

Navodila za uporabo (CE)

Komplet AllType™ FASTplex™ NGS 11 Loci Kit – 48



Izdelek: Komplet AllType™ FASTplex™ NGS 11 Loci Kit – 48

REF

Kataloška št.: ALL-FAST11L

IVD

Diagnostični medicinski pripomoček In Vitro

Samo za distribucijo v Evropski uniji
Ni naprodaj v ZDA in Kanadi

 **ONE LAMBDA**
A Thermo Fisher Scientific Brand

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Vsebina

UVOD	4	AMPLIFIKACIJA	18
OPIS IZDELKA	4	Materiali in oprema	18
Uradno ime izdelka	4	1. del: Amplifikacija vzorca	18
kataloške informacije	4	2. del: Prečiščenje amplikona	20
Namen uporabe	4	3. del: Kvantifikacija amplikona	21
Intended Purpose	5	del 4: Redčenje amplikona	22
Pregled izdelkov	5	Črtno kodiranje vzorca	24
Načela metode	5	Materiali in oprema	24
OPOZORILA	6	1. del: Reakcija črnega kodiranja vzorca (SB), ustavitev reakcije, združevanje vzorca in prečiščenje	24
PRILOŽENI MATERIALI	7	2. del: Reakcija univerzalnega črnega kodiranja (UB), ustavitev reakcije in prečiščenje	29
Vsebina pakiranja in shranjevanje	7	AMPLIFIKACIJA KNJIŽNICE	32
Komponente v kompletu AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit	7	Materiali in oprema	32
Navedbe o nestabilnosti	8	1. del: Amplifikacijska reakcije knjižnice	32
Elektronske datoteke	8	2. del: Prečiščenje Amplificirane knjižnice	33
POTREBEN MATERIAL, KI NI PRILOŽEN	9	3. del: Kvantifikacija končne knjižnice	35
Potrebščine in potrošni material	9	PRIPRAVA na SEKVENCER ION GENESTUDIO S5 PLUS ali ENAKOVREDEN in SISTEM ION CHEF	37
OPREMA, KI JE POTREBNA, A NI PRILOŽENA	10	Materiali in oprema	37
Oprema	10	1. del: Nalaganje predloge FASTplex	37
PREVIDNOSTNI UKREPI	11	2. del: Ustvarjanje in nalaganje seznama vzorcev	38
POMEMBNE SMERNICE	11	3. del: Ustvarite načrtovani tek in prenesite seznam vzorcev	39
Splošne laboratorijske prakse	11	TEK na SISTEMU ION CHEF	40
Tehnika in oprema	11	Smernice za uporabo sistema Ion Chef	40
Reagenti	11	Materiali in oprema	41
Varna točka ustavitve	11	1. del: Nastavitev sistema Ion Chef	41
ZBIRANJE VZORCEV in PRIPRAVA VZORCEV	12	2. del: Zagon teka Chef ExT	42
Tip vzorca	12	UPORABA ION S5 ali ION GENESTUDIO S546	
Shranjevanje vzorca	12		
Metode ekstrakcije DNK	12		
Shranjevanje DNK	12		
POTEK DELA ZA ANALIZE	13		
SPLOŠNA PRIPRAVA NA ANALIZO	14		

Smernice za uporabo Ion S5 ali Ion GeneStudio S5	46	OBVEŠČANJE O RESNIH ZAPLETIH	56
Reagenti	46	PRILOGE	57
1. del: Inicializacija sekvencerja Ion S5	47	Priloga 1: Referenčni vodnik programa PCR	57
2. del: Začetek teka sekvenciranja	49	Priloga 2: Delovni seznam FASTplex Sample Plate 48	58
REZULTATI	51	Priloga 3: Hitri vodnik (Za več podrobnosti glejte Navodila za uporabo.)	59
Pridobivanje podatkov	51	LITERATURA	60
Izračun podatkov	51	BLAGOVNE ZNAMKE	61
Analiza podatkov	51	Vse druge blagovne znamke so last družbe Thermo Fisher Scientific in njenih podružnic, razen če je navedeno drugače.	61
OMEJITVE POSTOPKA	52	OMEJITEV ODGOVORNOSTI	61
PRIČAKOVANE VREDNOSTI	54	EVROPSKI POOBlašČENI PREDSTAVNIK	61
Amplifikacija vzorca	54	RAZLAGA SIMBOLOV	62
Priprava knjižnice	54	RAZLAGA KORISTNIH SIMBOLOV	63
Sekvenciranje DNK	54	ZGODOVINA SPREMEMB	64
SPECIFIČNE ZNAČILNOSTI DELOVANJA	55		
INFORMACIJE ZA STIK	56		
Proizvajalec	56		
Tehnična pomoč	56		

UVOD

Ta navodila za uporabo opisujejo, kako pripraviti združljive knjižnice iz amplikonov, ustvarjenih z uporabo kompleta AllType™ FASTplex™ NGS 11 Loci Kit za sisteme sekvenciranja Illumina®.

Navodila za uporabo vsebujejo korake, potrebne za ustvarjanje naslednjih amplikonov PCR:

Lokus	Ciljna regija
HLA-A	Cel gen
HLA-B	Cel gen
HLA-C	Cel gen
HLA-DRB1	Ekson 1 in ekson 2 do 3' UTR *
HLA-DRB3/4/5	Ekson 2 do 3' UTR *
HLA-DQB1	Ekson 1 in ekson 2 do 3' UTR *
HLA-DPB1	Ekson 1 in ekson 2 do 3' UTR *
HLA-DQA1	Cel gen
HLA-DPA1	Cel gen

* Vključuje intronično sekvenco

Po amplifikaciji preostanek navodil za uporabo zajema korake za črtno kodiranje vzorcev, univerzalno črtno kodiranje, ojačanje knjižnice, pripravo na Ion GeneStudio S5 Plus ali enakovredni sekvencer in Ion Chef System, izvajanje sistema Ion Chef in uporabo Ion S5 oz. Ion GeneStudio S5 serija sekvencer.

Za preprečevanje poškodb in optimalno uporabo kompleta AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit preberite vsa navodila za uporabo.

OPIS IZDELKA

Uradno ime izdelka

Komplet AllType™ FASTplex™ NGS 11 Loci Kit – 48

kataloške informacije



Kataloška št.

- ALL-FAST11L

Namen uporabe



Izdelki za tipizacijo AllType FASTplex NGS HLA so za diagnostično uporabo in vitro in za profesionalno uporabo za tipizacijo HLA za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 in -DPB1.

Intended Purpose

Izdelki za tipizacijo AllType FASTplex NGS HLA so za diagnostično uporabo in vitro in profesionalno uporabo za HLA tipizacijo za lokuse HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, in -DPB1 z uporabo naslednje generacije sekvenciranja s sintezo, protosko detekcijo za diagnostiko presadkov. Vsi izdelki za tipizacijo AllType FASTplex NGS HLA so kvalitativni testi za amplifikacijo in pripravo knjižnice ter sekvenciranje DNK, ekstrahirane iz polne krvi ali brisov ustne votline.

Pregled izdelkov

Izdelki za tipizacijo AllType™ FASTplex™ NGS HLA vsebujejo reagente za obogatitev 11-loci HLA genov za HLA-A, B, C, DRB1, DRB345, DQB1, DPB1, DPA1, in DQA1 z metodo dolge multipleksne verižne polimerazne reakcije (PCR), prečiščenje produktov amplifikacije in izgradnjo knjižnic za sekvenciranje za sisteme Ion Torrent, ki vsebujejo do 96 vzorcev na komplet.

Izdelki za tipizacijo AllType™ FASTplex™ NGS HLA so sestavljeni iz vnaprej optimizirane raztopine primera za amplifikacijo genov HLA v vodni tekoči obliki, encima PCR, 5X reakcijskega pufra in deoksiribonukleotidov (dNTP), ki so na voljo pri priporočeni temperaturi shranjevanja pri -20 °C. Zasnova amplifikacijskega primerja temelji na znanih sekvencah DNK, o katerih poročajo v javnih bazah sekvenc DNK, kot sta Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) in IMGT (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>).

Izdelki za tipizacijo AllType FASTplex NGS HLA zagotavljajo ploščo s 96 vdolbinicami, ki vsebuje 48 edinstvenih reagentov za črtno kodiranje vzorcev v vsaki vdolbinici v dveh izvodih in 1 sam reagent za univerzalno črtno kodiranje (glejte Identifikacija izdelka). V kombinaciji lahko uporabnik pripravi knjižnico za 8 do 48 vzorcev z edinstvenimi črtnimi kodami in skupno sekvenco za naknadno amplifikacijo na koncih fragmentov DNK, da se ujemajo s sistemi Ion GeneStudio S5 ali Ion S5. Izdelki za tipizacijo AllType FASTplex NGS HLA Typing zagotavljajo tudi mešanico temeljnih primerjev za amplifikacijo knjižnice, ki identificira skupno sekvenco na koncih fragmentov DNK in amplificira vse izdelke s črtno kodo v knjižnici. Kompleti vsebujejo tudi reagente za dokončanje priprave knjižnice, vključno s pufrom za črtno kodiranje, raztopino za zaustavitev in paramagnetnimi kroglicami.

Pretok za vse izdelke za tipizacijo AllType FASTplex NGS HLA s sekvencerji

Komplet ionskega čipa	Število vzorcev Največji pretok
Komplet Ion 530 Chip Kit	48
Komplet Ion 520 Chip Kit	24

Načela metode

Tipizacija genov humanega levkocitnega antigena (HLA) v glavnem kompleksu histokompatibilnosti (MHC, major histocompatibility complex) pri ljudeh je bistven diagnostični test za presaditev organov in kostnega mozga, različne povezave bolezni in farmakogenetiko za odkrivanje preobčutljivosti na zdravila [\[1\]\[2\]](#). Zaradi velike raznolikosti polimorfizmov in homolognih sekvenc v genih HLA postajajo tehnologije sekvenciranja naslednje generacije (NGS), ki omogočajo klonsko sekvenciranje polnih ali skoraj polnih genov nujna metoda za zagotavljanje rezultatov tipizacije z najvišjo ločljivostjo.

Izdelek AllType FASTplex NGS 11 Loci generira ciljno specifične produkte amplifikacije za več genov HLA v eni verižni reakciji s polimerazo (PCR). Podatki o sekvenciranju DNK za tipizacijo HLA so pridobljeni z obdelavo pomnoženega izdelka z delovnim potekom fragmentacije knjižnice za pripravo knjižnice, ki jo je mogoče sekvencirati s pomočjo platform sekvencerja Ion Torrent. Komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit je bil zasnovan in optimiziran za izdelavo skoraj ekvimolarne količine vsake tarče, da se zagotovi ustrezno pokritost sekvenciranja. Nastali podatki se analizirajo s programsko opremo za analizo TypeStream™ Visual NGS za ustvarjanje dodelitev alelov HLA visoke ločljivosti.

OPOZORILA



OPOZORILO: Za podrobnejše informacije glejte varnostni list. Posamične varnostne liste lahko prenesete na naslovu www.onelambda.com in/ali www.thermofisher.com.

PRILOŽENI MATERIALI

Vsebina pakiranja in shranjevanje



Komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit sestavljata dve ločeni škatli. Komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit – 48 (1. od 2 škatel) lahko varno hranite pri -20 °C, komplet AllType FASTplex NGS Kit (2. od 2 škatel) pa ima komponente, ki se shranjujejo pri +2 do 8 °C. Priporočeni pogoji skladiščenja za FAST-STOP in FAST-BBUF so +20 do 25 °C. Izdelek -20 °C lahko do 12-krat zamrznete/odtajate.

POZOR: Po prejemu hranite vsako škatlo nepoškodovano, dokler ni pripravljena za uporabo. Izogibajte se nepotrebnemu prestavljanju.



Celoten seznam priloženih materialov in njihove ustrezne pogoje shranjevanja najdete v razdelku [Komponente, priložene kompletu AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit](#). Oznaka izdelka vsebuje tudi pogoje skladiščenja posameznih komponent.

Komponente v kompletu AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit

Škatla 1 od 2

Komponenta	Kataloška št.	Količina	Volumen (µl)	Skladiščenje
AllType FASTplex 11 Loci Primer Mix	ALF-P11F	1 viala	600	-20 °C
AllType FASTplex 11 Loci Exon 1 Primer Mix	ALF-P11E1	1 viala	240	
AllType dNTPs	ALL-NTP	1 viala	200	
AllType Buffer	ALL-BUF	1 viala	500	
AllType LR Polymerase	ALL-LRPOL	1 viala	100	
FASTplex Sample Plate 48	FAST-SP48B	1 viala	20 na vdolbinico	
FASTplex Univ Barcode P1	FAST-UBP1	1 viala	40	
Mešanica FASTplex Library Primer Mix	FAST-LPM	1 viala	180	
FASTplex Library Amp Mix	FAST-LAM	1 viala	900	

Škatla 2 od 2

Komponenta	Kataloška št.	Količina	Volumen (µl)	Skladiščenje
Pufer FASTplex Barcoding Buffer	FAST-BBUF	1 viala	1500	+2 do 25 °C
FASTplex Stop Solution	FAST-STOP	2 viali	1200	
FASTplex Paramagnetic Beads	FAST-BEAD	1 viala	7.700	+2 do 8 °C
Pufer FASTplex DNA Suspension Buffer	FAST-SUSP	1 viala	8.000	

Navedbe o nestabilnosti



OPOZORILO: Ne uporabljajte, če so škatle poškodovane, izdelek ni prejet pri zahtevani temperaturi skladiščenja ali če je pri izdelku prišlo do puščanja vsebine. Za tehnično podporo se obrnite na družbo One Lambda na 1lambda-TechSupport@thermofisher.com.

Elektronske datoteke

Komponenta	Lokacija
AllType FASTplex Ion ExT predloga 530	Prenesite jo na www.onelambda.com
FASTplex Ion ExT predloga 520	

POTREBEN MATERIAL, KI NI PRILOŽEN

Potrebščine in potrošni material

Opis	Dobavitelj	Kataloška št.
96-vdolbinic, 0,2 ml, plošče PCR	MLS**	---
96 vdolbinic plastična/folijska zatesnitev plošče	MLS	---
Polipropilenske plošče s 96 vdolbinicami MicroWell™ Thermo Scientific Nunc™	Fisher Scientific	12-565-369
Plošča PCR in 0,2 ml hladilnik epruvet	MLS	---
Epruvete Eppendorf DNA LoBind, 5,0 ml	Eppendorf	0030108310
Epruvete Eppendorf DNA LoBind, 2,0 ml	Eppendorf	022431048
Epruveta PCR 0,2 ml	MLS	---
50-ml stožčaste epruvete brez nukleaze	MLS	---
15-ml stožčaste epruvete brez nukleaze	MLS	---
Serološke pipete, 10 ali 25 ml	MLS	---
Kontrolnik pipet	MLS	---
Ves nabor ročnih enokanalnih pipet (20 µl, 200 µl, 1 ml)	MLS	---
20 µl in 200 µl ročne večkanalne pipete	MLS	---
Ves nabor filtriranih, vnaprej steriliziranih konic za pipete	MLS	---
Sterilni rezervoarji za reagent	MLS	---
Tračne epruvete / pokrovčki	MLS	---
Tlačna blazinica termične ciklične naprave PCR	MLS	---
Komplet Ion 520™ in Ion 530™ ExT Kit-Chef	Thermo Fisher Scientific	A30670
Reakcije Ion 520 Chip Kit-4 Reactions *	Thermo Fisher Scientific	A27761
Reakcije Ion 530 Chip Kit-4 Reactions *	Thermo Fisher Scientific	IONS5-530C4
Voda brez nukleaze	MLS	---
Etanol 200 Proof, primerne kakovosti za molekularno biologijo	MLS	---
Hladilnik plošče PCR	MLS	---

*Uporabnik naj določi, katero velikost ionskega čipa bo uporabil na podlagi povprečne velikosti knjižnice vzorcev.

