3

4. Den Pre-Capture-PCR-Mastermix gemäß Tabelle 7 in einem frischen 1,5-ml-LoBind-Röhrchen zubereiten.

Reagenz	1x Bibliothek (µl)	8x Bibliothek (µl) (einschließlich 2 Überschüsse)	16x Bibliothek (µl) (einschließlich 2 Überschüsse)	24x Bibliothek (µl) (einschließlich 3 Überschüsse)
Adapter-ligierte DNA-Probe	31	–	–	–
Nuklease-freies Wasser (transparenter Deckel; ⚪)	9,5	95	171	256,5
Schritt 3: PCR-Puffer (roter Deckel; 🔴)	5	50	90	135
Schritt 3: Primer-Mix (roter Deckel; 🔴)	2,5	25	45	67,5
Schritt 3: PCR-Polymerase (roter Deckel; 🔴)	2	20	36	54
GESAMT	**50**	**190**	**342**	**513**

Tabelle 7: Pre-Capture-PCR-Mastermix.

5. Den Pre-Capture-PCR-Mastermix für **3–5 s** mit einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
6. **19 µl** des Pre-Capture-PCR-Mastermix zu jedem DNA-Probenröhrchen mit den ligierten Produkten hinzugeben.
7. Für **3–5 s** mit einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
8. Sofort in den Thermocycler übertragen und das Programm „OGT PCR1“ starten.

Aufreinigung für die Pre-Capture-PCR durchführen

Geschätzte Arbeitszeit: 40 min für 8–24 Proben.

⚠ Die Beads vor dem Gebrauch mit einem Vortexmischer mindestens für 1 min oder bis die Bead-Lösung homogen und von gleichmäßiger Farbe ist mischen.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 3

Zu den DNA-Probenröhrchen:

1. **45 µl** homogene Mag-Bind TotalPure NGS-Beads auf Raumtemperatur aus dem Post-PCR Universal Bead Kit in jedes DNA-Probenröhrchen geben. In einem Vortexmischer mischen, um die Beads zu resuspendieren, und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
2. Die Röhrchen für **5 min** bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. **3–5 min**).
4. Den klaren Überstand ohne das Bead-Pellet (**~90 µl**) entfernen und entsorgen. **Die Beads mit der DNA-Probe behalten.**
5. **200 µl** 80%iges Ethanol in jedes Röhrchen geben, ohne das Bead-Pellet zu resuspendieren.
6. Für **30 s** inkubieren und dann das Ethanol entfernen.
7. Den Waschvorgang (Schritt 5 und 6) einmal wiederholen, d. h. insgesamt zweimal waschen.
8. Die Röhrchen verschließen und kurz zentrifugieren, um das restliche Ethanol aufzufangen. Die Röhrchen wieder in den Magnetständer stellen. Das restliche Ethanol mit einer P20-Pipette entfernen.
9. Die Bead-Pellets **1–2 min** bei Raumtemperatur trocknen.

⚠ Nicht zu stark trocknen, da dies den Ertrag verringert. Das Bead-Pellet ist trocken, wenn das Aussehen der Oberfläche sich von glänzend zu matt ändert. Eine übermäßige Trocknung führt zu Rissen im Bead-Pellet.

10. Vom Magnetständer nehmen und **25 µl** Nuklease-freies Wasser direkt zum Bead-Pellet hinzufügen, um die DNA-Probe zu eluieren. In einem Vortexmischer mischen, um die Beads zu resuspendieren, und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
11. Für **5 min** bei Raumtemperatur inkubieren.
12. Einen neuen Satz PCR-Röhrchenstreifen für die Proben beschriften und beiseite stellen, bis er in Schritt 14 benötigt wird.
13. Die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. **2–3 min**).
14. **24 µl** des Eluats, das die aufgereinigten ligierten Produkte enthält, in die Röhrchen aus Schritt 12 übertragen. Röhrchen mit Beads können zu diesem Zeitpunkt entsorgt werden.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 3

15. Die Größe des amplifizierten Produkts mit dem Agilent D1000 ScreenTape System bestimmen. Das Elektropherogramm sollte eine Peakgröße von 330–350 bp (+/- 20 bp) zeigen (Abbildung 4). Das Gerät einrichten und das Tape, die Proben und die Leiter entsprechend den Anweisungen des Herstellers vorbereiten.

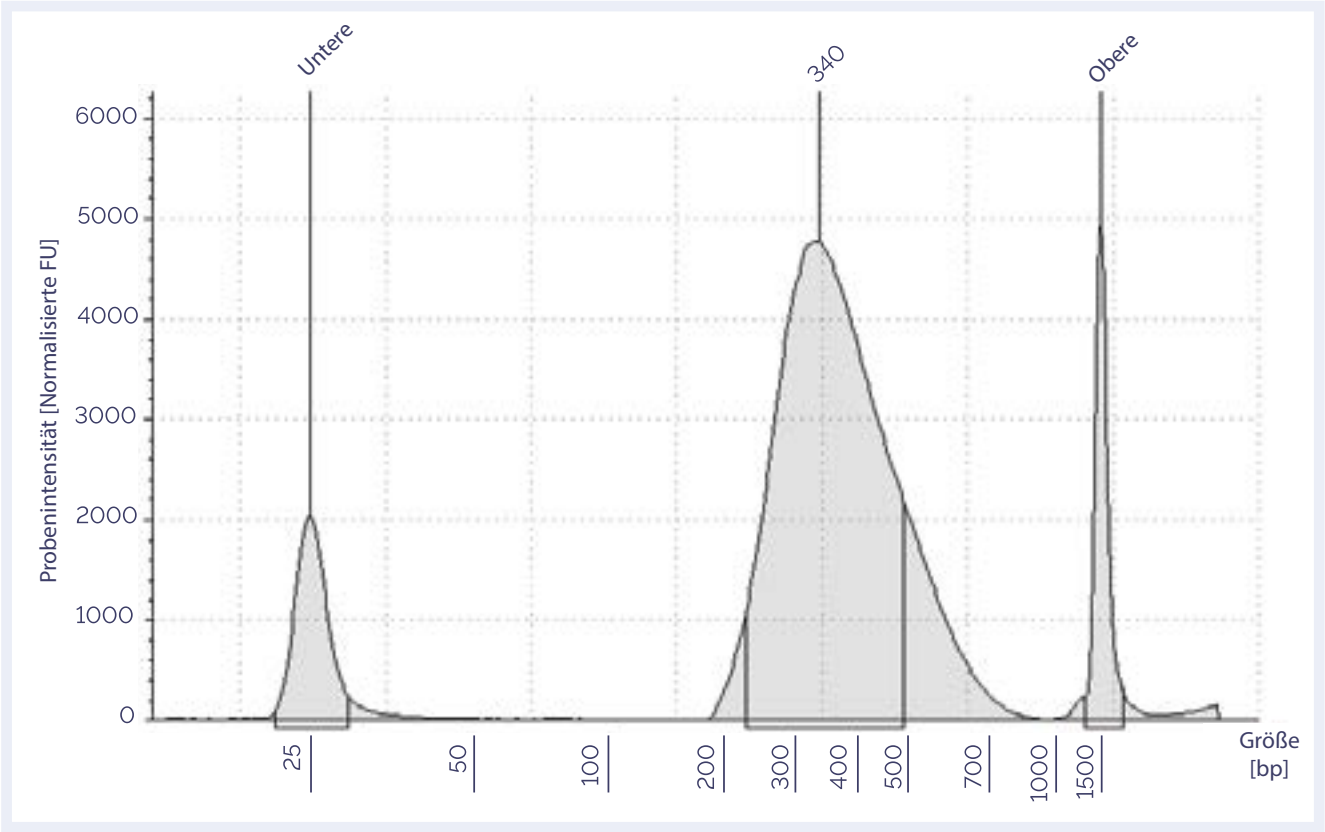


Abbildung 4: Elektropherogramm des aufgereinigten Pre-Capture-PCR-Produkts, das mit einem Agilent D1000 ScreenTape Assay erzeugt wurde. Das Elektropherogramm zeigt einen maximalen Peak im Größenbereich von etwa 330–350 bp (+/- 20 bp).

Fragmentgrößen außerhalb dieses Bereichs können die Qualität der Sequenzdaten beeinträchtigen. Wenn Sie weitere Beratung benötigen, wenden Sie sich an Ihren zuständigen Field Application Specialist (FAS).

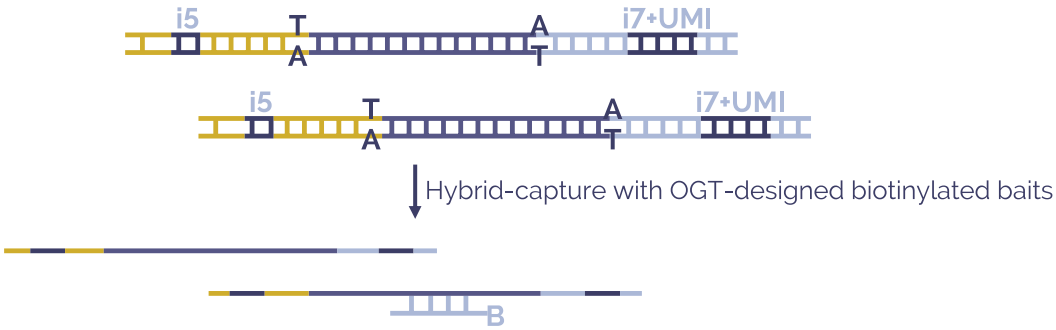
16. Den Ertrag bei Verwendung von **1 µl** amplifiziertem Produkt mit dem Qubit dsDNA HS Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers beurteilen. Der erwartete Ertrag beträgt > 18 ng/µl (~400 ng pro Bibliothek).