**MLS: Velik laboratorijski dobavitelj

OPREMA, KI JE POTREBNA, A NI PRILOŽENA

Oprema

Opis	Dobavitelj	Kataloška št.
TypeStream™ Visual NGS programska oprema za analizo (različica 2.0 ali novejša)	One Lambda, Inc.	TSVPGR
Instrument Ion Chef™	Thermo Fisher Scientific	IONCHEF
Sistem Ion S5™	Thermo Fisher Scientific	IONS5
Sistem Ion S5™ XL	Thermo Fisher Scientific	IONS5XL
Sistem Ion GeneStudio™ S5	Thermo Fisher Scientific	IONGSS5
Sistem Ion GeneStudio™ S5 Plus	Thermo Fisher Scientific	IONGSS5PL
Stojalo z magnetnimi obroči (96 vdolbinic)	Thermo Fisher Scientific	AM10027 ali AM10050
Magnetno stojalo za epruvete 2,0 ml	Thermo Fisher Scientific	12321D
Termična ciklična naprava z 96-vdolbinicami Veriti*	Thermo Fisher Scientific	4375786
Fluorometer Qubit® ali enakovredno	Thermo Fisher Scientific	Q33216 ali Q33226
Komplet za analizo Qubit dsDNA HS	Thermo Fisher Scientific	Q32854
Epruvete za analizo Qubit	Thermo Fisher Scientific	Q32856
Centrifuga s ploščo z zmogljivostjo 1.500 x g	MLS**	---
Mini/mikro-centrifuga	MLS	---
Vrtinčni mešalnik	MLS	---

**Termična ciklična naprava s 96-vdolbinicami Veriti se lahko nadomesti z napravo za termično cikliranje z možnostjo nastavitve temperature za reakcijo PCR – toplotno ogrevanje 0,8 °C na sekundo in hitrost hlajenja 1,6 °C na sekundo – in reakcijskimi volumni 100 µl.*

***MLS: Velik laboratorijski dobavitelj*

PREVIDNOSTNI UKREPI



VARNOSTNI PREVIDNOSTNI UKREPI: Nosite rokavice in ustrezno osebno zaščitno opremo.

POZOR: Upoštevajte tehnike čistega dela na mizi, da zmanjšate tveganje kontaminacije.

Delovno mizo temeljito očistite s sredstvom za odstranjevanje DNK (npr. DNA Away™, Termi-DNA-Tor, 10-% belilo, ki mu sledi 70-% alkohol, ali enakovredno), da zmanjšate tveganje kontaminacije vzorca.

Med delom na klopi pogosto obrišite rokavice s sredstvom za odstranjevanje DNK, da zmanjšate tveganje navzkrižne kontaminacije vzorcev in reagentov. Druga možnost je, da si pogosto zamenjate rokavice.

POMEMBNE SMERNICE

Splošne laboratorijske prakse

- Priporoča se uporaba ročnih večkanalnih pipet. Enokanalne pipete so priporočljive samo za poteke dela, ki vsebujejo majhno količino vzorcev.
- Vse instrumente in pipete je treba kalibrirati in vzdrževati v skladu s smernicami proizvajalca.

Tehnika in oprema

- Priporoča se uporaba namenske opreme v okolju pred in po PCR.
- Za udobje pred zagonom nastavite vse programe termične ciklične naprave.
- Uporabite termično ciklično napravo s 96-vdolbinicami Veriti ali model s hitrostjo emulacije 9600 ali +0,8 °C/s ogrevanja in -1,6 °C/s hlajenja ter s pokrovom, ogrevanim na 105 °C ali enakovredno, za vse programe.
 - Pri uporabi druge termične ciklične naprave, kot Veriti-96, termično ciklično napravo validirajte.
- Pri uporabi druge metode kvantifikacije kot fluorometer Qubit, validirajte metodo kvantifikacije.

Reagenti

- Predmete v 1. od 2 škatel kompleta je treba med uporabo hraniti na ledu in takoj po uporabi vrniti na -20 °C.
- Predamplifikacijske (1. škatlo kompleta AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit) in poamplifikacijske reagente shranite ločeno.
- Pripravo in razdeljevanje glavne mešanice je treba opraviti na ledu in v razmeroma hitrem tempu, da se izognete nenamernim rezultatom.
- Uporabite pufer za suspenzijo pufer FASTplex DNA Suspension Buffer za vsa redčenja gDNA in amplikona ter eluiranje knjižnice.
- Ne uporabljajte raztopin, ki vsebujejo EDTA (npr. pufer TE ali pufer z nizko TE), saj lahko zavira reakcije v tej analizi.

Varna točka ustavitve

- Za optimalne rezultate izvedite vse korake priprave knjižnice v enem dnevu.
 - Če pa potrebujete več časa, poiščite vmesnega materiala pri -20 °C.
- Zaradi neznane količine preostalih encimskih aktivnosti ne hranite materialov več kot 72 ur pri -20°C; daljši čas skladiščenja bi zahteval potrditev.



VARNO TOČKO USTAVITVE za shranjevanje

ZBIRANJE VZORCEV in PRIPRAVA VZORCEV

Tip vzorca

Vzorci, vključno z antikoagulirano periferno krvjo, kultiviranimi limfociti in bukalnimi epiteljskimi celicami, ki so bili potrjeni z uporabo kompleta AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit.

DNK je mogoče izolirati iz vzorcev do 2 tedna po začetnem odvzemu krvi ali odvzemu bukalnih epiteljskih celic, čeprav je priporočljivo, da se vzorce obdela v 2 do 3 dneh po odvzemu (4, 5). DNK se lahko ohrani v pogojih shranjevanja in dolžini, kot jih potrdi posamezni laboratorij.

Shranjevanje vzorca

Polno kri je treba odvzeti v antikoagulantih ACD ali EDTA in shraniti pri 4 °C.

Brise iz ust je treba odvzeti z brisom, ki so potrjeni za odvzem epiteljskih celic in jih je treba hraniti pri sobni temperaturi v zaprti posodi, da se izognemo prekomernemu sušenju.

Metode ekstrakcije DNK

Naslednje metode ekstrakcije so bile potrjene s kompletom AllType NGS 11 Loci Amplification Kit:

- Komplet Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega Corporation, kat. št. AS1010)
- Komplet QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, kat. št./ID: 51104)
- Komplet za samodejni odvzem več vzorcev MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. št. A25597) z uporabo sistema za prečiščenje KingFisher Flex Purification System (Thermo Fisher Scientific, kat. št. 5400630, 5400610).

Uporabljajo se lahko druge metode ekstrakcije DNK, vendar mora metode in opremo validirati končni uporabnik.

Prepričajte se, da vzorci ne vsebujejo zaviralcev polimeraze DNA.

Ne resuspendirajte vzorcev v raztopinah, ki vsebujejo kelate, kot je EDTA, v koncentraciji nad 0,1 mM.

Resuspendirajte vzorce DNK za PCR v EDTA z nizko vsebnostjo (pod 0,1 mM), pufru suspenzije DNA, sterilni vodi ali v 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 pri optimalni koncentraciji 25 ng/μl s fluorometrično metodo, kot je Qubit Fluorometer in Qubit dsDNA HS komplet za analizo (Thermo Fisher Scientific). Uporabite lahko druge specifikacije, vendar jih mora validirati laboratorij.

POMEMBNO: Zgornje reagente je mogoče uporabiti le pri redčenju genomske DNK. V vseh naslednjih korakih, če je naveden pufer za suspenzijo DNK, lahko uporabite samo pufer FASTplex DNA Suspension Buffer.

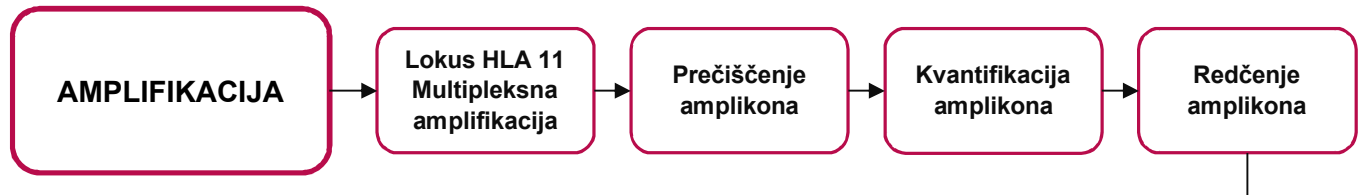
Shranjevanje DNK

- Vzorce DNK uporabite takoj po izolaciji ali DNK shranite pri temperaturi -20 °C ali manj.
- Vzorce DNK pošiljajte pri temperaturi 4 °C ali manj, da ohranite njihovo celovitost med transportom.

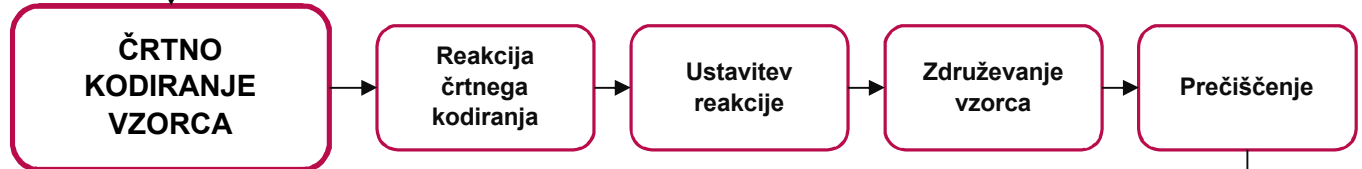
Validirana je bila ekstrahirana DNK, ki je bila shranjena do 14 dni z uporabo kompleta AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit. Dodatno shranjevanje DNK lahko validira posamezni laboratorij.

POTEK DELA ZA ANALIZE

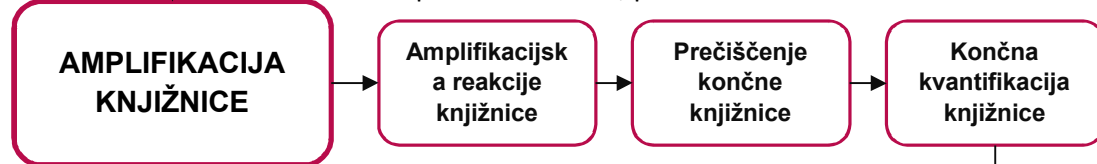
Skupni čas: 210 minut; potreben čas: 50 minut



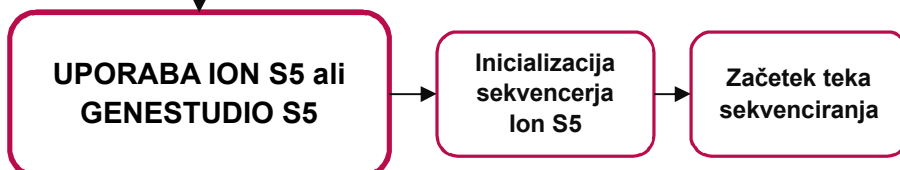
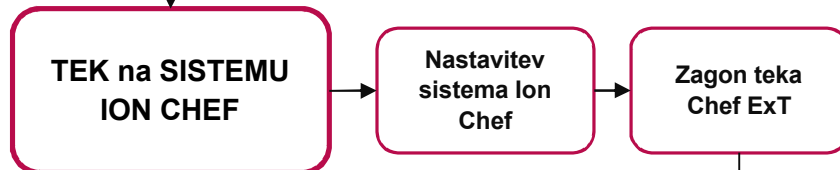
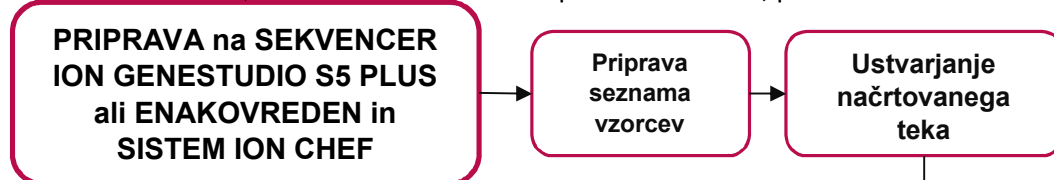
Skupni čas: 100 minut; potreben čas: 20 minut



Skupni čas: 65 minut; potreben čas: 5 minut



Skupni čas: 15 minut; potreben čas: 5 minut



SPLOŠNA PRIPRAVA NA ANALIZO

1. **Ločena** območja pred in po PCR.
2. **Pripravite** naslednje predmete in reagente, tako da so dostopni skozi celoten potek dela:
 - Celoten nabor filtriranih konic za pipete
 - Eno- in večkanalne pipete
 - 0,2-ml plošče PCR s 96 vdolbinicami
 - Epruveta Eppendorf LoBind®
 - Magnetna stojala za ploščo s 96 vdolbinicami in 2,0-ml epruveto
 - Voda brez nukleaze
 - Led
 - Hladilnik plošče PCR
 - Potrebščine za označevanje epruvet
 - Pufer FASTplex DNA Suspension Buffer
 - Etanol 200-proof
 - Sterilni rezervoarji za reagent
3. **Resuspendirajte** vzorce DNK v suspenzijskem pufru FASTplex DNA, pufru za suspenzijo z nizko vsebnostjo (pod 0,1 mM) EDTA DNA, sterilni vodi ali v 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 pri optimalni koncentraciji 25 ng/μl, kvantificirano s fluorometrično metodo, kot je Qubit Fluorometer in komplet za analizo Qubit dsDNA HS. Metode optične gostote (OD) se ne smejo uporabljati za merjenje koncentracije DNK; odčitki so lahko precejšeni.

Sprejemljiv razpon koncentracij genomske DNK je od 3,00 ng/μl do 50 ng/μl.
Pričakovano razmerje A260/A280 je v razponu 1,65-1,80, če se za merjenje kakovosti DNK uporablja metoda optične gostote (OD).
4. **Zabeležite** vsako lokacijo vzorca, volumen FASTplex Sample Plate 48 (glejte [Prilogo 2](#) za diagram plošče) in reagenta Univ Barcode P1 (UB), ki ga boste uporabili za pripravo knjižnice.
5. **Pred začetkom postopka izdelajte** mapo z 8 epruvetami PCR ali ploščo s 96-vdolbinicami.
6. **Beležite**, iz katerih vdolbinic na FASTplex Sample Plate 48 in koliko reagenta UB je bilo porabljenega za pripravo knjižnice. Uporabniki se lahko sklicujejo na mrežo plošč na koncu tega dokumenta.
7. Reagentov v kompletu **ne zavrzite**, dokler niso prazni, saj so namenjeni večkratni uporabi.
8. **Preprečite** kontaminacijo vseh reagentov/komponent kompleta.
9. Neuporabljene dele **vrnite** v shrambo pri temperaturi, ki je navedena na nalepki.
10. **Izvedite** previdnostne ukrepe, da preprečite križno kontaminacijo med vdolbinicami.

Plošča FASTplex Sample Plate 48, ki je priložena kompletu, vsebuje dovolj reagenta za črtno kodiranje vzorcev (SB) za pripravo knjižnice z 48 vzorci dvakrat ali do dvanajstih knjižnic z 8 vzorci, za skupno 96 vzorcev. Komplet FASTplex je združljiv tudi s katero koli knjižnico velikosti med 8 in 48 vzorci. Plošča je zasnovana tako, da omogoča ločevanje stolpcov črtnih kod (vdolbinic); preostalo vsebino plošče za vzorce FASTplex je treba hraniti pri temperaturi -20 °C do naslednje uporabe. Paziti je treba, da se izognemo navzkrižnim kontaminacijam med vdolbinicami.

Plošča FASTplex Sample Plate vsebuje 48 edinstvenih črtnih kod, dispenciranih v dveh izvodih po plošči s 96 vdolbinicami. Za porazdelitev glejte [korak 21](#) v tem razdelku.
11. **Programi** termičnih cikličnih naprav.

12. Nastavite programe vseh termičnih cikličnih naprav pred začetkom.

13. Uporabite naslednje programe:

- **Program HLA 11-Loci Amplification:**

Temperatura	Čas	Cikel
94 °C	2 min	1
98 °C	10 sek	22
69 °C	3 min	
98 °C	10 sek	8
60 °C	3 min	
4 °C	ZADRŽI	1

Hitrost emulacije 9600 in ogrevan pokrov

- **Program TAG:** 55 °C za 15 min., 25 °C zadrži, z ogrevanim pokrovom
- **Program STOP:** 68 °C za 10 min., 25 °C zadrži, z ogrevanim pokrovom
- **Program FASTplex Ion Library Amplification:**

Temperatura	Čas	Cikel
72 °C	10 min	1
98 °C	3 min	1
98 °C	15 sek	9
66 °C	30 sek	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1
4 °C	ZADRŽI	1

Hitrost emulacije 9600 in ogrevan pokrov

POMEMBNO: Po vsakem končanem koraku PCR izberite naslednji program termične ciklične naprave, ki ga želite uporabiti, tako da se termični pokrov predgreje. Pokrov termične ciklične naprave mora na ustrezni temperaturi tarče biti pred postavitvijo reakcije. Reakcije ne postavljajte na hladno termično ciklično napravo.

14. Komponente kompleta impulzno centrifugirajte v ustrezni centrifugi, da zberete reagente na dnu vdolbinice ali epruvete pred vsako uporabo plošče za vzorčenje FASTplex in pred izdajanjem iz reagenta epruvete, saj lahko tekočine kondenzirajo ali premaknejo lokacije v posodah med pošiljanjem oz. skladiščenjem.

15. Če komponente kompleta za sobno temperaturo zamrznejo med pošiljanjem ali skladiščenjem, pred uporabo izvedite naslednje korake:

- Odmrznite komponente kompleta.
- Premešajte komponente kompleta.
- Impulzno centrifugirajte komponente kompleta.

16. Paramagnetne kroglice FASTplex Paramagnetic Beads uravnotežite na sobno temperaturo. Paramagnetne kroglice FASTplex Paramagnetic Beads lahko do 2 tedna shranite pri sobni temperaturi ali dlje pri 2 - 8 °C.

- **Če paramagnetne kroglice FASTplex Paramagnetic Beads shranite na hladnem, pred uporabo izvedite** naslednje korake:
 - Kroglice za 30 minut postavite na sobno temperaturo.

- b) Kroglice temeljito vrtnično zmešajte, da se resuspendirajo.

POMEMBNO: Za natančen prenos volumnov konic pipet ne navlažite in pipetirajte počasi.

17. Pred uporabo **preverite**, ali vsebuje raztopina »Stop Solution« oborine.

- Če je vidna oborina, izvedite naslednje korake:

- a) Epruveto 5 minut inkubirajte pri 37 °C.
- b) Nežno mešajte z obračanjem, dokler se oborina ne raztopi.

POMEMBNO: Ne mešajte z vrtenjem. Stop Solution vsebuje SDS, zato pri shranjevanju pod sobno temperaturo nastajajo oborine. Premočno mešanje bo povzročilo penjenje.

18. Pufer FASTplex Barcoding Buffer **shranjujte** pri sobni temperaturi, ko ga uporabljate, saj je viskozen.

POMEMBNO: Za natančen prenos pufru za črtno kodiranje Barcoding Buffer pipetirajte počasi in konic pipet ne navlažite. Med dodajanjem pufru za črtno kodiranje reakcijam v celoti primešajte pufer za črtno kodiranje tako, da z istimi konicami pipet, ki smo jih uporabili za dodajanje, večkrat pipetirate gor in dol.

19. Vsak dan **pripravite** 80-% etanol.

20. **Načrtujte** označevanje vzorcev s črtno kodo pred začetkom analize.

21. **Ko načrtujete črtno kodiranje vzorca**, upoštevajte naslednje:

- Komplet vsebuje skupno 48 edinstvenih črtnih kod IonXpress kot črtne kode za vzorce (SB, sample barcodes) in edinstveno univerzalno črtno kodo FASTplex Univ Barcode P1 (UB, Universal Barcode) za pripravo knjižnice do 48 vzorcev.
- Dobiti je mogoče knjižnico z med 8 do 48 vzorcev, ki je črtno kodirana z eno edinstveno UB.
- Pri združevanju več vzorcev ne izberite SB, ki se prekrivajo. Ne mešajte vdolbinic 1-48 z podvojeno črtno kodo v vdolbinicah 49-96. Vsaka vdolbinica vsebuje dovolj reagentov za črtno kodiranje za eno reakcijo.
- Komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit (kat. št. ALL-FAST11L) je bil testiran s sistemom Ion GeneStudio S5 Plus ali enakovrednim in Ion Chef instrumentom z uporabo Ion 520 Chip (8 do 24 vzorcev) in Ion 530 Chip (8 do 48 vzorcev) z reagentoma za sekvenciranje Ion 520 in Ion 530 ExT Kit-Chef.

POMEMBNO: Ta aplikacija ne podpira alternativnih konfiguracij, kompletov in sistemov sekvenciranja in jih mora določiti in validirati uporabnik.

- Slika 1 prikazuje razporeditev knjižnice s 48 vzorci. Vdolbinice A7 do H12 so podvojitve tukaj prikazanih vdolbinic. ID-ji črtne kode IonXpress in položaji so prikazani. Kalkulatorsko orodje TypeStream Visual (TSV) ima zavihek za list vzorcev, ki odraža ta vrstni red črtne kode.

	1	2	3	4	5	6
A	IonXpress_001	IonXpress_009	IonXpress_017	IonXpress_050	IonXpress_033	IonXpress_041
B	IonXpress_002	IonXpress_010	IonXpress_018	IonXpress_026	IonXpress_034	IonXpress_042
C	IonXpress_003	IonXpress_011	IonXpress_019	IonXpress_027	IonXpress_035	IonXpress_043
D	IonXpress_004	IonXpress_012	IonXpress_020	IonXpress_028	IonXpress_036	IonXpress_049
E	IonXpress_005	IonXpress_013	IonXpress_021	IonXpress_029	IonXpress_037	IonXpress_045
F	IonXpress_006	IonXpress_014	IonXpress_022	IonXpress_030	IonXpress_038	IonXpress_046
G	IonXpress_007	IonXpress_015	IonXpress_023	IonXpress_031	IonXpress_039	IonXpress_047
H	IonXpress_008	IonXpress_016	IonXpress_024	IonXpress_032	IonXpress_040	IonXpress_048

Slika 1. Postavitev plošče z vzorci s črtno kodo za knjižnico z 48 vzorci. Ta postavitev je podvojena v stolpcih 7-12. Ne mešajte podvojenih črtnih kod.

- Kalkulator NGS TypeStream Visual (TSV) ima zavihek za list vzorcev, ki odraža ta vrstni red črtne kode.

POMEMBNO: Ta aplikacija ne podpira alternativnih konfiguracij, kompletov in sistemov sekvenciranja in jih mora določiti in validirati uporabnik.

22. Če delate z različnimi velikostmi vzorcev, pri ravnanju s količinami reagenta upoštevajte naslednje:

- Komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci omogoča pripravo knjižnice z uporabo najmanj 8 do 48 vzorcev. Pri obdelavi različnih velikosti vzorcev bodo po koraku črtnega kodiranja vzorca uporabljeni različni volumni združene reakcije SB in paramagnetnih kroglic FASTplex Paramagnetic Beads.
- Kalkulator TSV NGS prikazuje zahtevane količine reagenta. Na zavihku »SB UB Lib Amp« se bo skupno število vzorcev samodejno posodobilo glede na število vzorcev, dodanih na zavihku »Pool Configuration«. V zavihku »SB UB Lib Amp« so prikazani potrebni volumni reagenta.
- Komplet vsebuje dovolj reagentov za črtno kodiranje, pufer za črtno kodiranje in raztopino »Stop Solution« za obdelavo 12 tekov z 8 vzorci.
- Za zagotovitev, da so vzorčni ID-ji pravilno zapolnjeni, glejte uporabniški priročnik za programsko opremo za analizo TypeStream Visual NGS.

AMPLIFIKACIJA

Materiali in oprema

- Razredčena genomska DNK (25 ng/μl)
- Epruvete Eppendorf DNA LoBind, 2,0 ml
- 96-vdolbinic, 0,2 ml, plošče PCR
- AllType FASTplex 11 Loci Primer Mix (kat. ID ALF-P11)
- AllType™ FASTplex™ 11 Loci Exon 1 Primer Mix (kat. ID ALF-P11E1)
- AllType Buffer (kat. ID ALL-BUF)
- AllType dNTPs (kat. ID ALL-NTP)
- AllType LR Polymerase (kat. ID ALL-LRPOL)
- Voda brez nukleaze
- FASTplex Paramagnetic Beads (kat. ID FAST-BEAD)
- Pufer FASTplex DNA Suspension Buffer (kat. ID FAST-SUSP)
- Etanol 200 Proof, primerne kakovosti za molekularno biologijo
- Polipropilenske plošče Nunc s 96-vdolbinic MicroWell
- Magnetno stojalo za plošče
- 50-ml rezervoar za reagent iz stiropira
- Komplet za analizo visoke občutljivosti Qubit dsDNA
- Fluorometer Qubit
- Ves nabor ročnih enokanalnih pipet (20 μl, 200 μl, 1 ml)
- Ves nabor filtriranih, vnaprej steriliziranih konic za pipete
- Seroške pipete, 10 ali 25 ml
- Centrifuga s ploščo PCR
- Mini-centrifuga
- Vrtinčni mešalnik
- Ledeni ali hladni blok
- Tlačna blazinica termične ciklične naprave PCR
- [Termična ciklična naprava s 96-vdolbinicami Veriti ali enakovredno](#)
- Kalkulator TSV NGS

1. del: Amplifikacija vzorca

1. **Vklopite** termično ciklično napravo.
2. **Programirajte** termično ciklično napravo, da bo izvedla naslednji program amplifikacije HLA 11-loci:

Program HLA 11-Loci Amplification:

Temperatura	Čas	Cikel
94 °C	2 min	1
98 °C	10 sek	22
69 °C	3 min	
98 °C	10 sek	8
60 °C	3 min	
4 °C	ZADRŽI	1

3. **Uporabite** hitrost emulacije 9600 ali ogrevanje +0,8 °C/sek in hlajenje -1,6 °C/sek z ogrevanim pokrovom, nastavljenim na 105 °C.

POMEMBNO: Pred dodajanjem reakcije preverite temperaturo pokrova termične ciklične naprave. Prepričajte se, da je pokrov termične ciklične naprave na ustrezni temperaturi tarče. Reakcije ne odlagajte na hladno termično ciklično napravo.

4. **Uporabite** jeziček »gDNA Dilution« na kalkulatorju TSV NGS za izračun originalnih volumnov vzorca in volumnov pufru DNA Suspension Buffer za pripravo razredčenj 25 ng/μl.



Opomba: Za zagotovitev, da so vzorčni ID-ji pravilno zapolnjeni, glejte uporabniški priročnik za programsko opremo za analizo TypeStream Visual NGS.

5. **Odtajajte** AllType FASTplex 11 Loci Primer Mix, AllType FASTplex 11 Loci Exon 1 Primer Mix, AllType dNTP in pufer AllType Buffer na sobni temperaturi.

6. **Pustite** epruveto AllType LR Polymerase na ledu.

7. **Na kratko vrtinčno zmešajte** in centrifugirajte vse reagente RAZEN polimeraze.

8. Vse reagente **hranite** na ledu, dokler niso pripravljeni na uporabo.

9. **Na 0,2-ml plošči PCR s 96 vdolbinicami alikvotirajte** 4,0 μl genomske DNK s koncentracijo, prilagojeno na 25 ng/μl.

10. **Zabeležite** ID-je vzorcev in položaj vdolbinic na plošči PCR.

11. **Pojdite** na zavihek »Amp-Clean Up« v kalkulatorju TSV NGS, ki bo samodejno izračunal količine vsakega reagenta za amplifikacijo na podlagi števila vzorcev, vnesenih v zavihek »gDNA Dilution«.

12. **Preverite** okence »Exon 1« z mešanico primerja Exon 1.

13. **V 2,0-ml epruveti LoBind pripravite** amplifikacijsko glavno mešanico na podlagi volumnov reagenta, prikazanih na zavihku »Amp Clean Up« na kalkulatorju TSV NGS.

14. **Pripravite** reagente v vrstnem redu, prikazanem v preglednici »Amplification« na zavihku »Amp-Clean Up« v kalkulatorju TSV NGS.

POMEMBNO: Na tej stopnji pripravite samo mešanico za amplifikacijo, ki vključuje prvih pet komponent. Na tej stopnji ne dodajajte polimeraze.

15. Mešanico 10 sekund **vrtinčno zmešajte** in impulzno centrifugirajte.

16. Mešanico **hranite** na ledu.

17. **Hitro centrifugirajte** polimerazo.

18. **Dodajte** polimerazo h glavni mešanici v skladu s preglednico »Amplification« na kalkulatorju TSV NGS.

19. **Vdolbinico premešajte** s pipetiranjem 15-20 krat, pri čemer je volumen pipete nastavljen na polovico celotne prostornine glavne mešanice.
20. **Alikvotirajte** 16 µl glavne mešanice v vsako vdolbinico z DNA.
21. **Zatesnite** ploščo s tesnilnim pladnjem.
22. **Impulzno centrifugirajte** ploščo.
23. **Naložite** ploščo v predhodno segreto termično ciklično napravo.
24. **Pokrijte** ploščo s tlačno blazinico.
25. **Izvedite** amplifikacijski program HLA 11-loci.

POMEMBNO: Pred dodajanjem reakcije preverite temperaturo pokrova termične ciklične naprave. Prepričajte se, da je pokrov termične ciklične naprave na ustrezni temperaturi tarče. Reakcije ne odlagajte na hladno termično ciklično napravo.



VARNA TOČKA USTAVITVE: Takoj nadaljujte z naslednjim korakom ali shranite ampikon pri -20 °C.

2. del: Prečiščenje ampikona

1. Paramagnetne kroglice FASTplex Paramagnetic Beads za 30 minut **uravnotežite** na sobno temperaturo.
2. **Pripravite** svežo 80-odstotno raztopino etanola tako, da ločeno izmerite etanol in vodo brez nukleaz ter premešajte. Glejte kalkulator TSV NGS in zavihek »Amp Clean Up« v poglavju Prečiščenje amplifikacije.
3. Paramagnetne kroglice FASTplex Paramagnetic Beads **vrtinčno mešajte** pri srednji hitrosti 30 sekund, dokler niso kroglice povsem razpuščene.
4. **Na plošči Nunc LoBind s 96 vdolbinicami alikvotirajte** 12 µl kroglic v vsako vdolbinico. Za udobje uporabite večkanalno pipeto in rezervoar za reagent.
5. **Prenesite** ves amplificirani izdelek (približno 20 µl) v ustrezne vdolbinice.
6. **Mešajte** s pipetiranjem gor in dol 10-krat.
POMEMBNO: Konico zamenjajte za vsak vzorec. Izognite se nastajanju mehurčkov.
7. **Inkubirajte** 5 minut pri sobni temperaturi.
8. **Dajte** ploščo na magnetno okroglo stojalo. Po potrebi prilagodite ploščo, tako da kroglice tvori skupek kroglic na eni strani vsake vdolbinice. Pustite stati približno 3 minute ali dokler ni bistro.
9. **S pipeto, nastavljeno na 28 µl, previdno odstranite in zavržite** supernatant iz vsake vdolbinice, ne da bi pri tem motili skupek kroglic.
10. **S ploščo na magnetu v vsako vdolbinico dodajte** 100 µl 80-% etanola.
11. **Inkubirajte** pri sobni temperaturi 30 sekund ali dlje, dokler se raztopina ne izprazni.
12. **S pipeto, nastavljeno na 110 µl, odstranite in zavržite** supernatant.
POMEMBNO: Pazite, da ne zmotite skupka kroglic.
13. Korake 10 do 12 **ponovite** za drugo pranje z etanolom.
14. **S ploščo na magnetu odstranite** vidne ostanke etanola s pipeto P-20.
15. Kroglice **sušite na zraku** pri sobni temperaturi do približno 2 minuti na magnetu.

POMEMBNO: Ne osušite preveč.

16. S ploščo na magnetu dodajte 27 µl pufru FASTplex DNA Suspension Buffer v vsako vdolbinico.
17. Ploščo odstranite z magneta.
18. Vsak vzorec **premešajte** tako, da pipetirate gor in dol 10-krat, da se izognete ustvarjanju mehurčkov.
19. Inkubirajte 3 minute pri sobni temperaturi.
20. Postavite ploščo nazaj na magnet za približno 3 minute ali dokler ni bistra.
21. Z volumnom pipete, nastavljenim na 25 µl, prenesite supernatant na novo 0,2 ml PCR ploščo s 96 vdolbinicami, ne da bi motili kroglice.



VARNA TOČKA USTAVITVE: Takoj nadaljujte z naslednjim korakom ali shranite prečiščene izdelke pri -20 °C.

3. del: Kvantifikacija amplikona

1. **Označite** epruvete za analizo Qubit epruveta za vsak vzorec in še dve dodatni epruveti za Qubit Standard št. 1 in št. 2.
2. **Pripravite** delovno raztopino Qubit s spodaj navedenimi volumni na vzorec, plus 15 % presežka z mešanjem ekvivalenta:
 - a) 199 µl pufru Qubit dsDNA HS Buffer (komponenta B) na vzorec.
 - b) 1 µl reagenta Qubit dsDNA HS Reagent (komponenta A) na vzorec. Pred uporabo vrtnično zmešajte.
3. **Vrtnično zmešajte** delovno raztopino Qubit.