Es wird empfohlen, eine Einkanalpipette zu verwenden und darauf zu achten, dass sich keine überschüssige Flüssigkeit an der Seite der Spitze befindet, um ungenaue Messwerte zu vermeiden, die sich auf das Pooling auswirken können.

STOP **OPTIONALER STOPPPUNKT:** Wenn die Proben nicht sofort verwendet werden sollen, über Nacht bei 4 °C oder für eine langfristige Lagerung bei -20 °C lagern. Falls direkt fortgefahren wird, mit dem Schritt „Universelle Hybridisierung" fortfahren.

Universelle Hybridisierung

Übersicht



Die amplifizierte Bibliothek wird denaturiert und mit SureSeq oder CytoSure NGS-Baits (biotinyliert) erfasst.

Vor dem Start:

- Die Mag-Bind TotalPure NGS-Beads aus dem Post-PCR Universal Bead Kit mindestens **30 min vor dem Gebrauch** aus dem Kühlschrank nehmen, damit sie sich auf Raumtemperatur erwärmen können.
- Eine frische Lösung aus 80%igem Ethanol aus Ethanol und Wasser in molekularbiologischer Qualität ansetzen.
- Den Hybridisierungspuffer (roter Deckel; ●), das Formamid (gelber Deckel; ●), die Cot Human DNA (grüner Deckel; ●), die Index-Blocker (blauer Deckel; ●) und das Nuklease-freie Wasser (durchsichtiger Deckel; ○) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und auf Raumtemperatur auftauen lassen.
- Die SureSeq oder CytoSure Baits aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und auf Raumtemperatur auftauen lassen.
- Sicherstellen, dass alle Bestandteile des Hybridisierungspuffers gut aufgelöst sind. Falls erforderlich, bei 37 °C inkubieren, bis sie sich aufgelöst haben.

Bibliotheksvorbereitung: Universelle Hybridisierung

Vorbereitung des Hybridisierungs-Mastermixes

Geschätzte Dauer: 5 min für 8–24 Proben. Arbeitszeit: 5 min.

1. Den Hybridisierungspuffer, das Formamid, die Cot Human DNA, die panel-spezifischen Baits und die Index-Blocker mit einem Vortexmischer für **3–5 s** vortexmischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
2. Den Hybridisierungs-Mastermix gemäß Tabelle 8 in einem frischen 1,5-ml-LoBind-Röhrchen zubereiten.

Reagenz	1x Pool (µl)	2x Pool (µl) (einschließlich 0,5 Überschüsse)	3x Pool (µl) (einschließlich 0,5 Überschüsse)
Nuklease-freies Wasser (transparenter Deckel; ◯)	2,5	6,25	8,75
Hybridisierungspuffer (roter Deckel; 🔴)	7,5	18,75	26,25
Formamid (gelber Deckel; 🟡)	3,5	8,75	12,25
GESAMT	**13,5**	**33,75**	**47,25**

Tabelle 8: Hybridisierungs-Mastermix.

3. In einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
4. **Sofort** mit dem Schritt „Proben poolen und hybridisieren, um Baits zu erfassen“ fortfahren.

Proben poolen und hybridisieren, um Baits zu erfassen

Geschätzte Dauer: 40 min für 8–24 Proben.

Für die Hybridisierungsreaktion müssen gleiche DNA-Einträge von jeder Probe zu einem 8-Proben-Pool kombiniert werden. Für jeden Pool eine Hybridisierungs-Capture durchführen. Die Hybridisierung wird am besten mit dem maximal möglichen Eintrag pro Probe durchgeführt, bis zu 500 ng. Bei einem Bibliotheksertrag von weniger als 500 ng ist der Eintrag aller Proben auf den niedrigsten Ertrag im Hybridisierungspool zu reduzieren.

1. Die Volumen des Pre-Capture-PCR-Produkts berechnen, die erforderlich sind, um acht Bibliotheken zu einem Hybridisierungspool zu kombinieren.

⚠ Verwenden Sie keine Einträge unter 300 ng pro Probe; wenden Sie sich für weitere Unterstützung an den **OGT Support**.

Bibliotheksvorbereitung: Universelle Hybridisierung

2. Die gleiche Menge des gereinigten, amplifizierten Produkts aus Schritt 3 (**300–500 ng**) von jeder der acht Bibliotheken in einem Pool in ein 1,5-ml-LoBind-Röhrchen aliquotieren.

   Für das SureSeq CLL+CNV V3 Panel: 1 x SureSeq Referenzbibliothek pro Pool einschließen, zusammen mit 7 weiteren Bibliotheken. 1 x SureSeq Reference Female und 1 x SureSeq Reference Male – insgesamt müssen 2 Referenzproben in einem Sequenzierungslauf mit 16 Proben enthalten sein.

3. **10 µl** Cot Human DNA (grüner Deckel; ●) zu jedem Pool zugeben.

4. In einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.

⚠ Die Beads vor dem Gebrauch mit einem Vortexmischer mindestens für 1 min oder bis die Bead-Lösung homogen und von gleichmäßiger Farbe ist mischen.

5. **2 x** Volumen Mag-Bind TotalPure NGS-Beads aus dem Post-PCR Universal Bead Kit zu jedem Pool hinzugeben.
   Beispiel: Zu einem 60-µl-Hybridisierungspool (+ 10 µl Cot Human DNA) 140 µl Beads zugeben.

6. Auf einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.

7. Für **5 min** bei Raumtemperatur inkubieren.

8. Das/die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. **3–5 min**).

9. Den klaren Überstand ohne das Bead-Pellet entfernen und entsorgen.
   Die Beads mit der DNA-Probe behalten.

10. **500 µl** 80%iges Ethanol in jedes Röhrchen geben, ohne das Bead-Pellet zu resuspendieren.

11. Für **30 s** inkubieren und dann das Ethanol entfernen.

12. Das Pellet **ca. für 5 min** oder bis zur vollständigen Evaporation des restlichen Ethanols trocknen.

⚠ Nicht zu stark trocknen, da dies den Ertrag verringert. Das Bead-Pellet ist trocken, wenn das Aussehen der Oberfläche sich von glänzend zu matt ändert. Eine übermäßige Trocknung führt zu Rissen im Bead-Pellet.

13. Das/die Röhrchen vom Magnetständer nehmen und **13,5 µl** des Hybridisierungs-Mastermixes direkt zum Bead-Pellet geben, um die gepoolten DNA-Bibliotheken zu eluieren. In einem Vortexmischer mischen, um die Beads zu resuspendieren, und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.

⚠ Sicherstellen, dass die Beads gut resuspendiert sind. Größere Bead-Volumen müssen möglicherweise länger auf dem Vortexmischer gemischt werden, um eine vollständige Resuspension sicherzustellen.

Bibliotheksvorbereitung: Universelle Hybridisierung

14. Für **5 min** bei Raumtemperatur inkubieren.
15. Einen neuen Satz PCR-Röhrchenstreifen für den/die Pool(s) beschriften und beiseite stellen, bis er in Schritt 17 benötigt wird.

Empfehlung: Den Thermocycler mit den in Tabelle 9 angegebenen Einstellungen programmieren. Das Programm als „OGT Hybridisierung“ speichern.

16. Das/die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. **2–3 min**).
17. **13 µl** des Eluats in die Röhrchen aus Schritt 15 übertragen. Röhrchen mit Beads können zu diesem Zeitpunkt entsorgt werden.
18. **2 µl** Index-Blocker (blauer Deckel; ●) zu dem/den Pool(s) hinzugeben.
19. **2 µl** der panel-spezifischen Baits zu dem/den Pool(s) hinzugeben.
20. Die Röhrchen verschließen, mit einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen. Das Endvolumen sollte **17 µl** betragen.
21. Sicherstellen, dass alle Kappen fest verschlossen sind.
22. Die Röhrchen in den Thermocycler einsetzen und das in Tabelle 9 angegebene Programm „OGT Hybridisierung“ ausführen. Wenn möglich, den beheizten Deckel auf 105 °C einstellen, oder den voreingestellten beheizten Deckel aktivieren.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1	95	5 min
2	65	Halten

Tabelle 9: Inkubationsprofil des Programms „OGT Hybridisierung“.

23. Die Hybridisierungsmischung über Nacht (**16–20 h**) bei 65 °C inkubieren.

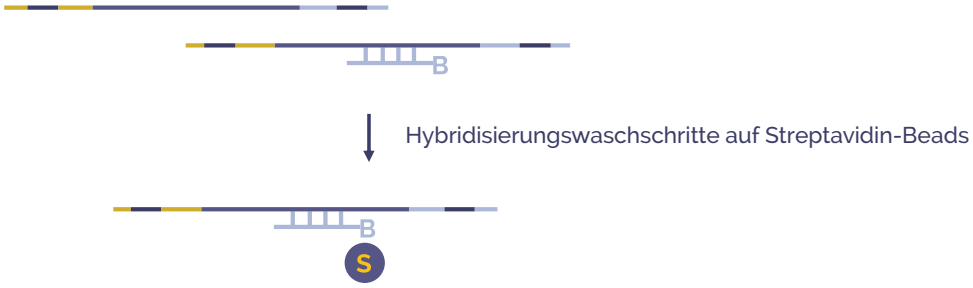
Eine Inkubation über mehr als 24 Stunden vermeiden, da sonst das Risiko von Evaporation steigt.

24. Mit dem Schritt „Universelle Capture und Waschen“ fortfahren.

Den Hybridisierungs-Waschpuffer (blauer Punkt; ●) und den Bead-Priming-Puffer (oranger Deckel/Punkt; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und auf Raumtemperatur auftauen lassen. Diese können über Nacht zum Auftauen auf dem Labortisch belassen werden.

Universelle Capture und Waschen

Übersicht



Die hybridisierten Targets werden an Streptavidin-Beads gebunden und ausgewaschen, um jegliche Off-Target-DNA zu entfernen.

Geschätzte Dauer: 1,25 h für 8–24 Proben. Arbeitszeit: 45 min.

Vor dem Start:

- Einen Thermocycler mindestens **30 min vor dem Gebrauch** auf 65 °C vorheizen.
- Einen Thermocycler mindestens **30 min vor dem Gebrauch** auf 35 °C vorheizen.

⚠ Es ist wichtig, die richtige Temperatur aufrechtzuerhalten; es wird empfohlen, die Temperatur mit einem geeichten Thermometer zu überprüfen.

- Die Dynabeads M-270 Streptavidin Magnetbeads aus dem Post-PCR Universal Bead Kit mindestens **30 min vor dem Gebrauch** aus dem Kühlschrank nehmen, damit sie sich auf Raumtemperatur erwärmen können.
- Den Hybridisierungs-Waschpuffer (blauer Punkt; ●) und den Bead-Priming-Puffer (oranger Deckel/Punkt; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und auf Raumtemperatur auftauen lassen. Diese können über Nacht zum Auftauen auf dem Labortisch belassen werden.

Bibliotheksvorbereitung: Universelle Capture und Waschen

Hybridisierungs-Waschpuffer nur zur Verwendung mit dem CytoSure Constitutional NGS Panel vorbereiten

- Das CytoSure Constitutional NGS Panel erfordert die Zugabe von Komponente A (brauner Deckel; ●) zu den Flaschen mit Hybridisierungs-Waschpuffer.

⚠ Komponente A ist **nicht** für SureSeq Krebspanels erforderlich.

1. Komponente A (brauner Deckel; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und auf Raumtemperatur auftauen lassen.
2. Das für die jeweilige Kitgröße erforderliche Volumen ist in Tabelle 10 angegeben.

Kitgröße	Zur Hybridisierungs-Waschpufferflasche zuzugebendes Volumen von Komponente A (µl)
24 Reaktionen	100
96 Reaktionen	180 (pro Flasche Hybridisierungs-Waschpuffer)

Tabelle 10: Zur Hybridisierungs-Waschpufferflasche zuzugebendes Volumen von Komponente A.

3. Die Flasche beschriften, um anzugeben, dass Komponente A hinzugefügt wurde.
4. Die Flasche nach Zugabe von Komponente A 10 Mal umdrehen.

Sequenzerfassungs- und Bead-Waschpuffer vorbereiten

1. Sicherstellen, dass der Hybridisierungs-Waschpuffer und der Bead-Priming-Puffer vollständig aufgetaut sind.

⚠ 5–10 min bei 37 °C inkubieren, um eventuelle Ausfällungen zu resuspendieren. Diese Puffer können während der Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur aufgetaut werden.

2. **6 x 200 µl** des Hybridisierungs-Waschpuffers pro Hybridisierungspool in PCR-Röhrchenstreifen aliquotieren, wie in Abbildung 5 für einen Hybridisierungspool gezeigt.

Bibliotheksvorbereitung: Universelle Capture und Waschen

3. Die Aliquots in einem Heizblock mindestens **30 min vor dem Gebrauch** auf die folgenden Temperaturen vorwärmen:

- 3 x 200 µl bei 65 °C/Pool
- 3 x 200 µl bei 35 °C/Pool

Pool 1	Pool 1
W1 ●	W1 ●
W2 ●	W2 ●
W3 ●	W3 ●
65 °C-Waschschritte	35 °C-Waschschritte

Abbildung 5: Zusammenstellung der Hybridisierungs-Waschpuffer-Aliquots für einen Hybridisierungspool.

Magnetbeads vorbereiten

1. Die Dynabeads M-270 Streptavidin Magnetbeads im Vortexmischer für **1 min** gut vortexen, dabei die Ausrichtung des Röhrchens **alle 15 s** ändern.

⚠ Sicherstellen, dass das Bead-Pellet vollständig vom Boden oder den Seiten des Röhrchens entfernt ist, da die Zugabe überschüssiger Beads nachfolgende Prozesse beeinträchtigt. Die Magnetbeads nach dem Mischen nicht kurz zentrifugieren.

2. Unmittelbar vor dem Gebrauch die Dynabeads M-270 Streptavidin Magnetbeads auf Raumtemperatur mit einer auf **100 µl** eingestellten **200-µl**-Pipette resuspendieren und mindestens **10 Mal** mit der Pipette auf und ab mischen.

Bibliotheksvorbereitung: Universelle Capture und Waschen

3. **100 µl** der Dynabeads M-270 Streptavidin Magnetbeads in ein neues PCR-Röhrchen geben; eines pro Hybridisierungspool.

Alternative: Bis zu 400 µl Beads (für vier Hybridisierungspools) können auf einmal in einem einzelnen 1,5-ml-LoBind-Röhrchen gewaschen werden.

4. Das/die Röhrchen in einen Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. **10 s**).
5. Den klaren Überstand (**~100 µl**) ohne das Bead-Pellet entfernen und entsorgen.
6. **200 µl** 1x Bead-Priming-Puffer pro **100 µl** Beads zugeben. In einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
7. Das/die Röhrchen wieder in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. **10 s**).
8. Den klaren Überstand (**~200 µl**) ohne das Bead-Pellet entfernen und entsorgen.
9. Die Schritte 6–8 einmal wiederholen, d. h. insgesamt **zweimal** waschen.
10. Vom Magnetständer nehmen und das ursprüngliche Volumen des Bead-Priming-Puffers zugeben (d. h. für 100 µl Beads 100 µl Bead-Priming-Puffer zugeben), mit einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
11. Wenn mehr als **100 µl** Beads pro Röhrchen gewaschen werden, einen neuen Satz PCR-Röhrchenstreifen beschriften und die Beads in das/die neuen PCR-Röhrchen übertragen (100 µl/Pool).
12. Das/die Röhrchen in einen Magnetständer stellen, warten, dass sich die Beads vom Überstand trennen und dann den Überstand vorsichtig entfernen und entsorgen.

Sofort mit dem Schritt „Hybrid-Capture durchführen“ fortfahren. Die Beads nicht austrocknen lassen. Geringe Rückstände von Bead-Priming-Puffer beeinträchtigen nicht die nachfolgende Bindung der DNA an die Dynabeads M-270 Streptavidin Magnetbeads.

Bibliotheksvorbereitung: Universelle Capture und Waschen

Hybrid-Capture durchführen

1. Nach der Inkubation über Nacht die hybridisierten Proben auf dem Thermocycler lassen und alle hybridisierten Proben (**~17 µl** Volumen) auf die vorbereiteten Streptavidin-Beads übertragen.
2. Für **3–5 s** mit einem Vortexmischer gründlich mischen und sicherstellen, dass die Beads resuspendiert sind. Kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
3. Das/die Röhrchen wieder in den Thermocycler zurückstellen, auf dem weiterhin das Programm „OGT Hybridisierung“ für **45 min** ausgeführt wird.
4. **Alle 15 min** mit einem Vortexmischer für **3 s** mischen und anschließend kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen. Dadurch wird sichergestellt, dass die Beads suspendiert bleiben. Das/die Röhrchen wieder in einen Thermocycler stellen, auf dem das Programm „OGT Hybridisierung“ ausgeführt wird.
5. Nach der 45-minütigen Inkubation das/die Röhrchen aus dem Thermocycler nehmen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen. **Sofort** mit dem nächsten Schritt „Streptavidin-Beads waschen, um ungebundene DNA zu entfernen“ fortfahren.

Das Thermocycler-Programm „OGT Hybridisierung“ laufen lassen.

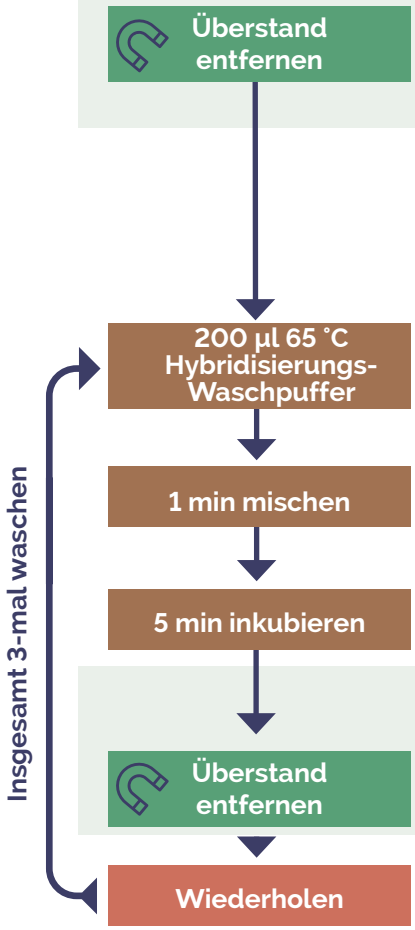
Streptavidin-Beads waschen, um ungebundene DNA zu entfernen

Schnell arbeiten, um sicherzustellen, dass die Temperatur nicht wesentlich unter 65 °C fällt. Um dies zu erreichen, empfehlen wir, alle Waschvorgänge in PCR-Röhrchenstreifen durchzuführen und eine Mehrkanalpipette zu verwenden.