POMEMBNO: Delovno raztopino Qubit in jo zaščitite pred svetlobo. Uporabite v 2 urah.
4. **Dodajte** 198 µl delovne raztopine za vsako označeno epruveto za analizo Qubit.
5. **Dodajte** 190 µl delovne raztopine za dve epruveti za standarde.
6. **Dodajte** 2 µl odgovarjajočega prečiščenega amplikona za vsako označeno epruveto.
7. **Dodajte** 10 µl odgovarjajočega standarda v ustrezno, označeno epruveto.
8. **Hitro vrtnično** zmešajte ali centrifugirajte vse epruvete.
9. Vse epruvete **zaščitite** pred svetlobo.
10. **Inkubirajte** 2 minuti pri sobni temperaturi.
11. **Vklopite** fluorometer Qubit.
12. **Izberite** DNA z domačega zaslona.
13. **Izberite** dsDNA High Sensitivity.
14. **Pritisnite** ustrezen gumb, da začnete brati standarde.
15. **Izmerite** standarda 1 in 2, da dokončate kalibracijo.
16. **Začnite brati** epruvete z amplikonom.
17. **Na poziv nastavite** količino uporabljenega vzorca na 2 µl in enote na ng/µl.
18. **Zabeležite** koncentracijo vzorca.

19. Ponovite korake od 16 do 18 za vse vzorce.

20. Če kateri koli vzorec preseže zgornjo detekcijo, izvedite naslednje korake:

- Vzorce razredčite.
- Ponovno izmerite razredčene vzorce.
- Odčitano vrednost pomnožite s faktorjem redčenja. Za dodatna pojasnila glejte protokol Qubit.

del 4: Redčenje amplicona

Vzorci z nižjo koncentracijo morda ne vsebujejo ustrezne količine ampliconov. Koraki v tem razdelku vam bodo pomagali izračunati količino pufra FASTplex DNA Suspension Buffer za razredčenje ampliconov.

1. Za izračun razredčitve amplicona **uporabite** zavihka »Amplicon Dilution« in »Plate Layout« kalkulatorja TSV NGS.

Funkcije zavihkov »Amplicon Dilution« in »Plate Layout«

ID zavihka kalkulacijskega orodja	Funkcije
Redčenje amplicona	Izračun 48 (maks) faktorjev redčenja amplicona in volumnov razredčila za pripravo 3-30 ng vhodne DNK za reakcijo črtno kodiranje vzorca
Razporeditev plošče	Oglejte si rezultate na vhodnih volumnih DNA in pufra FASTplex DNA Suspension Buffer v formatu plošče 8 x 6

2. **Odprite** kalkulator TSV NGS.

ID-ji vzorcev bodo samodejno izpolnjeni iz ID-jev vzorcev, vnesenih v zavihek »gDNA Dilutions«.

3. **V zavihku »Amplicon Dilution« vnesite** koncentracije amplicona v stolpcu z oznako »Amplicon Conc. (ng/μL)«.

- V preglednici je prikazan volumen pufra FASTplex DNA Suspension Buffer za dodajanje v 2 μl vsakega amplicona [stolpec »Sample (μL)«].
- Vzorci, katerih koncentracije amplicona po razredčenju padejo izven zelenega vnosa 3-30 ng v pripravo knjižnice, bodo označeni z oranžno (»High«) ali rdečo (»Low«).
- Stolpec »Range« bo za ustrezen vzorec prikazal bodisi »High« ali »Low« ter količino vzorca in pufra za uporabo.
- Založni volumen celic vzorca na kalkulatorju je prilagodljiv, če potrebujete več volumna.

4. V čisto ploščo s 96 vdolbinicami dodajte navedeni volumen pufru FASTplex DNA Suspension Buffer in 2 µl založnega amplikona.
 - Za morebitne izstopajoče vzorce dodajte volumne pufru FASTplex DNA Suspension Buffer in založnega amplikona, ki sta navedeni v stolpcih Vzorec (µl) in pufer FASTplex DNA Suspension Puffer (µl) za vsak vzorec. Optimalna vhodna količina je 10 ng v volumnu 8 µl pri 1,25 ng/µl.
 - Uporabite zavihek »Plate Layout«, da najdete položaj izstopajočih vzorcev na plošči

POMEMBNO: Za vse vzorce, ki so zunaj normalnega območja koncentracij, je pomembno dodati navedeno količino.
5. Razredčen ampikon vdolbinice **previdno premešajte** s pipetiranjem.

POMEMBNO: Preprečite navzkrižno kontaminacijo.
6. Zatesnite ploščo
7. Impulzno centrifugirajte ploščo.
8. Shranite na ledu za takojšnjo uporabo ali shranite pri temperaturi -20 °C.



VARNA TOČKA USTAVITVE: Takoj nadaljujte z naslednjim korakom ali shranite prečiščene izdelke pri -20 °C.

Črtno kodiranje vzorca

Materiali in oprema

- Razredčeni amplikoni
- Epruvete Eppendorf DNA LoBind, 2,0 ml
- Epruveta PCR 0,2 ml
- 96-vdolbinic, 0,2 ml, plošče PCR
- Magnetno stojalo za epruvete 2,0 ml
- Serološke pipete, 10 ali 25 ml
- FASTplex Sample Plate 48 (kat. ID FAST-SP48B)
- FASTplex Univ Barcode P1 (kat. ID FAST-UBP1)
- FASTplex Barcoding Buffer (kat. ID FAST-BB)
- FASTplex Stop Solution (kat. ID FAST-STOP)
- FASTplex Paramagnetic Beads (uravnotežene na sobno temperaturo) (kat. ID FAST-BEAD)
- Pufer FASTplex DNA Suspension Buffer (kat. ID FAST-SUSP)
- Etanol 200 Proof, primerne kakovosti za molekularno biologijo
- Ves nabor ročnih enokanalnih pipet (20 µl, 200 µl, 1 ml)
- Ves nabor filtriranih, vnaprej steriliziranih konic za pipete
- Trakovi z 8 epruvetami
- Tlačna blazinica termične ciklične naprave PCR
- [Termična ciklična naprava s 96-vdolbinicami Veriti ali enakovredno](#)
- Kalkulator TSV NGS

1. del: Reakcija črnega kodiranja vzorca (SB), ustavitev reakcije, združevanje vzorca in prečiščenje

POMEMBNO: Pred začetkom tega koraka se prepričajte, da je pokrov termične ciklične naprave na ustrezni temperaturi tarče. Reakcije ne odlagajte na hladno termično ciklično napravo.

POMEMBNO: Pred začetkom tega koraka zagotovite, da je bil zavihek »SB UB Lib Amp« na kalkulatorju TSV NGS zapolnjen.



Koristni namig: V naslednjem razdelku črtno kodiranje vzorca spodaj do koraka 20 je treba posamezni vzorec obdelati ločeno. Pipeta z 8 kanali in uporaba traku z 8 epruvetami lahko naredi ta korak hitrejši in manj občutljiv za napake. Običajne reagentne, pufer za črtno kodiranje in raztopino »Stop Solution« lahko razdelite v predalikvote na traku z 8-epruvetami ali enakovredno za uporabo z 8-kanalno pipeto. Količina reagentov za alikvot z uporabo traku z 8 epruvetami je povzeta spodaj.

Za dva teka analize z 48 vzorci uporabite dva traka z 8 epruvetami. V vsako vdolbino vsakega traku dodajte količino reagentov.

Volumen (µl) za črtno kodiranje in pufer za ustavitev na vdolbinico traku z 8 epruветami (m/presežek)

Reagent	8 vzorcev	16 vzorcev	24 vzorcev	48 vzorcev
Pufer Barcoding Buffer	14,0	27,0	41,0	83,0
Raztopina »Stop Solution«	20,0	41,0	61,0	124,0

- Impulzno centrifugirajte** ploščo FASTplex Sample Plate 48 v centrifugi.
- Po centrifugiranju previdno odstranite** tesnilo plošče s plošče z vzorci.
- Zavržite** tesnilo plošče
POMEMBNO: Tesnila plošče ne uporabite ponovno.
- FASTplex Sample Plate 48 **dajte** na led.
- Paramagnetne kroglice FASTplex Paramagnetic Beads **uravnotežite** na sobno temperaturo.
- Nastavite** reakcijo SB na temperaturo okolja.
- Z natančno pipeto **prenesite** 16 µl reagenta SB s FASTplex Sample Plate 48 na vnaprej označeno ploščo PCR ali trak(ove) PCR z 8 epruветami.
POMEMBNO: Za vsak prenos uporabite čisto konico.
- Vizualno potrdite**, da je volumen reagenta SB videti enak.
- Po dispenziranju reagenta črtne kode vzorca odtrgajte** uporabljene vrstice plošče.
- Če ne uporabite vseh črtnih kod, ploščo vrnite** v zamrzovalnik (shranjevanje -20 °C).
- Z natančno pipeto **prenesite** 8 µl razredčene vhodne DNK (1,25 ng/µl) v vsako vdolbino (en vzorec na vdolbino) ali epruветo.
- DNK temeljito **premešajte** z vzorčnim reagentom črtne kode v vsaki epruветi tako, da desetkrat pipetirate gor in dol pri 8 µl.
POMEMBNO: Pazite, da ne vnesete preveč mehurčkov.
- Za vsak vzorec **uporabite** čiste konice.
- Previdno pipetirajte** 12 µl pufera Barcoding Buffer v vsako vdolbinico ali epruветo, pri tem pa za vsak prenos uporabite novo konico.
- Temeljito, a počasi premešajte tako, da desetkrat pipetirate gor in dol** pri 12 µl.
POMEMBNO: Pazite, da ne vnesete preveč pene. Pufer Barcoding Buffer je zelo viskozen in se peni.
- Previdno in popolnoma zatesnite ali s pokrovčkom zaprite** reakcije SB, da preprečite izhlapevanje.
- Impulzno centrifugirajte** ploščo.
- Prenesite** ploščo v termično ciklično napravo.
- Čez ploščo **položite** tlačno blazinico za PCR.
- Izvedite** naslednji program (TAG) z nameščenim ogrevanim pokrovom:

Program TAG: 55 °C za 15 min., 25 °C zadrži, Volumen reakcije: **36 µl**

POMEMBNO: Pred dodajanjem reakcije preverite temperaturo pokrova termične ciklične naprave. Prepričajte se, da je pokrov termične ciklične naprave na ustrezni temperaturi tarče. Reakcije ne odlagajte na hladno termično ciklično napravo.

21. Ploščo **vzemite** iz termične ciklične naprave.

22. **Impulzno centrifugirajte** ploščo.

23. **Dodajte** 18 µl raztopine FASTplex Stop Solution v vsako reakcijo SB.

24. 5-krat **počasi pipetirajte** gor in dol, da premešate.

POMEMBNO: Pazite, da ne vnesete preveč mehurčkov.

25. Za vsak prenos **uporabite** čisto konico.

26. Po premešanju z raztopino »Stop Solution« ploščo PCR varno ponovno zatesnite.

27. **Impulzno centrifugirajte** ploščo PCR.

28. **Prenesite** ploščo PCR v termično ciklično napravo

29. **Izvedite** naslednji program STOP z nameščenim ogrevanim pokrovom:

Program STOP: 68 °C za 10 min., 25 °C zadrži, Volumen reakcije: **54 µl**

POMEMBNO: Pred dodajanjem reakcije preverite temperaturo pokrova termične ciklične naprave. Prepričajte se, da je pokrov termične ciklične naprave na ustrezni temperaturi tarče. Reakcije ne odlagajte na hladno termično ciklično napravo.

30. **Vrtinčno zmešajte** (ali močno pipetirajte) paramagnetne kroglice FASTplex Paramagnetic Beads pri sobi temperaturi, da se povsem razpustijo.

31. Po termalnem cikličnem postopku **impulzno centrifugirajte** ploščo PCR, ki vsebuje ustavljene reakcije SB.

32. S pipeto primerne velikosti prenesite 25 µl vsake SB reakcije v eno samo 2-ml epruveto LoBind, označite to epruveto kot »Tube A« in nežno premešajte s počasnim pipetiranjem gor in dol.

Končni volumen združenega SB reakcijskega zbira je določen z velikostjo serije.

33. Ko je združevanje končano, **glejte** razdelek »Sample and Universal Barcoding« na kartici »SB UB Lib Amp« kalkulatorja TSV NGS za količino paramagnetnih kroglic FASTplex, ki jih je treba dodati združeni reakciji SB.

34. V novo 2,0 ml epruveto LoBind prenesite volumen, določen v celici kalkulatorja »Volume of stopped, pooled SB reaction« iz »Tube A« v »Tube B«. Ne bo porabljen ves volumen epruvete A.

35. To epruveto **označite** kot »Tube B«.

36. Nadaljujte z naslednjim korakom z »Tube B« in njenimi vsebinami.

Volumni bazena in paramagnetne kroglice za običajne velikosti vzorcev so navedene v preglednici SB reakcijski bazen in paramagnetnih kroglic FASTplex Paramagnetic Bead. Prostornine za različne velikosti vzorcev se lahko prikažejo s kalkulatorjem TSV NGS.

Volumni reakcije SB Reaction in paramagnetnih kroglic Paramagnetic Bead

Velikost serije (vzorci na zbir)	8 vzorcev	16 vzorcev	24 vzorcev	48 vzorcev
Volumen ustavljenih zbirov reakcije SB	144 µl	288 µl	432 µl	864 µl
Dodajte paramagnetne kroglice FASTplex Paramagnetic Beads (1 vol. ekvivalent)	144 µl	288 µl	432 µl	864 µl

37. Pojdite na zavihek »SB UB Lib Amp«, da poiščete volumne zbira, paramagnetne kroglice in reagente za preostanek dela.

38. Dodajte ustrezeni volumen paramagnetnih kroglic FASTplex Paramagnetic Beads k ustavljenemu zbiru reakcije SB v »Tube B«.

39. Temeljito premešajte s pipetiranjem gor in dol 10-krat.

40. Inkubirajte v stojalu za epruveto (nemagnetno) na polici 5 minut, da se DNK veže.

41. Epruveto **prenesite** na magnetno stojalo za približno 5 minut ali dokler ni bistra. Nastane skupek kroglic.

42. S pipeto **počasi odstranite** supernatant in ga in zavržite.

POMEMBNO: Pazite, da ne zmotite skupka kroglic.

43. Z epruveto v magnetnem stojalu dodajte 2,0 ml 80 % etanola, da popolnoma potopite skupek kroglic, ne da bi pri tem motili kroglice.

POMEMBNO: Pazljivo, da ne premešate kroglic.

44. Po 30 sekundah počasi odstranite in zavržite supernatant.

POMEMBNO: Pazite, da ne zmotite skupka kroglic.

45. Ponovite koraka 43 in 44 za skupno dve pranju z 80-% etanolom. Uporabite majhno pipeto (npr. P20) odstranite preostali etanol po drugem pranju.

46. Kroglice **posušite na zraku** tako, da epruveto pustite brez pokrova na magnetnem stojalu 2 minuti.

47. Preverite, da po koncu 2 minut v epruveti ni vidnih kapljic etanola.

- Če so kapljice etanola še vedno vidne, kroglice dlje časa sušite na zraku.



POZOR: Ne sušite skupka kroglic skupaj več kot 3 minute, sicer bo pridobitev DNK ogrožena.

48. Odstranite epruveto z magnetnega stojala.

49. Pipetirajte 50 µl pufru FASTplex DNA Suspension Buffer na vrh skupka kroglic.

50. Raztopino pufru večkrat **odpipetirajte** vzdolž notranje stene epruvete, da se skupek kroglic temeljito premeša in resuspendira.

- 51. Inkubirajte** epruveto v stojalu za epruvete (nemagnetnem) na polici 5 minut, da eluirate zbir reakcij SB iz kroglic.
- 52. Vrnite** epruveto na magnetno stojalo in pustite, da se skupek kroglic ponovno oblikuje na notranji steni epruvete približno 2 minuti ali dokler ni bistra.
- 53. Ko je supernatant povsem bister, previdno prenesite** celoten eluat the 48 µl knjižnice v novo 0,2-ml epruveto PCR. Preneseni eluat vsebuje prečiščen reakcijski zbir SB.



VARNA TOČKA USTAVITVE: Takoj nadaljujte z naslednjim korakom ali shranite prečiščene izdelke pri -20 °C.

2. del: Reakcija univerzalnega črtnega kodiranja (UB), ustavitev reakcije in prečiščenje

POMEMBNO: Pred začetkom tega koraka se prepričajte, da je pokrov termične ciklične naprave na ustrezni temperaturi tarče. Reakcije ne odlagajte na hladno termično ciklično napravo.

- Nastavite** UB reakcijo v 0,2 ml epruveti za PCR z uporabo prečiščenega SB reakcijskega zbira iz zadnjega koraka.
- Dodajte** količine, odvisno od velikosti zbira, UB P1 in pufru za črtno kodiranje z uporabo kalkulatorja TSV NGS ali v skladu s tabelo za nastavitev reakcij univerzalnega črtnega kodiranja (UB).