Nach der Zugabe von frischem Puffer sicherstellen, dass das Pellet vollständig resuspendiert wurde, indem es kurz mit einem Vortexmischer gemischt und anschließend visuell überprüft wird. Zum Mischen keine Pipette verwenden.

Bibliotheksvorbereitung: Universelle Capture und Waschen

Heißwaschschritte bei 65 °C



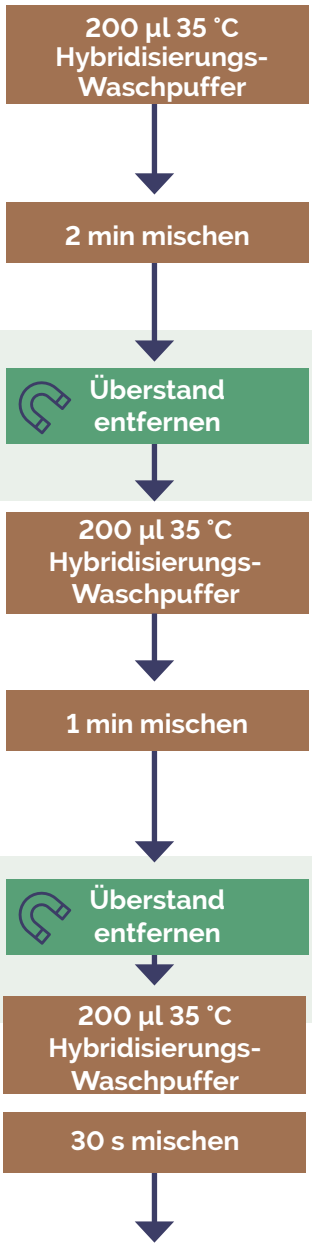
1. Das/die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. 10 s).
2. Den klaren Überstand mit ungebundener DNA (~**17 µl**) ohne das Bead-Pellet entfernen und entsorgen.

⚠ Der Hybridisierungsmix enthält Formamid.

3. Das/die Röhrchen vom Magnetständer nehmen.
4. **200 µl** des (auf 65 °C) vorgewärmten Hybridisierungs-Waschpuffers zu den Capture-Beads (mit gebundener DNA) geben.
5. Auf einem Vortexmischer mischen, um das Bead-Pellet aufzubrechen. Überprüfen, ob das Bead-Pellet vollständig resuspendiert wurde.
6. Das/die Röhrchen in einem Platten-Vortexmischer platzieren und bei ca. 2.000 U/min für **1 min** kräftig mischen.
7. Die Röhrchen wieder im Thermocycler platzieren und das Programm „OGT Hybridisierung" **5 min** laufen lassen.
8. Kurz zentrifugieren und das/die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. 10 s).
9. Den klaren Überstand mit ungebundener DNA (~**200 µl**) ohne das Bead-Pellet entfernen und entsorgen.
10. Die Schritte 3–9 zwei Mal wiederholen, d. h. insgesamt dreimal waschen bei 65 °C.
11. Das/die Röhrchen vom Magnetständer nehmen.
12. **Sofort** mit dem nächsten Schritt „Waschschritte bei 35 °C mit Schütteln" fortfahren.

Bibliotheksvorbereitung: Universelle Capture und Waschen

Waschschritte bei 35 °C mit Schütteln



1. **200 µl** des (auf 35 °C) vorgewärmten Hybridisierungs-Waschpuffers zu den Capture-Beads geben.
2. Auf einem Vortexmischer mischen, um das Bead-Pellet aufzubrechen. Überprüfen, ob das Bead-Pellet vollständig resuspendiert wurde.
3. Das/die Röhrchen in einem Platten-Vortexmischer platzieren und bei ca. 2.000 U/min für **2 min** kräftig mischen.
4. Kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
5. Das/die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. 10 s).
6. Den klaren Überstand mit ungebundener DNA (~**200 µl**) ohne das Bead-Pellet entfernen und entsorgen.
7. **200 µl** des (auf 35 °C) vorgewärmten Hybridisierungs-Waschpuffers zu den Capture-Beads geben.
8. Auf einem Vortexmischer mischen, um das Bead-Pellet aufzubrechen. Überprüfen, ob das Bead-Pellet vollständig resuspendiert wurde.
9. Das/die Röhrchen in einem Platten-Vortexmischer platzieren und bei ca. 2.000 U/min für **1 min** kräftig mischen.
10. Kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
11. Das/die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. 10 s).
12. Den klaren Überstand mit ungebundener DNA (~**200 µl**) ohne das Bead-Pellet entfernen und entsorgen.
13. **200 µl** des (auf 35 °C) vorgewärmten Hybridisierungs-Waschpuffers zu den Capture-Beads geben.
14. Auf einem Vortexmischer mischen, um das Bead-Pellet aufzubrechen. Überprüfen, ob das Bead-Pellet vollständig resuspendiert wurde.

Bibliotheksvorbereitung: Universelle Capture und Waschen

Waschschritte bei 35 °C mit Schütteln (Fortsetzung)

15. Das/die Röhrchen in einem Platten-Vortexmischer platzieren und bei ca. 2.000 U/min für **30 s** kräftig mischen.

> ⚠ Nicht länger als 30 s mischen.

16. Kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.

Überstand entfernen

17. Das/die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. 10 s).
18. Den klaren Überstand (~**200 µl**) ohne das Bead-Pellet entfernen und entsorgen.
19. Kurz zentrifugieren, um den verbleibenden Waschpuffer aufzufangen. Das/die Röhrchen wieder auf den Magnetständer stellen und den verbleibenden Waschpuffer mit einer P20-Pipette entfernen.

30 µl NFW hinzufügen und mischen

20. Das/die Röhrchen vom Magnetständer nehmen und **30 µl** Nuklease-freies Wasser zugeben, um das Bead-Pellet zu resuspendieren.
21. Auf einem Vortexmischer mischen, um eine Bead-Aufschlämmung zu bilden.

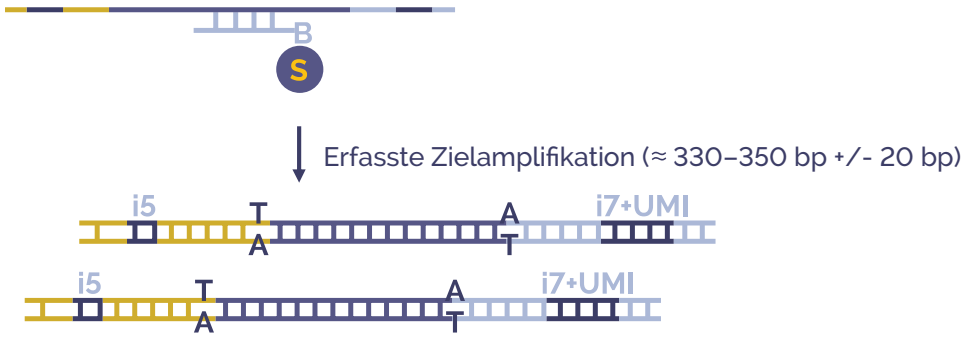
Empfehlung: Wenn Sie sofort mit Schritt 4: Post-Capture-PCR fortfahren, können der Schritt 4: Primer-Mix und Schritt 4: PCR-Puffer jetzt aus der Lagerung genommen und auf Raumtemperatur aufgetaut werden.

STOP **OPTIONALER STOPPPUNKT:** Wenn die Proben nicht sofort verwendet werden sollen, die Bead-Aufschlämmung bei 4 °C lagern. Die Bead-Aufschlämmung nicht einfrieren. Falls direkt fortgefahren wird, mit dem Schritt „Post-Capture-PCR" fortfahren.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 4

Post-Capture-PCR

Übersicht



Nach der Erfassung der Target-Fragmente wird die an die Streptavidin-Beads gebundene ssDNA amplifiziert.

Vor dem Start:

- Die Mag-Bind TotalPure NGS-Beads aus dem Post-PCR Universal Bead Kit mindestens **30 min vor dem Gebrauch** aus dem Kühlschrank nehmen, damit sie sich auf Raumtemperatur erwärmen können.
- Eine frische Lösung aus 80%igem Ethanol aus Ethanol und Wasser in molekularbiologischer Qualität ansetzen.
- Den Schritt 4: Primer-Mix (violetter Deckel; ●) und Schritt 4: PCR-Puffer (violetter Deckel; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und bei Raumtemperatur auftauen lassen.
- Sicherstellen, dass alle Bestandteile des PCR-Puffers aufgelöst sind. Falls erforderlich, vortexmischen und/oder bei 37 °C inkubieren, bis sie sich aufgelöst haben.
- Die Schritt 4: PCR-Polymerase (violetter Deckel; ●) aus der Lagerung (-15 °C bis -25 °C) nehmen und auf Eis stellen.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 4

Schritt 4: Post-Capture-PCR durchführen

Geschätzte Dauer: 1,25 h für 8–24 Proben. Arbeitszeit: 15 min.

1. Den Thermocycler mit den in Tabelle 11 und Tabelle 12 angegebenen Einstellungen programmieren. Das Programm als „OGT PCR2“ speichern. Wenn möglich, den beheizten Deckel auf 105 °C einstellen, oder den voreingestellten beheizten Deckel aktivieren.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1	98	3 min
2	98	30 s
3	65	30 s
4	72	1 min
5	Schritt 2 bis Schritt 4 für die in Tabelle 12 angegebenen Gesamtzahl von Zyklen wiederholen.	
6	72	10 min
7	4	Halten

Tabelle 11: Inkubationsprofil des Programms „OGT PCR2“.

Gesamtzahl der PCR-Zyklen	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

Tabelle 12: Gesamtzahl der PCR-Zyklen für verschiedene OGT NGS-Panels. Hinweis: Wenn Sie ein kundenspezifisches MyPanel verwenden, wenden Sie sich bitte an Ihren zuständigen FAS, um die Anzahl der PCR-Zyklen zu erfragen.

2. Schritt 4: Primer-Mix und Schritt 4: PCR-Puffer für **3–5 s** mit einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.

3. Die Schritt 4: PCR-Polymerase durch Schnippen mischen, kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen, und auf Eis aufbewahren.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 4

4. Für mehrere Pools den Pre-Capture-PCR-Mastermix gemäß Tabelle 13 in einem frischen 1,5-ml-LoBind-Röhrchen zubereiten.

Reagenz	1x Pool (µl)	2x Pool (µl) (einschließlich 0,5 Überschüsse)	3x Pool (µl) (einschließlich 0,5 Überschüsse)
Erfasste cDNA in Bead-Aufschlämmung	14	–	–
Nuklease-freies Wasser (transparenter Deckel; ○)	26,5	66,25	92,75
Schritt 4: PCR-Puffer (violetter Deckel; ●)	5	12,5	17,5
Schritt 4: Primer-Mix (violetter Deckel; ●)	2,5	6,25	8,75
Schritt 4: PCR-Polymerase (violetter Deckel; ●)	2	5	7
GESAMT	**50**	**90**	**126**

Tabelle 13: Post-Capture-PCR-Mastermix.

5. Den Post-Capture-PCR-Mastermix für **3–5 s** mit einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
6. Für jede PCR-Reaktion einen neuen Satz PCR-Röhrchenstreifen beschriften.
7. **36 µl** des Post-Capture-PCR-Mastermix in das/die Röhrchen aus Schritt 5 geben.
8. Mit der Pipette mindestens 10 Mal auf und ab mischen, um die Bead-Aufschlämmung zu resuspendieren und sicherzustellen, dass die Beads homogen sind. **Sofort 14 µl** der gut gemischten Bead-Aufschlämmung in jedes Röhrchen geben.
9. Mindestens 10 Mal mit der Pipette mischen.
10. In den Thermocycler übertragen und das Programm „OGT PCR2“ starten.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 4

Post-Capture-PCR-Aufreinigung durchführen

Geschätzte Dauer: 40 min für 8–24 Proben.

⚠ Die Beads vor dem Gebrauch mit einem Vortexmischer mindestens für 1 min oder bis die Bead-Lösung homogen und von gleichmäßiger Farbe ist mischen.

Zu den DNA-Probenröhrchen:

1. **45 µl** homogene Mag-Bind TotalPure NGS-Beads auf Raumtemperatur aus dem Post-PCR Universal Bead Kit in jedes DNA-Probenröhrchen geben. In einem Vortexmischer mischen, um die Beads zu resuspendieren, und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
2. Die Röhrchen für **5 min** bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Das/die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. **3–5 min**).
4. Den klaren Überstand (**~95 µl**) ohne das Bead-Pellet entfernen und entsorgen. **Die Beads mit der DNA-Probe behalten**.
5. **200 µl** 80%iges Ethanol in jedes Röhrchen geben, ohne das Bead-Pellet zu resuspendieren.
6. Für **30 s** inkubieren und dann das Ethanol entfernen.
7. Die Waschschritte (Schritt 5 und 6) einmal wiederholen, d. h. insgesamt zweimal waschen.
8. Das/die Röhrchen verschließen und kurz zentrifugieren, um das restliche Ethanol aufzufangen. Die Röhrchen für **30 s** wieder in den Magnetständer stellen. Das restliche Ethanol mit einer P20-Pipette entfernen.
9. Das/die Bead-Pellet(s) **1–2 min** bei Raumtemperatur trocknen.

⚠ Nicht zu stark trocknen, da dies den Ertrag verringert. Das Bead-Pellet ist trocken, wenn das Aussehen der Oberfläche sich von glänzend zu matt ändert. Eine übermäßige Trocknung führt zu Rissen im Bead-Pellet.

10. Vom Magnetständer nehmen und **32 µl** Nuklease-freies Wasser direkt zum Bead-Pellet hinzufügen, um die DNA-Probe zu eluieren. In einem Vortexmischer mischen und kurz zentrifugieren, um den Inhalt aufzufangen.
11. Für **5 min** bei Raumtemperatur inkubieren.

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 4

12. Einen neuen Satz PCR-Röhrchenstreifen für das/die Eluat(e) beschriften und beiseite stellen, bis er in Schritt 14 benötigt wird.

13. Das/die Röhrchen in den Magnetständer stellen und warten, bis die Lösung klar ist (ca. **2–3 min**).

14. **30 µl** des Eluats, welches das/die aufgereinigte(n) Post-Capture-PCR-Produkt(e) enthält, in das/die Röhrchen aus Schritt 12 übertragen. Das/die Röhrchen mit Beads können zu diesem Zeitpunkt entsorgt werden.

15. Die Größe des amplifizierten Produkts mit dem Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System bestimmen. Das Elektropherogramm sollte eine Peakgröße von 330–350 bp (+/- 20 bp) zeigen (Abbildung 6). Das Gerät einrichten und das Tape, die Proben und die Leiter entsprechend den Anweisungen des Herstellers vorbereiten.

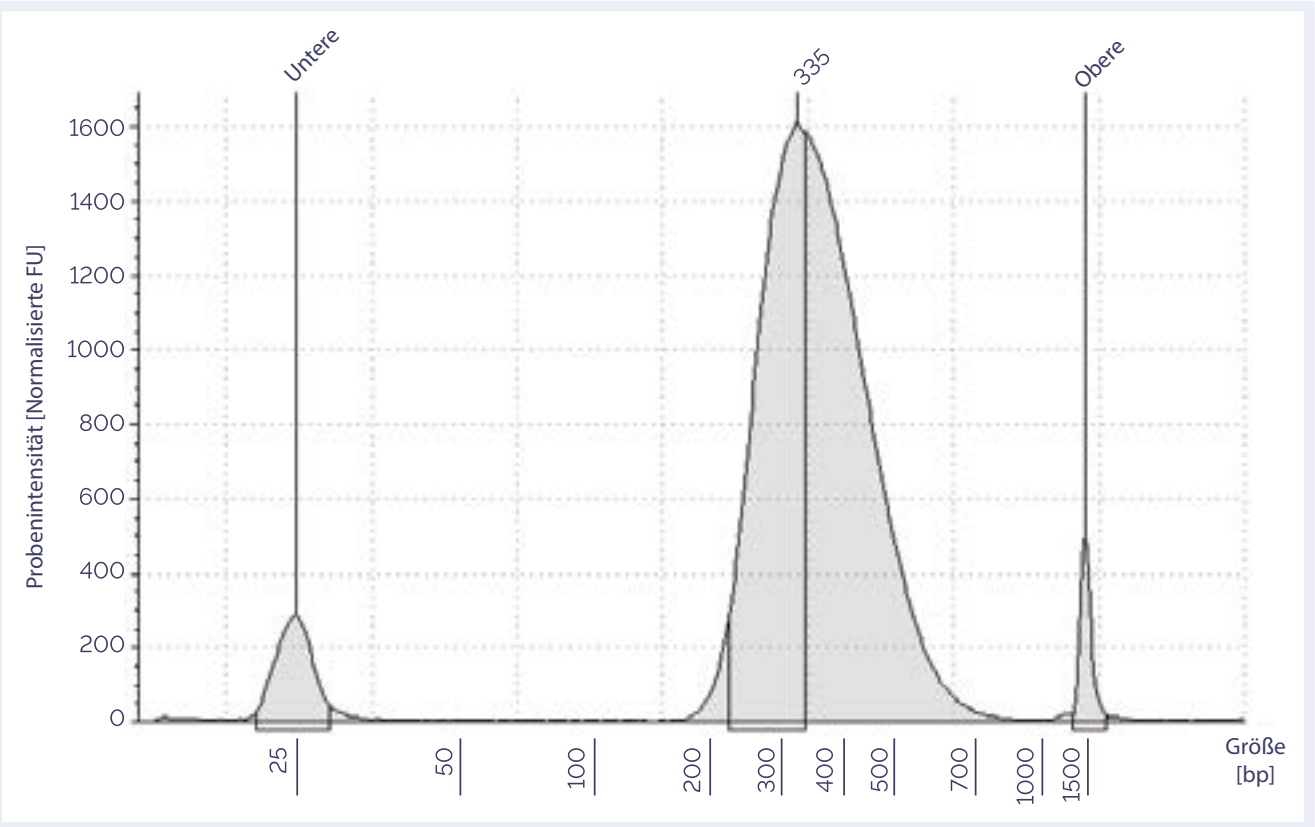


Abbildung 6: Elektropherogramm des aufgereinigten Post-Capture-PCR-Produkts, das mit einem Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay erzeugt wurde. Das Elektropherogramm zeigt einen maximalen Peak im Größenbereich von etwa 330–350 bp (+/- 20 bp).