Nastavitev reakcije univerzalnega črtnega kodiranja (Universal Barcoding (UB) Reaction)

Velikost serije (vzorci na zbir)	8 vzorcev	16 vzorcev	24 vzorcev	48 vzorcev
Prečiščena reakcija SB	48,0 µl	48,0 µl	48,0 µl	48,0 µl
UB P1	1,7 µl	3,3 µl	5,0 µl	10,0 µl
Pufer Barcoding Buffer	25,0 µl	26,0 µl	26,0 µl	29,0 µl
Skupni volumen reakcije	74,7 µl	77,3 µl	79,0 µl	87,0 µl

- Če je velikost zbira zunaj 8, 16, 24 in 48, uporabite** »UB reaction set-up« na kartici »SB UB Lib Amp« v orodju za kalkulator TSV NGS
- Ko je pipeta nastavljena na 50 µl, temeljito premešajte** reakcijo UB s pipetiranjem 10-krat gor in dol.
- Ponovno zaprite** epruveto PCR, ki vsebuje reakcijo UB.
- Impulzno centrifugirajte** epruveto PCR.
- Prenesite** epruveto v termično ciklično napravo.
- Uporabite** tlačno blazinico PCR.
- Zaženite** naslednji program (TAG) z ustreznim volumnom reakcije in vklopljenim ogrevanjem pokrova:

Program TAG: 55 °C za 15 min., 25 °C zadrži, **Volumen reakcije:** Nastavite volumen reakcije na ustrezno velikost vzorca, ki je navedena v zgornji tabeli za nastavitev reakcij univerzalnega črtnega kodiranja (UB) ali v kalkulatorju TSV NGS.

POMEMBNO: Pred dodajanjem reakcije preverite temperaturo pokrova termične ciklične naprave. Prepričajte se, da je pokrov termične ciklične naprave na ustrezni temperaturi tarče. Reakcije ne odlagajte na hladno termično ciklično napravo.

- Po programu TAG epruveto odstranite** s termične ciklične naprave.
- Dodajte** raztopino Stop Solution v skladu s preglednico za volumne »Stop Solution Volumes« ali kalkulatorjem TSV NGS.

Volumni raztopine za ustavitev »Stop Solution Volumes«

Velikost serije (vzorci na zbir)	8 vzorcev	16 vzorcev	24 vzorcev	48 vzorcev
Raztopina »Stop Solution«	37,0 µl	38,0 µl	40,0 µl	44,0 µl
Skupni volumen reakcije	111,7 µl	115,3 µl	119,0 µl	131,0 µl

- Ko je pipeta nastavljena na 50 µl, temeljito premešajte** s pipetiranjem 10-krat gor in dol.

POMEMBNO: Pazite, da se izdelek ne speni preveč.

- Epruveto PCR, ki vsebuje reakcijo UB **ponovno zaprite** in impulzno centrifugirajte v epruveti PCR.

14. Prenesite epruveto v termično ciklično napravo.

15. Zaženite naslednji program (STOP) z ustreznim volumnom reakcije in vklopljenim ogrevanjem pokrova:

Program STOP: 68 °C 10 min., 25 °C ZADRŽI. Uporabite 100 µl volumna v programu PCR.

POMEMBNO: Pred dodajanjem reakcije preverite temperaturo pokrova termične ciklične naprave. Prepričajte se, da je pokrov termične ciklične naprave na ustrezni temperaturi tarče. Reakcije ne odlagajte na hladno termično ciklično napravo.

16. Prenesite celoten volumen ustavljene reakcije UB v eno 2,0-ml epruveto LoBind.

17. Vrtinčno zmešajte paramagnetne kroglice FASTplex Paramagnetic Beads pri sobni temperaturi, da se povsem razpustijo.

18. Izmerite volumen reakcije UB s pipeto.

19. Dodajte 1 volumski ekvivalent paramagnetnih kroglic FASTplex Paramagnetic Beads glede na volumne v spodnji preglednici ali po kalkulatorju TSV NGS k ustavljeni reakciji UB v 2,0-ml epruveti LoBind iz prejšnjega koraka.

POMEMBNO: Izhlapevanje med reakcijo lahko zmanjša volumen.

- Če pride do izhlapevanja, ustrezno prilagodite volumen paramagnetnih kroglic iz spodnje tabele.

Prečiščevanje ustavljene reakcije UB (Stopped UB Reaction) s paramagnetnimi kroglicami FASTplex Paramagnetic Beads

Velikost serije (vzorci na zbir)	8 vzorcev	16 vzorcev	24 vzorcev	48 vzorcev
Volumen reakcije UB	112,0 µl	115,0 µl	119,0 µl	131,0 µl
Volumen FASTplex Paramagnetic Beads	112,0 µl	115,0 µl	119,0 µl	131,0 µl

20. Za velikost vzorca, ki ni prikazana spodaj, glejte zavihek »SB UB Lib Amp« v kalkulatorju TSV NGS.

21. Če se med reakcijo izhlapevanja volumen zmanjša, izvedite naslednje korake:

- Izmerite volumen reakcije UB.
- Dodajte enak volumen FASTplex Paramagnetic Beads.

22. Temeljito premešajte s pipetiranjem.

23. Inkubirajte pri sobni temperaturi v stojalu za epruveto (nemagnetno) na polici 5 minut, da se DNK veže.

24. Prenesite 2,0-ml epruveto LoBind na magnetno stojalo.

25. Pustite 3 minute, da se kroglice povsem ločijo. Ob eni strani epruvete se bo oblikoval skupek kroglic in supernatant bi moral biti popolnoma bister po približno 3 minutah.

26. S pipeto počasi odstranite supernatant in ga in zavržite.

POMEMBNO: Pazite, da ne zmotite skupka kroglic.

27. Z epruveto v magnetnem stojalu dodajte 500 µl 80-% etanola in pazite, da je skupek kroglic potopljen.

POMEMBNO: Pazite, da ne zmotite skupka kroglic.

28. Počasi odstranite in zavržite supernatant po 30 sekundah ali dokler se ne očisti.

POMEMBNO: Pazite, da ne zmotite skupka kroglic.

29. Ponovite korake od 27 do 28 za skupno 2 pranje z 80-% etanolom.

30. Uporabite veliko pipeto odstranite večino odpadnega etanola.

31. Uporabite manjšo pipeto (npr. P20), da odstranite preostali etanol, ki se nabira na dnu epruvete.

32. Kroglice **posušite na zraku** tako, da epruveto pustite brez pokrova na magnetnem stojalu 2 minuti.

33. Preverite, da po koncu 2 minut v epruvetah ni vidnih kapljic etanola.

- Če so kapljice etanola še vedno vidne, kroglice dlje časa sušite na zraku.



POZOR: Ne sušite skupka kroglic skupaj več kot 3 minute, sicer bo pridobitev DNK ogrožena.

34. Odstranite epruveto z magnetnega stojala.

35. Dodajte 13 µl pufra FASTplex DNA Suspension Buffer.

- Tekočino večkrat **odpipetirajte** vzdolž notranjosti epruvete, da skupek kroglic temeljito resuspendirate.

36. Inkubirajte v stojalu za epruvete (nemagnetnem) na polici 5 minut, da se DNK veže.

37. Epruveto **vrnite** v magnetno stojalo.

38. Pustite, da se skupek kroglic oblikuje na notranji steni epruvete približno 2 minuti oziroma dokler se ne zbistri.

39. Ko se supernatant popolnoma izprazni, previdno prenesite 10 µl eluata DNA v novo 0,2-ml epruveto LoBind. Preneseni eluat vsebuje DNK, očiščeno iz reakcije UB in je zdaj pripravljen za amplifikacijo knjižnice.



VARNA TOČKA USTAVITVE: Takoj nadaljujte z naslednjim korakom ali shranite prečiščene izdelke pri -20 °C.

AMPLIFIKACIJA KNJIŽNICE

Materiali in oprema

- Knjižnica s črtno kodo UB
- Epruveta PCR 0,2 ml
- FASTplex Library Amp Mix (kat. ID FAST-LAM)
- FASTplex Library Primer Mix (kat. ID FAST-LPM)
- FASTplex Paramagnetic Beads (kat. ID FAST-BEAD)
- Pufer FASTplex DNA Suspension Buffer (kat. ID FAST-SUSP)
- Ročne enokanalne pipete (20 µl, 200 µl, 1 ml)
- Filtrirane, vnaprej sterilizirane konice za pipete
- Etanol 200 Proof, primerne kakovosti za molekularno biologijo
- [Termična ciklična naprava s 96-vdolbinicami Veriti \(ali enakovredno\)](#)
- Magnetno stojalo za epruvete 2,0 ml
- Voda brez nukleaze
- Epruvete Eppendorf DNA LoBind, 2,0 ml
- Fluorometer Qubit® ali enakovredno
- Komplet za analizo Qubit dsDNA HS
- Epruvete za analizo Qubit
- Kalkulacijsko orodje

1. del: Amplifikacijska reakcije knjižnice

POMEMBNO: Pred začetkom tega koraka se prepričajte, da je pokrov termične ciklične naprave na ustrezni temperaturi tarče. Reakcije ne odlagajte na hladno termično ciklično napravo.

Volumni reagenta za spodnje korake

Reagent	Volumen
Mešanica FASTplex Library Primer Mix	15 µl
Knjižnica s črtno kodo od koraka 39 v 2. delu razdelka Črtno kodiranje vzorca	10 µl
FASTplex Library Amp Mix	75 µl

1. **Kot je opisano v zgornji preglednici, dodajte** 15 µl mešanice knjižnice Primer Mix 10 µl eluatu knjižnice s črtno kodo v epruveto 0,2 ml PCR iz [koraka 39](#) v 2. delu postopka Črtno kodiranje vzorca.
2. **Dodajte** 75 µl amplifikacijske mešanice knjižnice.
3. **Mešajte** vdolbinico s pipetiranjem.
4. **Dajte pokrov** na epruveto PCR in impulzno centrifugirajte.
5. **Uporabite** ustrezne tlačne blazinice PCR.

6. **Izvedite** naslednji program FASTplex Ion Library Amplification PCR z ogrevanim pokrovom in načinom emulacije 9600 ali segrevanjem +0,8 °C/sek in hlajenjem -1,6 °C/sek z ogrevanim pokrovom nastavljenim na 105 °C. Skupni volumen reakcije je 100 µl.

• **Program FASTplex Ion Library Amplification:**

Temperatura	Čas	Cikel
72 °C	10 min	1
98 °C	3 min	1
98 °C	15 sek	9
66 °C	30 sek	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1
4 °C	ZADRŽI	1

Hitrost emulacije 9600 in ogrevan pokrov

POMEMBNO: Pred dodajanjem reakcije preverite temperaturo pokrova termične ciklične naprave. Prepričajte se, da je pokrov termične ciklične naprave na ustrezni temperaturi tarče. Reakcije ne odlagajte na hladno termično ciklično napravo.

7. **Po PCR impulzno centrifugirajte** amplifikacijsko reakcijo knjižnice.
8. **Prenesite** 95 µl reakcije knjižnice amplifikacije v 2,0-ml epruveto LoBind.
9. **Če je manj kot 95 µl, zabeležite** volumen za 2. DEL: Prečiščenje Amplificirane knjižnice, [1. korak](#).

POMEMBNO: Volumen se običajno zmanjša zaradi izhlapevanja med termičnim cikliranjem, zato je pomembno, da prostornino izmerimo pred koraki prečiščenja.



VARNA TOČKA USTAVITVE: Takoj nadaljujte z naslednjim korakom ali shranite prečiščene izdelke pri -20 °C.

2. del: Prečiščenje Amplificirane knjižnice

1. **Prenesite** 95 µl amplificiranega produkta v svežo 2,0-ml epruveto LoBind.
2. **Dodajte** 305 µL pufru FASTplex DNA Suspension Buffer v končni volumen 400 µl.
 - **Če je na voljo manj kot 95 µL, ustrezno povečajte** prostornino pufru FASTplex DNA Suspension Buffer, da dosežete končni volumen 400 µl.
3. **Vrtinčno zmešajte** paramagnetne kroglice FASTplex Paramagnetic Beads pri sobni temperaturi, da se povsem razpustijo.
4. **Dodajte** 240 µl paramagnetnih kroglic FASTplex Paramagnetic Beads (0,6 x ekvivalente volumna) k razredčeni multipleksirani knjižnici.
5. Temeljito **premešajte** s pipetiranjem gor in dol.
6. **Inkubirajte** v stojalu za epruveto (nemagnetno) na polici 5 minut, da se DNK veže.
7. **Prenesite** 2,0-ml epruveto LoBind na magnetno stojalo in kroglice pustite 3 minute, da se povsem umirijo. Ob eni strani epruvete se bo oblikoval skupek kroglic in supernatant bi moral biti po približno 3 minutah popolnoma bistro moder.
8. **Počasi prenesite** 580 µl supernatanta v svežo 2,0-ml epruveto LoBind.

POMEMBNO: Supernatanta ne zavržite. Pazite, da ne zmotite skupka kroglic.

9. **Dodajte** 65,5 µl paramagnetnih kroglic FASTplex Paramagnetic Bead k supernatantu v novo 2,0-ml epruveto LoBind.
10. Vdolbinico **mešajte** s pipetiranjem gor in dol.
11. **Inkubirajte** pri sobni temperaturi na polici v stojalu za epruveto (nemagnetnem) 5 minut, da se DNK veže.
12. **Prenesite** 2,0-ml epruveto LoBind na magnetno stojalo.
13. **Pustite**, da se kroglice ločujejo približno 3 minute ali dokler niso bistre.
14. **S pipeto, nastavljeno na 600 µl, odstranite in zavržite** supernatant.

POMEMBNO: Ne zmotite skupka kroglic.

15. **Z epruveto v magnetnem stojalu dodajte** 500 µl 80-% etanola in pazite, da je skupek kroglic potopljen.

POMEMBNO: Pazljivo, da ne premešate kroglic.

16. **Inkubirajte** 30 sekund.
17. **Pustite** epruveto na magnetnem stojalu.
18. **Previdno odstranite in zavržite** supernatant.
19. **Ponovite** korake od 15 do 18 za skupno dve pranju z 80-% etanolom.
20. **Uporabite** majhno pipeto (npr. P20) odstranite preostali etanol po drugem pranju.
21. Kroglice **posušite na zraku** tako, da epruveto pustite brez pokrova na magnetnem stojalu 2 minuti.
22. **Preverite**, da po 1 minuti v epruveti ni vidnih kapljic etanola.
 - Če so kapljice etanola še vedno vidne, kroglice dlje časa sušite na zraku.



POZOR: Ne sušite skupka kroglic skupaj več kot 3 minute, sicer bo pridobitev DNK ogrožena.

23. **Odstranite** epruveto z magnetnega stojala.
24. **Dodajte** 35 µl pufra FASTplex DNA Suspension Buffer.
25. Tekočino večkrat **odpipetirajte** vzdolž notranjosti epruvete, da se skupek kroglic temeljito razkropi.
26. **Inkubirajte** 5 minut v nemagnetnem stojalu za epruvete na klopi, da eluirate multipleksirano knjižnico iz magnetnih kroglic.
27. Epruvete **vrnite** v magnetno stojalo.
28. **Pustite**, da se skupek kroglic oblikuje na notranji steni epruvete približno 2 minuti oziroma dokler se ne zbistri.

29. Ko se supernatant popolnoma izprazni, previdno prenesite 33 µl eluata DNA v novo 2,0-ml epruveta LoBind.
Preneseni eluat vsebuje končno knjižnico.



VARNA TOČKA USTAVITVE: Takoj nadaljujte z naslednjim korakom ali shranite prečiščene izdelke pri -20 °C.

3. del: Kvantifikacija končne knjižnice



Koristen namig: Če želite združiti več knjižnic SB, ki se ne prekrivajo, sledite spodnjemu protokolu za vsako knjižnico. Za knjižnice, ki vsebujejo enako število vzorcev, zmešajte končno knjižnico 1:1. Za knjižnice z različnimi številskimi vzorci sledite spodnjemu protokolu, vendar zmešajte knjižnice z uporabo volumna, sorazmerno s številom vzorcev. Če imata na primer dve knjižnici velikosti vzorcev 8 in 20, zmešajte 8 µl in 20 µl ali 4 µl in 10 µl knjižnic pri končni koncentraciji 0,045 ng/µl.