Fragmentgrößen außerhalb dieses Bereichs können die Qualität der Sequenzdaten beeinträchtigen. Für weitere Informationen wenden Sie sich an Ihren zuständigen Field Application Specialist (FAS).

Bibliotheksvorbereitung: Schritt 4

16. Den Ertrag mit **1 µl** amplifiziertem Produkt mit dem Qubit dsDNA HS Kit gemäß den Anweisungen des Herstellers beurteilen. Der erwartete Ertrag ist panelabhängig und beträgt 1–10 ng/µl. Für weitere Informationen wenden Sie sich an Ihren zuständigen Field Application Specialist (FAS).

STOP **OPTIONALER STOPPPUNKT:** Wenn die Proben nicht sofort verwendet werden sollen, über Nacht bei 4 ˚C oder für eine langfristige Lagerung bei -20 ˚C lagern. Falls direkt fortgefahren wird, mit dem Schritt „Sequenzierung“ fortfahren.

Sequenzierung

Sequenzierung

Übersicht

Die im vorigen Abschnitt (Post-Capture-PCR) zubereiteten DNA-Capture-Pools müssen so kombiniert werden, dass jeder Pool in äquimolaren Mengen vorhanden ist, wenn er in den Sequenzer geladen wird. Dies erfordert sowohl eine genaue Bestimmung der Peakgröße (bp), die sich mit der Agilent TapeStation (High Sensitivity Kit) durchführen lässt, als auch eine genaue Bestimmung der Probenkonzentration (ng/µl), die sich mit dem Thermo Fisher Scientific Qubit (High Sensitivity) Assay durchführen lässt.

Vorbereitung des Sequenzierungspools

Ein Arbeitsblatt kann mit der von OGT bereitgestellten Vorlage „OGT_ULPK_Worksheet“ erstellt werden. Alternativ können Sie die nachstehenden Formeln verwenden.

1. Ihr oben beschriebenes Arbeitsblatt oder die nachstehenden Formeln verwenden, um das Volumen (µl) jedes DNA-Capture-Pools zu bestimmen, das zur Erzeugung des 4-nM-Sequenzierungspools benötigt wird.

Dieses Protokoll wurde mit 150-Basen-Paired-End-Reads unter Verwendung des MiSeq Reagent Kit v2 für 300 Zyklen (Illumina Kat.-Nr. MS-102-2002) und des NextSeq 550 High-Output Kit 2 x 150 bp (Illumina Kat.-Nr. 20024908) validiert.

2. Die Tabellen „Sequencing Pool Parameters“ (Sequenzierungspool-Parameter) und „Samples“ (Proben) auf der Registerkarte „PCR2“ der Pooling-Vorlage ausfüllen. Die grün markierten Zellen sollten nach Bedarf manuell geändert werden; die mit einem Sternchen (*) gekennzeichneten Parameter müssen angegeben werden.

Sequenzierung

3. Das Volumen jedes indizierten Sequenzierungspools in ein frisches 1,5-ml-LoBind-Röhrchen mit der Beschriftung „4-nM-Sequenzierungspool“ geben; die Volumen sind in der Spalte „Volume of PCR2 product to pipette“ (Volumen des zu pipettierenden PCR2-Produkts) in den Registerkarten „Volumes to pipette“ (Zu pipettierende Volumen) angegeben.
4. Das Endvolumen des Sequenzierungspools mit Nuklease-freiem Wasser auf die gewünschte Endkonzentration (4 nM) anpassen. Dies ist in Spalte B der Registerkarten „Volumes to pipette“ (Zu pipettierende Volumen) neben „Volume of Nuclease-free water to pipette“ (Volumen des zu pipettierenden nukleasefreien Wassers) angegeben.
5. Validierung der Konzentration des Sequenzierungspools: Die Peakgrößenverteilung des Sequenzierungspools mit dem Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System und den Ertrag mit dem Qubit dsDNA HS Kit beurteilen. Die Registerkarte „Pool validation and dilution“ (Poolvalidierung und Verdünnung) ausfüllen, um die molare Konzentration des Sequenzierungspools zu bestimmen.
6. Der Sequenzierungspool ist bereit zum Laden in den Sequenzer.

OPTIONALER STOPPPUNKT: Wenn der Sequenzierungspool nicht sofort verwendet werden soll, zur langfristigen Aufbewahrung bei -20 °C lagern. Falls direkt fortgefahren wird, mit dem Schritt „Vorbereitung des Probenblatts“ fortfahren.

Formel 1 – nM von jeder Probe

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

Formel 2 – Volumen jeder indizierten DNA-Probe

$$Volumen\ der\ indizierten\ Probe = \frac{Sequenzierungspool\ (\mu l) \times Poolkonzentration\ (4\ nM)}{Anzahl\ der\ Proben\ im\ Pool \times nM\text{-}Konzentration\ der\ Probe}$$

Sequenzierung

Vorbereitung des Probenblatts

Ein MiSeq Probenblatt kann mithilfe des von OGT bereitgestellten MiSeq Pooling-Leitfadens erstellt werden.

1. Das ausgefüllte Arbeitsblatt öffnen und auf die entsprechende Probenblatt-Registerkarte klicken.

Dieses Blatt wird automatisch mit den Parametern und Probendaten gefüllt, die in den Blättern „PCR1“ und „PCR2“ eingegeben wurden.

2. Alle Zellen mit Text markieren, wie in Abbildung 7 gezeigt. Die Anzahl der hervorgehobenen Zeilen nach Bedarf anpassen.

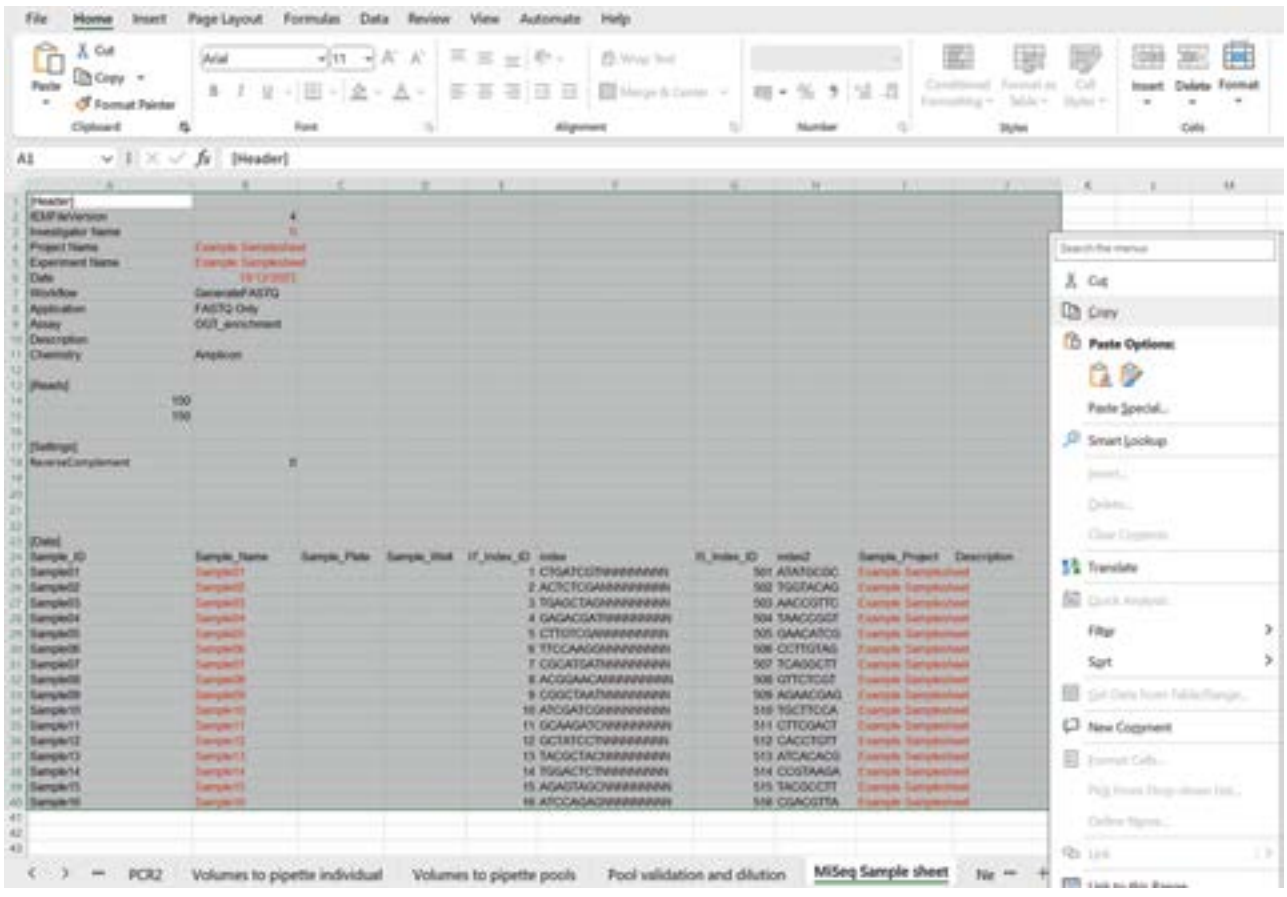


Abbildung 7: Beispiel-Probenblatt in der MiSeq Pooling-Vorlage.

Sequenzierung

3. Die markierten Zellen kopieren und in eine neue Excel-Datei einfügen.

Alle Texte in Rot sind benutzer- und probenspezifische Informationen. Alle Texte in Schwarz sind erforderlich, damit der Sequenzer die Datei erkennen kann.