Opomba: Priporočena koncentracija knjižnice je enaka ne glede na to, ali uporabljate Ion 520 ali 530 Chip

- 1. Označite** pet epruvet za analizo Qubit – tri za trikratno kvantifikacijo knjižnice in dve dodatni epruveti za Qubit Standard št. 1 in št. 2.
- 2. Pripravite** delovno raztopino Qubit v 5 ml epruveti za 10 vzorcev (za upoštevanje meritev v tem koraku in [25. koraku](#) tega razdelka za naknadno razredčene vzorce) z mešanjem ekvivalentov:
 - 199 µl pufru Qubit dsDNA HS Buffer (komponenta B) na vzorec
 - 1 µl reagenta Qubit dsDNA HS Reagent (komponenta A) na vzorec. Pred uporabo reagent vrtnično zmešajte.
- 3. Vrtinčno zmešajte** delovno raztopino Qubit.
- 4. Prekrijte** s folijo.

POMEMBNO: Uporabite v 2 urah.
- 5. Dodajte** 198 µl delovne raztopine za tri epruvete za analizo Qubit, ki se uporabljajo za trikratno kvantifikacijo knjižnice.
- 6. Dodajte** 190 µl delovne raztopine v dve epruveti, uporabljeni za standarde Qubit.
- 7. Dodajte** 2 µl prečiščene knjižnice za tri epruvete za analizo Qubit, ki se uporabljajo za trikratno kvantifikacijo knjižnice.
- 8. Dodajte** 10 µl ustreznega reagenta Qubit Standard v dve epruveti, ki ju uporabljate za reagente Qubit Standard.
- 9. Hitro vrtnično zmešajte** ali centrifugirajte vse epruvete.
- 10. Epruvete prekrijte** s folijo.
- 11. Epruvete inkubirajte** 2 minuti pri sobni temperaturi.
- 12. Vklopite** fluorometer Qubit.
- 13. Izberite** DNA z domačega zaslona.
- 14. Izberite** dsDNA High Sensitivity.
- 15. Pritisnite** ustrezen gumb, da začnete brati standarde.
- 16. Izmerite** standarda 1 in 2, da dokončate kalibracijo. To kalibracijo lahko uporabite za kvantificiranje končne knjižnice v [25. koraku](#) tega razdelka, če se končna kvantifikacija izvede v 2 urah.
- 17. Začnite z odčitavanjem** treh epruvet knjižnice.

18. Na poziv zamenjajte količino uporabljenega vzorca na 2 µl in enote na ng/µl.

19. Zabeležite tri koncentracije knjižnice.

20. V kalkulatorju TSV NGS odprite zavihek z imenom »Final Quant«. Kalkulator bo samodejno prikazal želeno ciljno koncentracijo 0,045 ng/µl; uporabnik lahko to prilagodi, če je potrebno vmesno redčenje.

21. Vnesite povprečno koncentracijo treh odčitkov, ki je bila določena s pomočjo Qubit, v kalkulator TSV NGS »Pool Quant Values (ng/µL)«.

Kalkulator bo izračunal količino pufru FASTplex DNA Suspension Buffer in volumna zbira vzorcev, ki ju je treba združiti v novi 2,0-ml epruveti LoBind, da dosežete ustrezno koncentracijo knjižnice.

22. Če knjižnice ne uporabite takoj za nalaganje v sistem Ion Chef™, zamrznite nerazredčeno ali vmesno razredčeno knjižnico pri -20 °C za 72 ur ali manj.



Koristni namig: »Diluted Pool Volume (µL)« je mogoče po potrebi prilagoditi, vendar končne zelene ciljne koncentracije ni mogoče urediti v kalkulatorju. Morda bi bilo koristno narediti vmesno razredčitev, da boste lažje dosegli končno koncentracijo 0,045 ng/µl.

23. Kvantificirajte tri končne razredčene knjižnice z raztopino Qubit Working Solution, da potrdite ustreznost koncentracije.

24. Po potrebi **prilagodite** koncentracijo z dodajanjem pufru za suspenzijo FASTplex DNA Suspension Buffer ali nerazredčene knjižnice, da dosežete ustrezno koncentracijo.

25. Kvantifikacijo ponavljajte, dokler ne dosežete pravilne koncentracije. Zapišite končno koncentracijo v besedilno polje kalkulator TSV NGS.

POMEMBNO: Uporabite 195 µl delovne raztopine Qubit s 5 µl knjižnice za trikratni odčitek Qubit zaradi nizke koncentracije.

26. Knjižnico **hranite** na ledu za takojšnje nalaganje v instrument Ion Chef.

PRIPRAVA na SEKVENCER ION GENESTUDIO S5 PLUS ali ENAKOVREDEN in SISTEM ION CHEF

Materiali in oprema

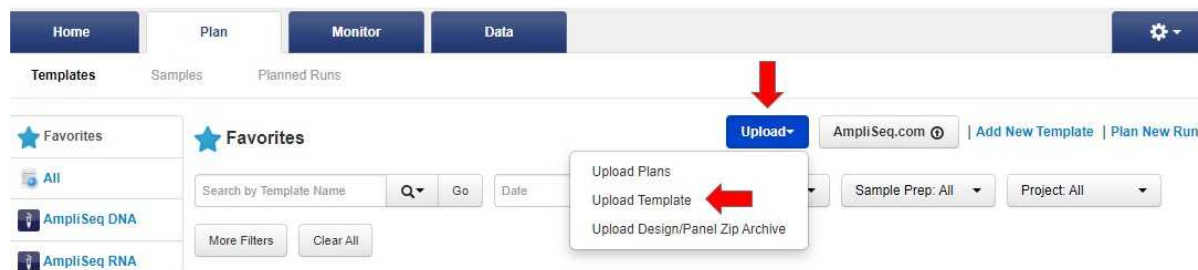
- Končna knjižnica s koncentracijo, prilagojeno za komplet Ion 520 in Ion 530 ExT Kit-Chef
- Komplet 520 in 530 ExT Kit-Chef
- Komplet Ion 520 ali 530 Chip Kit

1. del: Nalaganje predloge FASTplex



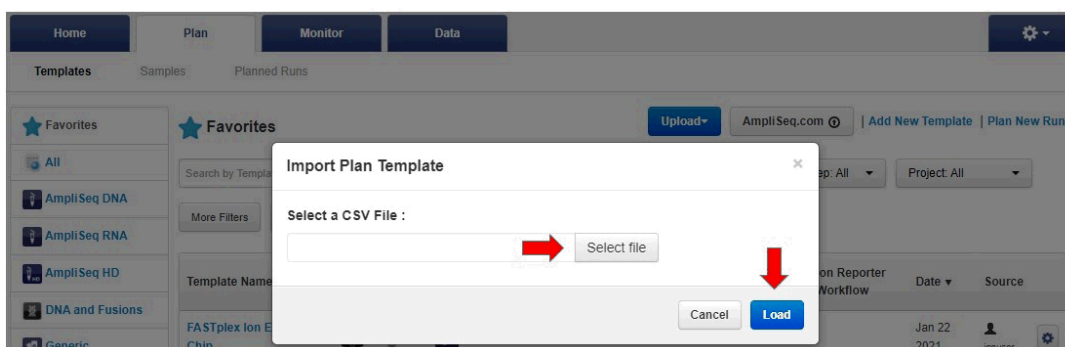
Opomba: Predloge prenesite s spletne strani www.onelambda.com. Če imate težave pri iskanju ali prenosu ustreznih predlog, se obrnite na tehnično podporo One Lambda na 1lambda-techsupport@thermofisher.com.

1. Če želite naložiti predloge za sekvenciranje FASTplex Ion Sequencing (predloge FASTplex Ion ExT 530 ali predloge FASTplex Ion ExT 520), se prijavite v brskalnik Torrent za strežnik Torrent, povezan s sistemom Ion S5 ali Ion GeneStudio S5 in sistemom Ion Chef.
2. Izberite zavihek »Plan«, ki vas pripelje do zaslona »Templates«.
3. Kliknite modri gumb »Upload«, kot prikazuje slika 2.



Slika 2. Posnetek zaslona spustnega menija »Upload«

4. Izberite »Upload Template« s spustnega menija, kot prikazuje slika 2. Odpre se okno »Import Plan Template«, kot je prikazano na sliki 3.

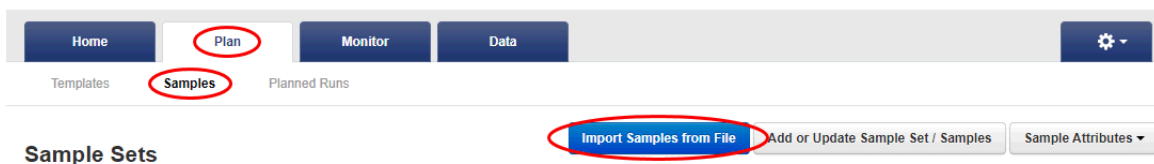


Slika 3. Posnetek zaslona okna »Import Plan Template«

5. Kliknite »Select file« in izberite preneseno predlogo FASTplex Ion ExT 530 ali predlogo FASTplex Ion ExT 520, ki se ujema z vašo različico programske opreme Torrent Suite. Datoteko je treba shraniti na lokacijo nekje v računalniku ali na pogon USB.
6. Ko izberete želene predloge, kliknite modri gumb »Load«. Predloga bo prikazana kot uspešno uvožena.

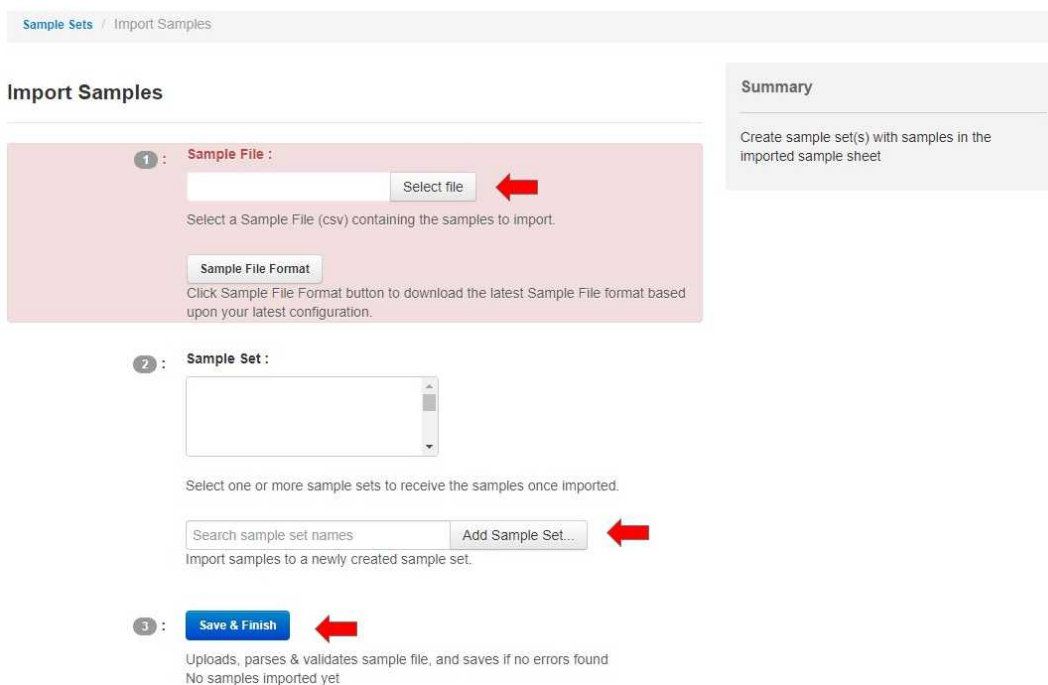
2. del: Ustvarjanje in nalaganje seznama vzorcev

1. **Odprite** zavihek »Sample Sheet« v kalkulatorju TSV NGS, da najdete list z vzorci. Stolpci lista vzorcev »Sample_Name« in »Sample_ID« se samodejno izpolnijo z informacijami, ki ste jih vnesli prej.
2. Izpolnjen list vzorcev **izvozite** z gumbom »Export« in poimenujete list vzorcev.
3. Po želji **kopirajte** datoteko na pomnilniški pogon USB.
4. Če želite **naložiti ta seznam vzorcev za nastavev načrtovanega teka, se prijavite** v brskalnik Torrent za strežnik Torrent, ki je povezan s sistemom Ion S5 ali Ion GeneStudio S5.
5. **Izberite** zavihek »Plan« in nato v podmeniju izberite »Samples«.
6. **Kliknite** gumb »Import Samples from File« na desni, kot je prikazano na sliki 2.



Slika 4. Posnetek zaslona zavihka »Plan«, podmenija »Samples« in gumba »Import Samples from File«

7. **Sledite** pozivom za uvoz vzorcev.
8. **Izberite** nov »Sample List for Upload«, da ga uvozite.
9. **Z gumbom »Select File« poiščite** seznam vzorcev, kot je prikazano na sliki 5.
10. **Izberite** »Add Sample Set«, kot prikazuje slika 5.
11. **Vnesite** »Sample Set Name«, kot prikazuje slika 5.

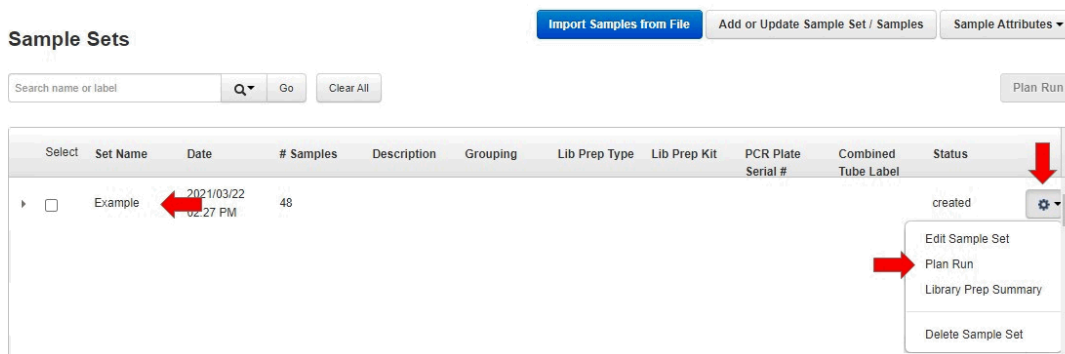


Slika 5. Posnetek zaslona za dodajanje novega imena niza vzorcev

12. Kliknite »Save & Finish«.

3. del: Ustvarite načrtovani tek in prenesite seznam vzorcev

1. Če želite ustvariti Načrtovani tek, se prijavite v brskalnik Torrent za strežnik Torrent, ki je povezan s sistemom Ion S5 ali Ion GeneStudio S5 in sistemom Ion Chef.
2. Izberite zavihek »Plan«.
3. V podmeniju izberite »Samples«.
4. Najdite niz vzorcev, naložen za tek.
5. Kliknite ustrezno ikono zobnika na desni.
6. Izberite »Plan Run«, kot prikazuje slika 6.



Slika 6. Posnetek zaslona spustnega menija »Plan run«

7. V pojavnem oknu označite »Show All Plan Templates«.
8. S spustnega menija izberite »FASTplex Ion ExT«.
9. Kliknite gumb »Plan Run«.
10. Kliknite »Next« na zavihku »Barcoding« in zavihku »Projects«.
11. Na zavihku »Save & Finish« poimenujte tek v polju »enter a plan name«.
12. Kliknite »Save & Finish«.



Opomba: Če je različica Torrent Suite starejša od 5.10, se lahko pojavi sporočilo o napaki, ki zavrne predloženo predlogo. Če se pojavi sporočilo o napaki, se obrnite na tehnično podporo One Lambda na 1lambda-techsupport@thermofisher.com.

TEK na SISTEMU ION CHEF

Smernice za uporabo sistema Ion Chef



Opomba: Vse komponente instrumenta Ion Chef so samo za enkratno uporabo.

- Ves potrošni material in vložke Ion Chef System **hranite** pod priporočenimi pogoji in v pokončnem položaju.
- Ob prihodu in ponovno pred uporabo **preglejte** ves potrošni material in vložke sistema Ion Chef glede poškodb.
- Čipe za sekvenciranje **držite** tako, da jih nežno primete za robove.
- **Ko sistem Ion Chef ni v uporabi:**
 - a) Odstranite ves potrošni material in reagente iz instrumenta.
 - b) Zaprite vrata instrumenta.
- **Pred uporabo se prepričajte**, da je bil sistem Ion Chef po zadnji uporabi očiščen.
- Preden jih naložite na instrument Ion Chef, se **prepričajte**, da so vse komponente čiste in suhe.
- Pred nalaganjem komponent se **prepričajte**, da so predelki postaje za reagente in raztopine suhi in brez kondenzata.
- **Ne uporabljajte ponovno nobenega potrošnega materiala ali reagentov** sistema Ion Chef, razen nove konice pipete vložka v2. Po vsakem teku se prazna konica pipete vložka v2 se prenese na postajo za odlaganje odpadkov.
- Vložek z reagenti Ion S5™ ExT Chef Reagents Cartridge odstranite iz škatle 45 minut pred uporabo, nato pa pustite, da se segreje na sobno temperaturo.