4. Das neue Blatt als CSV-Datei (kommagetrennt) speichern.
5. Das Probenblatt kann jetzt mit „Manual sample sheet upload“ (Probenblatt manuell hochladen) in den Sequenzer hochgeladen werden.

STOP **OPTIONALER STOPPPUNKT:** Wenn der Sequenzierungspool nicht sofort verwendet werden soll, zur langfristigen Aufbewahrung bei -20 °C lagern. Falls Sie fortfahren, mit dem Schritt „Denaturierung und Laden des Sequenzierungspools“ fortfahren oder das entsprechende Illumina-Protokoll lesen.

Denaturierung und Laden des Sequenzierungspools

1. Das entsprechende Illumina-Protokoll zur Denaturierung des Sequenzierungspools befolgen.

Wenn der Sequenzer nur einen Verdünnungsschritt hat, zum Laden das Illumina-Protokoll befolgen. Wenn der Sequenzer einen sekundären Verdünnungsschritt erfordert, z. B. die Verdünnung des 20-pM-Denaturierungspools auf den 12-pM-Ladepool auf einem MiSeq, mit Schritt 2 fortfahren.

2. Nach der Denaturierung das Volumen des Pools mit eiskaltem HT1 auf 1 ml erhöhen, um den denaturierten Pool auf ~20 pM zu verdünnen, und auf Eis aufbewahren.

Die benötigten Volumen an HT1 variieren abhängig vom Volumen des denaturierten Pools, das durch den Sequenzertyp bestimmt wird. Die tatsächliche Konzentration des ~20-pM-Pools ist auf der Registerkarte „Pool validation and dilution“ (Poolvalidierung und Verdünnung) des Arbeitsblatts angegeben und hängt von der Konzentration des Sequenzierungspools ab.

3. Die erforderliche Ladekonzentration für den Sequenzer auf der Registerkarte „Pool validation and dilution“ (Poolvalidierung und Verdünnung) des Arbeitsblatts eintragen.

Die Cluster-Dichte kann von Gerät zu Gerät variieren. Wir empfehlen, bei Verwendung eines MiSeq V2 Kits für 300 Zyklen eine Endkonzentration von 8–12 pM und bei Verwendung eines NextSeq 500/550 High-Output Kits eine Endkonzentration von 1,4 pM zu laden.

4. Den denaturierten 20-pM-Pool auf diese Ladekonzentration verdünnen. Dazu die auf der Registerkarte „Pool validation and dilution“ (Poolvalidierung und Verdünnung) des Arbeitsblatts angegebenen Volumen pipettieren.

Wenn ein NextSeq verwendet wird, sollte der Sequenzierungspool vor der Ausführung gemäß dem Illumina-Protokoll mit 5 % denaturiertem PhiX kombiniert werden.

Sequenzierung

5. Den Ladepool in die Sequenzerkartusche pipettieren und den Sequenzierlauf gemäß dem Illumina-Protokoll einrichten.
6. Bei Verwendung von BaseSpace „+ Custom Library Prep Kit“ (+ Benutzerspezifisches Bibliotheksvorbereitungs-Kit) im Dropdown-Menü „Library Prep Kit“ (Bibliotheksvorbereitungs-Kit) auswählen.
7. Die Informationen in Tabelle 14 und Tabelle 15 im Anhang verwenden, um das „Universal NGS Library Preparation Kit“ zu erstellen.
8. Das „Universal NGS Library Preparation Kit“ steht nun für den Sequenzierungslauf zur Verfügung.

Anhang

Adaptersequenzen

Adapter	Sequenz
1	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA
2	AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT

Tabelle 14: Adaptersequenzen – Vorwärtskonfiguration. Bitte beachten, dass einige Illumina Sequenziergeräte das reverse Komplement der Index-2-Adaptersequenz (i5) benötigen.

Index-Sequenzen

I7_Index_ID	Sequenz Index 1	I5_Index_ID	Sequenz Index 2
1	CTGATCGTNNNNNNNNN	501	ATATGCGC
2	ACTCTCGANNNNNNNNN	502	TGGTACAG
3	TGAGCTAGNNNNNNNNN	503	AACCGTTC
4	GAGACGATNNNNNNNNN	504	TAACCGGT
5	CTTGTCGANNNNNNNNN	505	GAACATCG
6	TTCCAAGGNNNNNNNNN	506	CCTTGTAG
7	CGCATGATNNNNNNNNN	507	TCAGGCTT

Anhang

I7_Index_ID	Sequenz Index 1	I5_Index_ID	Sequenz Index 2
8	ACGGAACANNNNNNNNN	508	GTTCTCGT
9	CGGCTAATNNNNNNNNN	509	AGAACGAG
10	ATCGATCGNNNNNNNNN	510	TGCTTCCA
11	GCAAGATCNNNNNNNNN	511	CTTCGACT
12	GCTATCCTNNNNNNNNN	512	CACCTGTT
13	TACGCTACNNNNNNNNN	513	ATCACACG
14	TGGACTCTNNNNNNNNN	514	CCGTAAGA
15	AGAGTAGCNNNNNNNNN	515	TACGCCTT
16	ATCCAGAGNNNNNNNNN	516	CGACGTTA
17	GACGATCTNNNNNNNNN	517	ATGCACGA
18	AACTGAGCNNNNNNNNN	518	CCTGATTG
19	CTTAGGACNNNNNNNNN	519	GTAGGAGT
20	GTGCCATANNNNNNNNN	520	ACTAGGAG
21	GAATCCGANNNNNNNNN	521	CACTAGCT
22	TCGCTGTTNNNNNNNNN	522	ACGACTTG
23	TTCGTTGGNNNNNNNNN	523	CGTGTGTA
24	AAGCACTGNNNNNNNNN	524	GTTGACCT
25	CCTTGATCNNNNNNNNN	525	ACTCCATC
26	GTCGAAGANNNNNNNNN	526	CAATGTGG
27	ACCACGATNNNNNNNNN	527	TTGCAGAC
28	GATTACCGNNNNNNNNN	528	CAGTCCAA
29	GCACAACTNNNNNNNNN	529	ACGTTCAG
30	GCGTCATTNNNNNNNNN	530	AACGTCTG
31	ATCCGGTANNNNNNNNN	531	TATCGGTC

Anhang

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

Anhang

I7_Index_ID	Sequenz Index 1	I5_Index_ID	Sequenz Index 2
56	GAAGTTGGNNNNNNNNNN	556	GTTGTTCG
57	ATGACGTCNNNNNNNNNN	557	GAAGGAAG
58	TTGGACGTNNNNNNNNNN	558	AGCACTTC
59	AGTGGATCNNNNNNNNNN	559	GTCATCGA
60	GATAGGCTNNNNNNNNNN	560	TGTGACTG
61	TGGTAGCTNNNNNNNNNN	561	CAACACCT
62	CGCAATCTNNNNNNNNNN	562	ATGCCTGT
63	GATGTGTGNNNNNNNNNN	563	CATGGCTA
64	GATTGCTCNNNNNNNNNN	564	GTGAAGTG
65	CGCTCTATNNNNNNNNNN	565	CGTTGCAA
66	TATCGGTCNNNNNNNNNN	566	ATCCGGTA
67	AACGTCTGNNNNNNNNNN	567	GCGTCATT
68	ACGTTCAGNNNNNNNNNN	568	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

Anhang

I7_Index_ID	Sequenz Index 1	I5_Index_ID	Sequenz Index 2
80	ATGCACGANNNNNNNNN	580	GACGATCT
81	CGACGTTANNNNNNNNN	581	ATCCAGAG
82	TACGCCTTNNNNNNNNN	582	AGAGTAGC
83	CCGTAAGANNNNNNNNN	583	TGGACTCT
84	ATCACACGNNNNNNNNN	584	TACGCTAC
85	CACCTGTTNNNNNNNNN	585	GCTATCCT
86	CTTCGACTNNNNNNNNN	586	GCAAGATC
87	TGCTTCCANNNNNNNNN	587	ATCGATCG
88	AGAACGAGNNNNNNNNN	588	CGGCTAAT
89	GTTCTCGTNNNNNNNNN	589	ACGGAACA
90	TCAGGCTTNNNNNNNNN	590	CGCATGAT
91	CCTTGTAGNNNNNNNNN	591	TTCCAAGG
92	GAACATCGNNNNNNNNN	592	CTTGTCGA
93	TAACCGGTNNNNNNNNN	593	GAGACGAT
94	AACCGTTCNNNNNNNNN	594	TGAGCTAG
95	TGGTACAGNNNNNNNNN	595	ACTCTCGA
96	ATATGCGCNNNNNNNNN	596	CTGATCGT

Tabelle 15: Index-Sequenzen. N steht für den UMI. Bitte beachten, dass einige Illumina Sequenziergeräte das reverse Komplement der Index-2-Adaptersequenz (i5) benötigen.