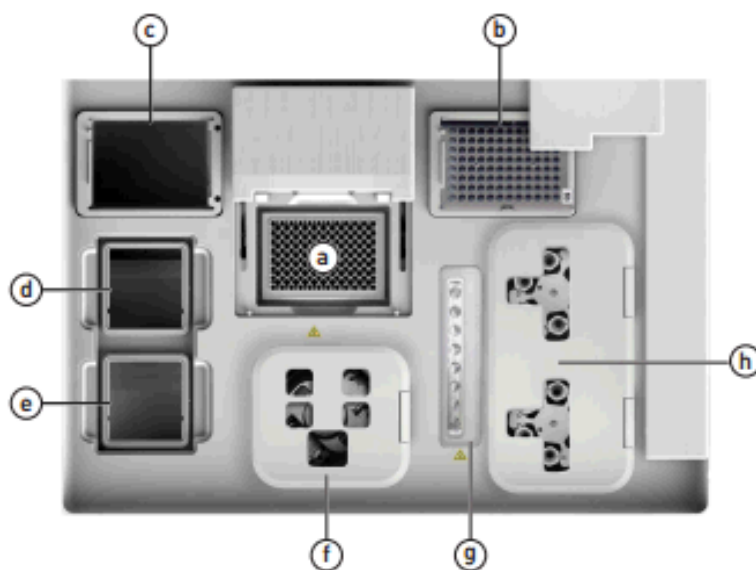
POMEMBNO: Centrifuga za nalaganje čipov Ion Chef je ocenjena za delovanje pri navedenih rotacijskih frekvencah z nosilci čipov, čipi in adapterji. Centrifuga mora biti uravnotežena.

- **Odstranite in sekvencirajte** čipe v 1 uri po tem, ko jih sistem Ion Chef konča z nalaganjem.
- **Če naloženega čipa ni mogoče takoj sekvencirati, ga shranite** v posodi za shranjevanje čipov pri 4 °C, dokler ni pripravljen za tek (največ 6–8 ur).

Če je bil naložen čip shranjen, ga odstranite iz shrambe pri 4 °C (vendar ga hranite v posodi za shranjevanje čipov) vsaj 20 minut pred zagonom, tako da se čip segreje na sobno temperaturo.

Materiali in oprema

- Komplet Ion 520 ali 530 Chip Kit
- Komplet Ion 520 in 530 ExT Kit-Chef
- Raztopine Ion S5 Chef Solutions
- Reagenti Ion S5 Ext Chef Reagents
- Potrebščine Ion S5 Chef Supplies (glejte sliko 7):
 - Adapterji čipov
 - Vložek Enrichment Cartridge v2
 - Vložek Tip Cartridge v2
 - Plošča PCR in tesnilo okvira v2
 - Pokrov za enkratno uporabo za rekuperacijsko postajo v2
 - Rekuperacijska epruveta Recovery Tube v2



Slika 7. Povzetek zaloga, ki so nameščeni na Ion Chef, glejte 1. del spodaj za navodila, ki ustrezajo vsakemu označenemu elementu.

1. del: Nastavitev sistema Ion Chef

1. **Pritisnite** gumb za izmet v zgornjem desnem kotu zaslona, da odprete sprednji del, če je zaprt.
2. **Odstranite** vse vložke in potrošni material iz njihovih ovojev in škatel.
3. **Postavite** jih na polico poleg instrumenta Ion Chef.
4. **Postavite** novo stojalo za konice v položaj C. Prazno stojalo za konice iz prejšnjega postopka bo postavljeno v položaj B.
5. **Postavite** polovično obrobljeno ploščo s 96 vdolbinicami na položaj A.
6. **Potisnite** tesnilo plošče pod pokrov, ki je nameščen za ploščo s 96 vdolbinicami. Zareze morajo biti obrnjene navzven in navzgor ter gladko drsijo v reži.
7. **Odstranite pokrovček** s 4 epruvet na vložku z reagentom.

8. **Dodajte** 50 µl končne razredčene knjižnice v epruveto za vzorce Ion S5 Ext Chef Library (epruveta s črtno kodo na vložku z reagenti).
9. Vložek z reagenti Ion S5 Ext Chef Reagents Cartridge namestite v položaj D , zatem ko ste odprli štiri epruvete na vložku.
10. Vložek z raztopinami Ion S5 Ext Chef Solutions Cartridge namestite v položaj E
11. **Namestite** čip Ion torrent v žlico rotorja in ga vpnite v adapter za čipe (glejte sliko 8), naložite tehniko čipov v prazen položaj centrifuge za nalaganje čipov Ion Chef in postavite sestavljen čip v centrifugo v položaj F.



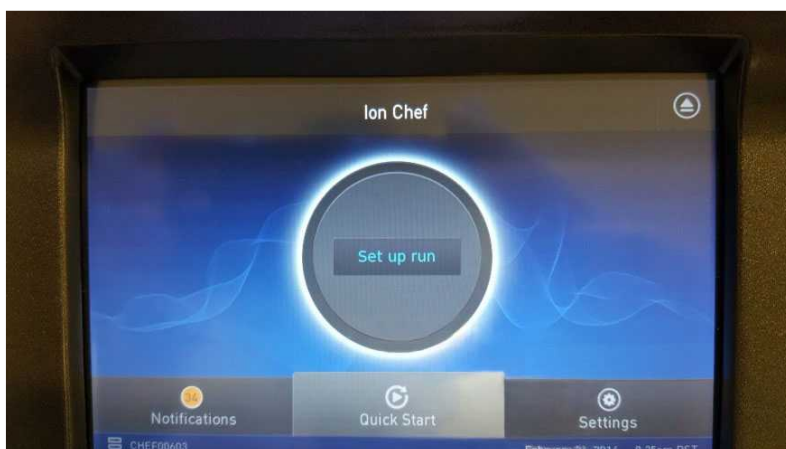
Slika 8. Čip Ion torrent Chip v nosilcu rotorja

12. Vložek Enrichment Cartridge **postavite** na položaj G.
13. Rekuperacijske epruvete Recovery Tubes **postavite** na vsa prazna mesta.
14. Pokrove za enkratno uporabo rekuperacijske postaje Recovery Station Disposable Lids **postavite** na položaj H (Position H). Črtna koda mora biti obrnjena navzgor, vrata pa obrnjena proti zadnji strani naprave.

2. del: Zagon teka Chef ExT

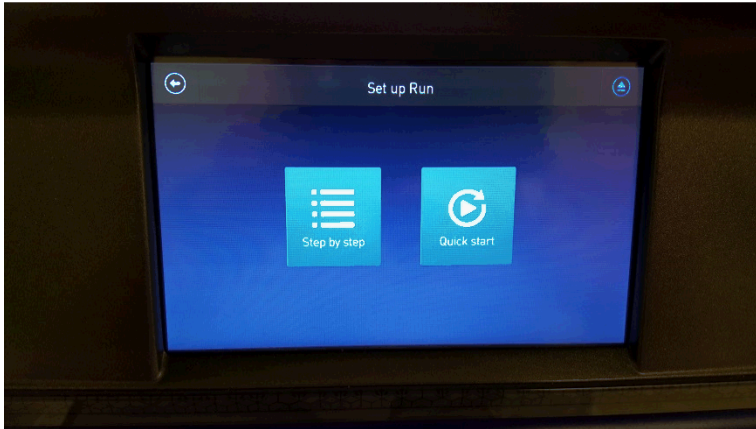
POMEMBNO: Ustvarite načrtovani tek, preden zaženete Chef ExT na Ion Chef. Ion Chef prejema informacije iz načrtovanega teka v predlogo.

1. **Ko so vsi reagenti in vzorec nastavljeni na Ion Chef, pritisnite »Set up run«, kot je prikazano na sliki 9.**



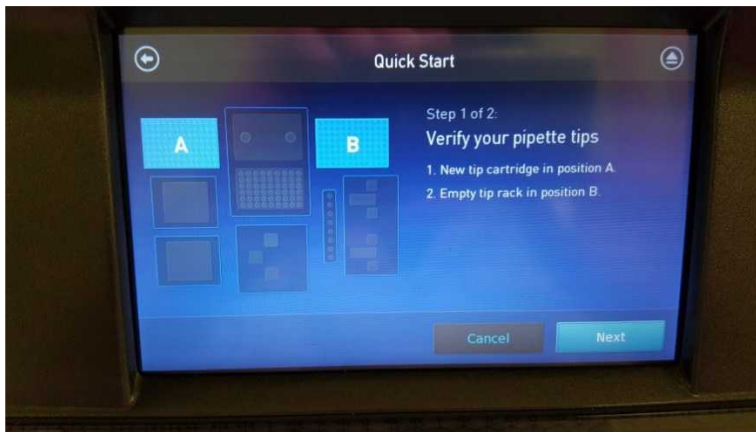
Slika 9. Posnetek zaslona gumba »Set up run«

2. **Pritisnite** »Quick start«, kot prikazuje slika 10.



Slika 10. Posnetek zaslona gumba »Quick Start«

3. **Pritisnite** »Next«, da zaženete potrditev konice Ion Chef, kot prikazuje slika 11.



Slika 11. Posnete zaslona gumba »Next«

4. **Pritisnite** »Start check«, da začnete skeniranje instrumenta, kot prikazuje slika 12.



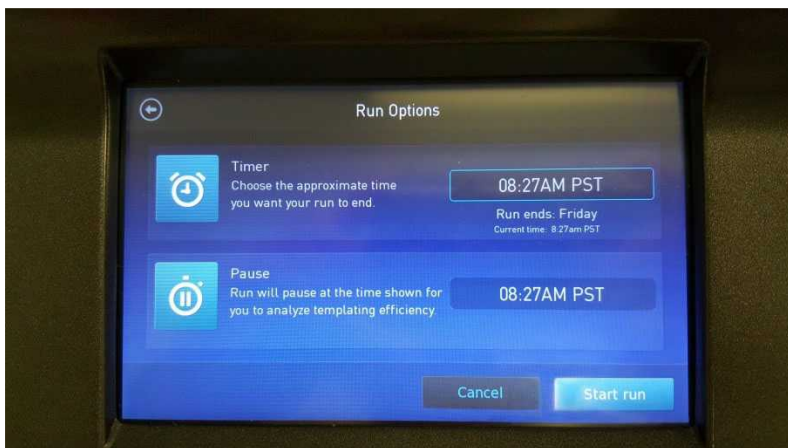
Slika 12. Posnetek zaslona gumba »Start check«

5. **Izberite** svoj izbor načrta teka na zaslonu Destinacija podatkov, kot prikazuje slika 13.



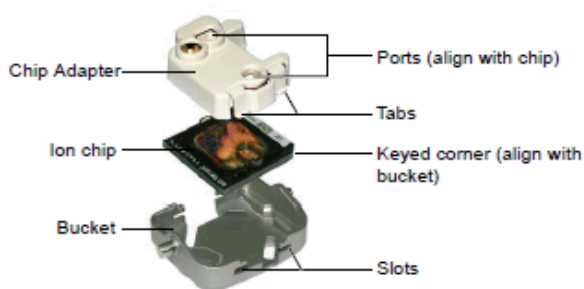
Slika 13. Posnetek zaslona gumba »Data Destination«

6. Če je potrebno zagon sistema Chef skozi celoten proces do nalaganja čipov, izberite Časovnik na zaslonu Možnosti zagona (glejte sliko 14). Možnost Časovnik omogoča izbiro, kdaj se tek konča. Teki običajno trajajo 6 ur in 45 minut.



Slika 14. Posnetek zaslona zaslona »Run Options«

7. Za začetek teka **pritisnite** »Start run«.
8. Ko se postopek Chef ExT zaključi, **odstranite** adapter za čip in naložen čip iz nosilca (glejte sliko 15).



Slika 15. Adapter čipa, Naložen čip in Konfiguracija nosilca

9. **Preverite** čip glede odvečne tekočine.
10. **Uporabite** pipeto P-200, da odstranite presežek.
11. Za nalaganje S5 s čipom **nadaljujte** z »Start the Sequencing Run«.
12. Po zaključku postopka Ion Chef mora tehnik, ki je izvedel, in drugi tehnik, ki je preveril dokumentacijo, podpisati zavihek Ion Chef v ALT-0007FORM-A.

UPORABA ION S5 ali ION GENESTUDIO S5

Smernice za uporabo Ion S5 ali Ion GeneStudio S5

POMEMBNO: Sekvencerji Ion S5, Ion S5 XL, Ion GeneStudio S5 in Ion GeneStudio S5 Plus so opremljeni za preverjanje združljivosti vsakega čipa in potrošnega materiala, naloženega med inicializacijo in sekvenciranjem, ter za dodatno potrditev, da te komponente niso presegle roka uporabnosti. Da bi se izognili izjemam med inicializacijo, preverite datum poteka za vsak potrošni material, preden ga namestite na instrument.

Opomba: Uporabljenih čipov ni mogoče ponovno uporabiti.



- Vložen z reagentom Ion S5 ExT Sequencing Reagents (sistem Ion Chef) **vzemite iz škatle** 1 uro pred uporabo.
- **Pustite**, da se vložek Ion S5 ExT Sequencing Reagents uravnoteži na sobno temperaturo.
- **Ne odstranite** vložka Ion S5 [ExT] Sequencing Reagents iz folije do tik preden ga naložite, zato da lahko neuporabljeni vložek vrnete v shrambo, če je tek sekvenciranja zakasnen.

POMEMBNO: Pred inicializacijo je treba sekvencerje Ion S5, Ion S5 XL, Ion GeneStudio S5 in Ion GeneStudio S5 Plus očistiti. To se običajno izvede samodejno ob zaključku prejšnjega teka sekvenciranja. Če pa se tek sekvenciranja ni končal (zaradi izpada električne energije, uporabniškega prekinitve vožnje itd.), instrument ne bo dovolil nadaljnje inicializacije, dokler ni opravljeno čiščenje. Za navodila za ročno čiščenje glejte uporabniški priročnik.

- **Reciklirajte ali zavrzite** vse reagente in potrošni material v skladu z veljavnimi predpisi.
- **V primeru razlitja ali puščanja naredite** naslednje:
 - a) Odstranite steklenico raztopine za pranje Ion S5 [ExT], nato odstranite in izpraznite rezervoar za odpadke.
 - b) Odstranite vložek Ion S5 [ExT] Sequencing Reagents.
 - c) Preglejte prostore za odpadne in nukleotidne reagente glede tekočine.
 - d) Z vpojnim papirjem vpijte čim več tekočine. Prizadeto območje sperite z 10-% raztopino belila.
 - e) Prizadete površine obrišite s 70-% izopropanolom in jih nato pustite, da se posušijo na zraku.

Reagenti

- Ion S5 [ExT] Sequencing Reagents
- Vložek Ion S5 [ExT] Sequencing Reagents
- Ion S5 [ExT] Sequencing Solutions
- Ion S5 [ExT] Wash Solution
- Ion S5 [ExT] Cleaning Solution



Slika 16. Položaji komponent sistema Ion S5 in Ion GeneStudio S5



Koristni namig: Priporočljivo je, da se sekvenciranje začne čim prej po zaključku nalaganja čipa in inicializacije instrumenta; vendar se lahko uspešen tek sekvenciranja začne do 24 ur po inicializaciji instrumenta.

1. del: Inicializacija sekvencerja Ion S5

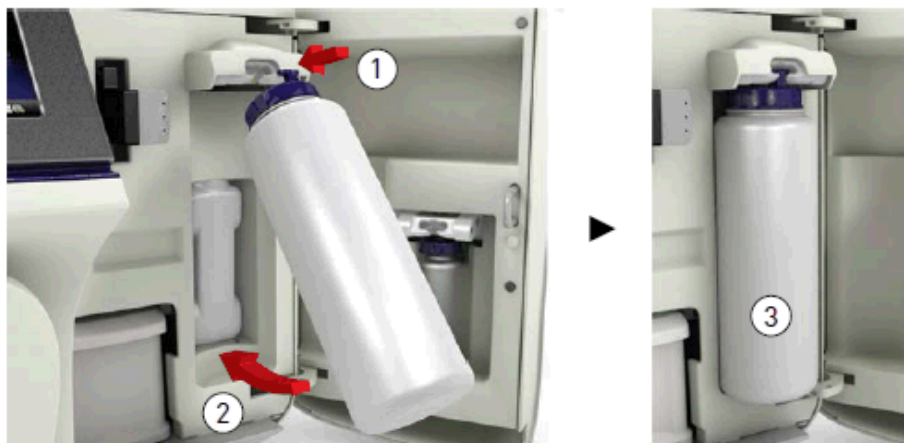
1. V glavnem meniju zaslona na dotik instrumenta izberite »Initialize« (glejte sliko 17). Vrata, čip in sponke za vložek z reagentom se odklenejo.