Anhang

Empfohlene Leitlinien für die Sequenzierung

Panel	Empfohlene Sequenzierungsplattform	Anzahl der Proben pro Sequenzierungslauf	Vorschlag für die Poolgröße	Kaufempfehlung für Kitgröße	Anzahl der Läufe je nach gekaufter Kitgröße
770001 – Core MPN	MiSeq 300 V2	48	6 x 8-Plex	2 x 24 Reaktionen	1 Lauf
				1 x 96 Reaktionen	2 Läufe
770002 – Myeloid Plus	MiSeq 300 V2	16	2 x 8-Plex	2 x 24 Reaktionen	3 Läufe
				1 x 96 Reaktionen	6 Läufe
770027 – CLL+CNV v3	MiSeq 300 V2	16	2 x 8-Plex	2 x 24 Reaktionen	3 Läufe
				1 x 96 Reaktionen	6 Läufe
770003 – Pan Myeloid	MiSeq 300 V2	8	1 x 8-Plex	1 x 24 Reaktionen	3 Läufe
	MiSeq 600 V3	16	2 x 8-Plex	2 x 24 Reaktionen	3 Läufe
				1 x 96 Reaktionen	6 Läufe
	NextSeq Mid-Output	48	6 x 8-Plex	2 x 24 Reaktionen	1 Lauf
				1 x 96 Reaktionen	2 Läufe
502003 – CytoSure Constitutional NGS	NextSeq High-Output	24	3 x 8-Plex	1 x 24 Reaktionen	1 Lauf
770007 – CytoSure Comprehensive Familial Hypercholesterolaemia (FH) NGS	MiSeq 300 V2	16	3 x 8-Plex	2 x 24 Reaktionen und 1 x 96 Reaktionen	3 und 6 Läufe

Tabelle 16: Empfohlene Leitlinien für die Sequenzierung.

Anhang

Positionen der Reagenzröhrchen

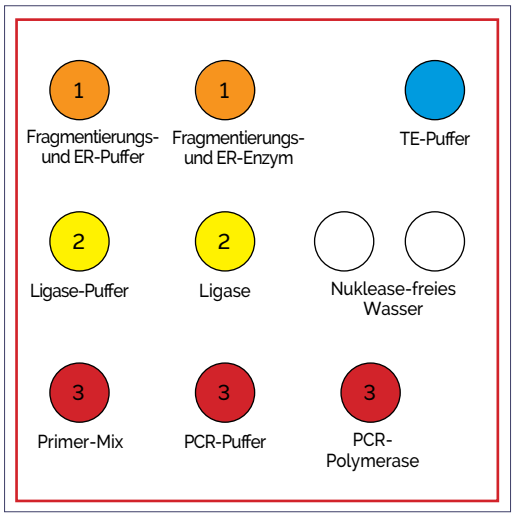


Abbildung 8: Position der Röhrchen im Library Preparation Kit für 24 Reaktionen (770100-24).

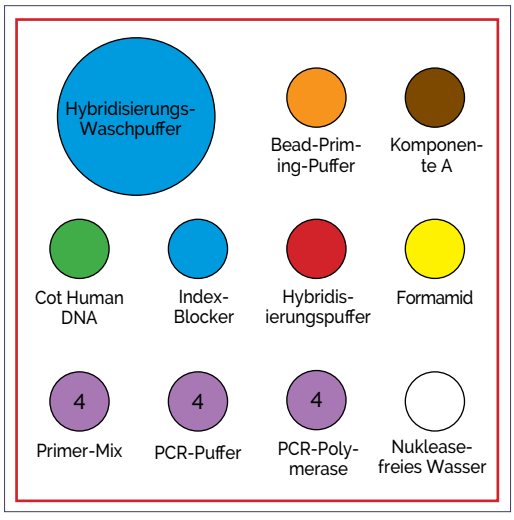


Abbildung 9: Position der Röhrchen im Hybridisation & Wash Kit V2 für 24 Reaktionen (770410-24).

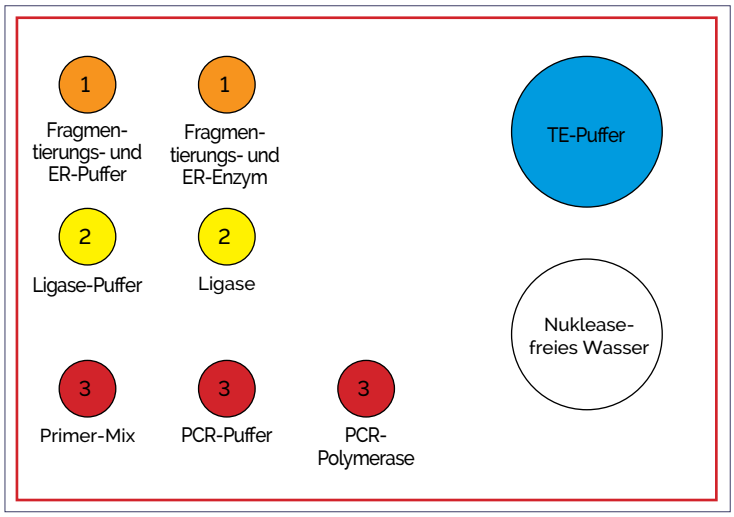


Abbildung 10: Position der Röhrchen im Library Preparation Kit für 96 Reaktionen (770100-96).

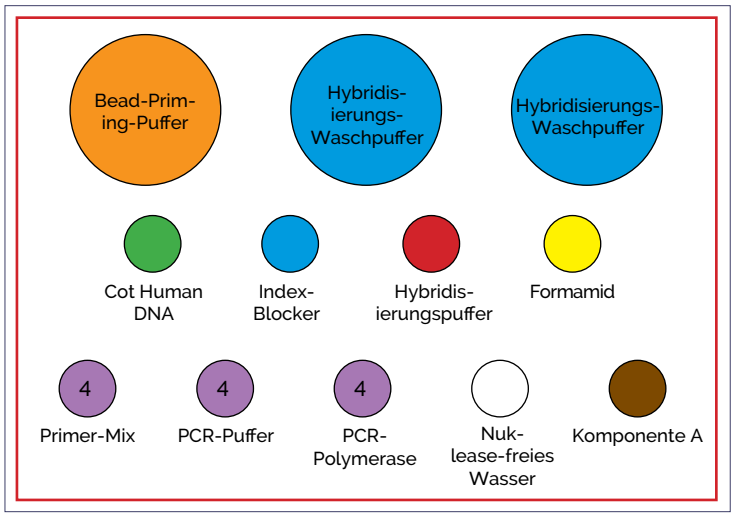


Abbildung 11: Position der Röhrchen im Hybridisation & Wash Kit V2 für 96 Reaktionen (770410-96).

Rechtliche Hinweise

Dieses Handbuch und sein Inhalt sind urheberrechtlich geschützt. © Oxford Gene Technology (Operations) Limited 2024. Alle Rechte vorbehalten. Die Vervielfältigung des gesamten Inhalts oder eines wesentlichen Teils davon in jeglicher Form ist untersagt. Einzelne Benutzer dürfen jedoch Teile des Protokolls für ihren persönlichen Gebrauch ausdrucken oder speichern. Diese Lizenz gestattet es Benutzern nicht, das Material oder wesentliche Teile davon in andere Werke oder Veröffentlichungen aufzunehmen, sei es in gedruckter, elektronischer oder sonstiger Form. Insbesondere (aber nicht ausschließlich) darf kein wesentlicher Teil des Handbuchs zu kommerziellen Zwecken verbreitet oder kopiert werden.

Assay für die NGS-Bibliotheksvorbereitung

Das Universal NGS Library Preparation Kit wurde von Oxford Gene Technology entwickelt. Der Käufer hat das nicht übertragbare Recht, das Produkt NUR ZU FORSCHUNGSZWECKEN und NICHT für DIAGNOSTISCHE VERFAHREN zu verwenden und zu verbrauchen. Es ist nicht für die Diagnose, Vorbeugung, Überwachung, Überwachung, Behandlung oder Linderung jeglicher Erkrankungen oder Zustände oder für die Untersuchung jeglicher physiologischen Prozesse bei einem identifizierbaren Menschen oder für einen anderen medizinischen Zweck bestimmt und darf nicht entsprechend genutzt werden.

Marken

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).

Pflichten des Kunden

Der Kunde erkennt an, dass Oxford Gene Technology (Operations) Limited (oder seine Konzerngesellschaften) Eigentümer aller Rechte am geistigen Eigentum am Design des Produkts ist, einschließlich der Auswahl und Konfiguration der im Produkt verwendeten Oligonukleotidsequenzen. Das Produkt darf nur von Oxford Gene Technology (Operations) Limited oder mit dessen Genehmigung vervielfältigt oder hergestellt werden.

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.- Nr.
Universal NGS Workflow Solution V2	Bundle aus 1 x Universal Library Preparation Kit, 1 x Universal Index Adapters, 1 x Universal Hybridisation & Wash Kit, 1 x Universal Bead Kit	770510-24 770510-96

Tabelle 17: Bestellinformationen.

Eine aktuelle Produktliste und die neuesten Produktinformationen finden Sie unter ogt.com

Kontaktinformationen

Vereinigtes Königreich: +44 (0) 1865 856826
USA: +1 914 467 5285
Technischer Support: support@ogt.com
contact@ogt.com
ogt.com

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

Ein Unternehmen der Sysmex-Gruppe

What binds us, makes us.

SureSeq™ und CytoSure®: Nur für Forschungszwecke; nicht für diagnostische Verfahren. Dieses Handbuch und sein Inhalt sind urheberrechtlich geschützt. © Oxford Gene Technology IP Limited – 2024. Alle Rechte vorbehalten. OGT™, CytoSure® und SureSeq™ sind Marken von Oxford Gene Technology IP Limited.

Oxford Gene Technology (Betrieb) Ltd. Eingetragen in England unter der Nr: 03845432 Unit 5, Oxford Technology Park, 4A Technology Drive, Kidlington, Oxfordshire, OX5 1GN, Vereinigtes Königreich

990370 09/24