Slika 17. Domači zaslon za inicializacijo Ion S5 in Ion GeneStudio S5

2. Na poziv odstranite steklenico raztopine za pranje Ion S5 [ExT] za dostop do zbiralnika za odpadke, nato odstranite in izpraznite rezervoar za odpadke.
3. Ponovno namestite prazen rezervoar za odpadke.

4. **Zamenjajte** porabljen vložek Ion S5 [EXT] Sequencing Reagents z novim vložkom, uravnoteženim na sobno temperaturo.
5. Vložek **odtajajte** vsaj 1 uro pred inicializacijo, da so nukleotidi povsem odtajani.
6. **Odstranite** rdeči pokrovček z nove steklenice z raztopino za pranje Ion S5 [Ext] Wash Solution.
7. **Namestite** novo steklenico z raztopino za pranje Ion S5 [Ext] Wash Solution, kot prikazuje slika 18.



Slika 18. Namestite novo steklenico za pranje Ion S5 ExT Wash Solution Bottle

8. **Prepričajte se**, da je uporabljeni čip za sekvenciranje iz prejšnjega postopka pravilno nameščen v sponko za čipe in da je objemka za čipe potisnjena do konca.
9. **Po potrebi namestite** novo steklenico S5 [ExT] Cleaning Solution.
 - a) Steklenico Ion S5 ExT Wash Solution vzemite iz škatle (sistem Ion Chef).
 - b) Steklenico 5-krat obrnite.
 - c) Zavrtite pod kotom, da se dobro premešate.



Opomba: Steklenica Ion S5 [ExT] Cleaning Solution vsebuje dovolj reagenta za dokončanje štirih čiščenj.

10. Vrata **zaprite**.
11. **Izberite** »Next«. Instrument potrjuje, da sta potrošni material in čip pravilno nameščena in da steklenica čistilne raztopine Ion S5 [ExT] Cleaning Solution vsebuje dovolj reagenta za čiščenje po teku.
12. **Sledite** vsa priporočila na zaslonu, da zagotovite pravilno namestitev potrebnega potrošnega materiala.



Opomba: Če je bilo izpolnjeno dovoljeno število čiščenj po teku, bo instrument uporabnika pozval, naj zamenja steklenico čistilne raztopine Ion S5 [ExT] Cleaning Solution.

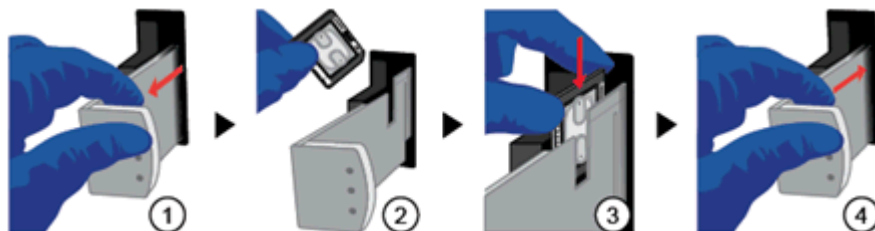
13. **Po koncu inicializacije (približno 40 minut) izberite** »Next«, da se vrnete v glavni meni. Instrument je zdaj pripravljen na tek sekvenciranja.

2. del: Začetek teka sekvenciranja



Opomba: Izraz S5 Sequencer se uporablja generično za splošne linije S5 Sequencer, vključno z Ion S5, Ion S5 XL, Ion GeneStudio in Ion GeneStudio Plus.

1. V glavnem meniju zaslona na dotik instrumenta pritisnite »Run«. Vrata in objemka za odrezke se odklenejo.
2. **Odstranite** uporabljeni čip za sekvenciranje in nato pritrdite čip, naložen s Chef, s predlogo ISP-jev v sponko za čip z zarezo za čip obrnjeno navzdol, kot je prikazano na sliki 19.



Slika 19. Postavitev čipa v sponko za čip.

3. Sponko za čip **potisnite** ven.
4. **Odstranite** čip, ki je v sponki.
5. Naloženi čip **postavite** v sponko za čip z zarezo za čip v spodnjem sprednjem kotu.
POMEMBNO: Ne silite čipa v sponko. Če se čip ne prilega zlahka v sponko, preverite, ali je zareza usmerjena, kot je prikazano na sliki.
6. **Vtisnite** kovinski jeziček, da se sponka do konca vpne.
7. **Zaprte** vrata instrumenta.
8. **Pritisnite** »Next«.
9. **Potisnite** sponko čipa do konca not, da se vpne.
10. **Zaprte** vrata instrumenta.
11. **Pritisnite** »Next«.
12. Na spustnem seznamu **izberite** načrtovani tek, ki je bil ustvarjen v programski opremi Torrent Suite™.
13. **Pritisnite** »Next«.



Opomba: Izberete lahko tudi »Planned Run (none)«, po katerem je treba na naslednjem zaslonu vnesti informacije o teku.



Koristni namig: Priporočljivo je, da izberete vnaprej določen načrtovani tek.

14. **Potrdite**, da so predhodno izpolnjene nastavitve pravilne.
15. **Po potrebi izvedite** spremembe s pomočjo gumbov in spustnih seznamov.
16. **Potrdite**, da so vrata instrumenta zaprta.
17. **Pritisnite** »Next«.

- 18. Če je možnost na voljo, pritisnite »Calibrate«, da začnete tek sekvenciranja. Če ne, se tek sekvenciranja začne samodejno.**



POZOR: Med tekom ne odpirajte vrat instrumenta. Izogibajte se dotikanju instrumenta. Če se dotaknete instrumenta med sekvenciranjem, lahko zmanjšate kakovost meritev.

Ko je tek sekvenciranja končan, instrument samodejno izvede postopek čiščenja. Po čiščenju se zaslon na dotik vrne v glavni meni.

- 19. Uporabite brskalnik Torrent Browser, da si ogledate rezultate.**

REZULTATI

Pridobivanje podatkov

Po končanem sekvenciranju sistemska programska oprema sekvencer demultipleksira vse odčitke sekvenciranja z uporabo črtnih kod in ustvari datoteko na vzorec. Če želite prenesti podatke sekvenciranja v privzeti ali določeni obliki, kot je datoteka FASTQ ali BAM za vsak vzorec, glejte uporabniški priročnik sistemske programske opreme sekvencerja. Programska oprema za analizo TypeStream™ Visual NGS uvozi datoteko FASTQ ali BAM iz sekvencerja za analizo.

ID vzorca se lahko vstavi v podatkovno datoteko iz programske opreme sekvencer ali pa se doda ob pridobivanju podatkov prek programske opreme za analizo TypeStream Visual NGS.

Izračun podatkov

Za podrobnosti si preberite uporabniški priročnik za programsko opremo za analizo TypeStream Visual NGS. Programska oprema za analizo TypeStream Visual NGS zagotavlja vse potrebne meritve kakovosti, globino pokritosti, oceno kakovosti za osnovne odčitke, poravnavo branja in navedbo variant, laboratorij pa mora določiti sprejemljive vrednosti za vsako metriko kakovosti, da zagotovi natančen rezultat.

Analiza podatkov

Programska oprema za analizo TypeStream Visual NGS razvrsti uvoženo sekvenco z uporabo referenčnih sekvenc, specifičnih za lokus, iz baze podatkov IPD-IMGT/HLA, ki zagotavlja specifično bazo podatkov za sekvence človeškega glavnega kompleksa histokompatibilnosti, identificira referenčne alele, ki se najbolje ujemajo z odčitki vzorca, kakovostno obrezovanje, preslikavo in sestavi sosednje sekvence iz preslikanih odčitkov in dodeli alele na lokus na podlagi sestavljenih konsenznih sosednjih sekvencah. Uporaba druge programske opreme za analizo lahko povzroči napačno tipizacijo in ni podprta.

OMEJITVE POSTOPKA

- A. Klinične laboratorije urejajo smernice ASHI, CLIA in EFI, ki pooblaščajo laboratorije, da sprejemajo klinične odločitve na podlagi več virov. Da se ugotovi primernost darovalca, je potrebne pri presaditvi trdnih organov potrditveno testiranje, pridobljeno iz več virov. Odločitev o presaditvi ne bo sprejeta samo na podlagi pozitivnih ali negativnih rezultatov zadevnega testa.
- B. Neoptimalna kakovost in/ali količina vzorca ali knjižnice lahko povzroči napake pri testiranju. Vzroki za neuspeh lahko vključujejo majhno količino in slabo kakovost vzorca, kontaminacijo, prisotnost zaviralcev, naključne okvare encimskih reakcij, neumerjene in nepravilno delujoče instrumente, uporabo reagentov s potekom roka trajanja ali reagentov tretjih oseb, nepravilno vzdrževanje reagenta, spremembo protokola in napačno kvantificiranje oz. izračun.
- C. Vzorec DNK je treba kvantificirati s fluorometrom in ne sme vsebovati nobenega znanega zaviralca PCR. Zaviralce PCR lahko uvedemo iz izvirnega vira vzorca ali z različnimi metodami ekstrakcije DNK. Rutinske vzorce je treba validirati za amplifikacijo z uporabo reagentov kompleta AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit.
- D. Potek dela za pripravo PCR in knjižnice, opisan v tem protokolu, zahteva zelo nadzorovane pogoje. Upoštevajte standardne smernice za PCR, navedene v zgornjem razdelku, [SPLOŠNA PRIPRAVA na ANALIZE](#), da zmanjšate kontaminacije.
- E. Naprava AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit - 48 je bila testirana za uporabo z vsemi termičnimi cikličnimi napravami s 96-vdolbinicami Applied Biosystems Veriti (kat. št. 4375786), modelom s hitrostjo emulacije 9600 ali +0,8 °C/s ogrevanja in -1,6 °C/s hlajenja ter s pokrovom, ogrevanim na 105 °C ali enakovredno, za vse programe. Druge termične ciklične naprave, ki se štejejo za uporabo, mora oceniti in validirati končni uporabnik.
- F. Komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit - 48 (kat. št. ALL-FAST11L) je bil testiran s sistemom Ion GeneStudio S5 Plus ali enakovrednim in Ion Chef instrumentom z uporabo Ion 520 Chip (8 do 24 vzorcev) in Ion 530 Chip (8 do 48 vzorcev) in reagentoma za sekvenciranje Ion 520 in Ion 530 ExT Kit-Chef. Ta aplikacija ne podpira alternativnih konfiguracij, kompletov in sistemov sekvenciranja in jih mora določiti in validirati uporabnik.
- G. Najmanjša velikost vzorca na analizo je osem.
- H. Komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit - 48 (kat. št. ALL-FAST11L) ni bil testiran z nobenim protokolom, ki odstopa od zgoraj opisanega in lahko vodi do napačnih rezultatov.
- I. Tipizacija HLA pri visoki ločljivosti z uporabo tehnologije NGS je zapleten proces, ki zahteva usposobljeno osebje za pregled podatkov in končnih dodelitev alelov HLA.
- J. Ta test se ne sme uporabljati kot edina podlaga za klinično odločitev.
- K. Glejte Omejitve ločljivosti – seznam nejasnosti za komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit - 48 za znan seznam nejasnosti pri dodelitvi alelov, specifičnih za serijo, za polimorfizme, ki se nahajajo zunaj ojačenega območja. Vsak naveden alel lahko povzroči napačne rezultate in ga je treba oceniti, preden dodelite rezultat.
 - Komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit - 48 je bil zasnovan za zaznavanje DRB4*03:01N in DQB1*03:276N z uporabo TypeStream Visual 2.1 ali novejšega
- L. Nejasnosti genotipa so pričakovane zaradi omejitve pri zasnovi primerja in heterozigotnega genotipa po fazah zaradi omejitev pri sekvenciranju dolžine branja in s tem povezane poravnave sekvenc.
- M. Primerji AllType FASTplex 11 Loci za HLA-DRB1, -DQB1 in -DPB1 ne ojačajo eksona 1. Povezane dvoumnosti so navedene na Seznamu dvoumnosti. Za razrešitev nejasnosti eksona 1 za te gene je treba uporabiti mešanico primerja AllType FASTplex Exon 1. Pri uporabi mešanice AllType FASTplex 11 Loci Exon 1 Primer Mix z nizko kakovostjo ali zelo razdrobljeno DNK lahko uporabniki doživijo nizko enotnost med odčitki sekvenc.
- N. V redkih primerih lahko neznane različice sekvenc na veznih mestih amplifikacijskega primera v neprevedenih regijah (UTR) vplivajo na učinkovitost amplifikacije zgoraj naštetih reagentov za molekularno tipizacijo. Pred dodelitvijo rezultata je treba homozigotno tipizacijo potrditi s sekundarno metodo.
- O. Primerji AllType FASTplex so bile testirane z uporabo alelov, identificiranih na seznamu nomenklature v oklepajih v indeksu 4 za AllType (npr. A*01:01^{I234I}). Reaktivnost alelov, ki niso bili na voljo, je bila predvidena iz njihove razpoložljive sekvence in lahko povzroči napačne reakcije, zato jo je treba oceniti pred dodelitvijo rezultata.

- P. Vsi primerji AllType FASTplex so bile testirane samo na podlagi Field-3 (6-mestni tipi HLA). Zunaj tega področja ni nobenega zatrdjanega delovanja.
- Q. Analiza programske opreme za ta komplet je podprta samo s programsko opremo HLA TypeStream Visual NGS za analizo 2,0.1 ali novejšim z uporabo kataloške datoteke AllType FASTplex. Uporaba druge programske opreme ni podprta.
- R. Za omejitve, specifične za serijo, si oglejte datoteko kataloga TSV.
- S. Če ne boste v celoti prebrali in izrecno upoštevali vseh navodil, ki jih vsebuje, lahko povzroči neveljavne rezultate testov, škodo na izdelku(-ih), poškodbe oseb, vključno z uporabniki ali drugimi, in škodo na drugi lastnini. One Lambda, Inc. ne prevzema nikakršne odgovornosti, ki bi izhajala iz nepravilne uporabe tukaj opisanih izdelkov (vključno z njihovimi deli ali programsko opremo).

PRIČAKOVANE VREDNOSTI

Amplifikacija vzorca

Pričakuje se, da bo komplet AllType NGS 11 Loci Amplification Kit - 48 amplificiral in proizvedel produkte amplifikacije, specifične za lokus HLA, sestavljene iz približno 5000 baznih parov povprečne dolžine (spremembe na serijo). Zelo priporočljivo je fizično ločevanje in spremljanje kontaminacije v laboratoriju in opremi za predamplifikacijo. Amplikoni eksona 1 bodo v razponu od 1,6-2,2 kb. Neravnovesje eksona in višje odčitke eksona 1 se lahko pojavijo pri testiranju z mešanico primerja eksona 1. To ne vpliva na rezultate tipiziranja ali izstopajoče vrednosti.

Priprava knjižnice

Navodila v teh navodilih za uporabo so bila potrjena za izdelavo končne knjižnice s črtno kodo, ki je združljiva se sekvenco z uporabo amplificirane DNK iz kompleta AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit – 48 za končno koncentracijo 0,045 ng/μl za sekvenciranje ionskih torentov Ion Torrent z uporabo Ion 520 ali 530 Chip na instrumentih serije Ion S5 ali Ion GeneStudio S5. Pričakovana končna koncentracija knjižnice je 1 ng/μl ali več, kot je izmerjena v [AMPLIFIKACIJI KNJIŽNICE, 3. del, 19. korak](#). Nižja koncentracija knjižnice lahko pomeni nepravilno ali dvomljivo tipizacijo zaradi nižjih odčitkov. Specifikacije vhodnega vzorca in postopki, opisani v teh navodilih za uporabo, so bili potrjeni za izdelavo knjižnice, ki ustreza velikosti fragmenta tarča od 250 bp do 2500 bp z načinom od 500 do 850 bp.

Sekvenciranje DNK

Komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci – 48 je bil validiran z uporabo 48 vzorcev na sekvenco, da se zagotovi minimalna povprečna globina branja 50 odčitkov ali več na alel z uporabo čipa Ion 520 ali 530 Chip. Ta aplikacija ne podpira alternativnih prepustnosti vzorcev na zagon in jih mora določiti in potrditi uporabnik. Zaradi vpletene kemije črtnega kodiranja so odčitki, ustvarjeni iz testa AllType FASTplex NGS, obrezani za 30 baz s konca 3' v Torrent Suite z uporabo datotek predloge FASTplex Ion ExT (glejte [PRIPRAVA na ION GENESTUDIO S5 PLUS ali ENAKOVREDNI SEKVENCER in SISTEM ION CHEF, 1. del: Nalaganje predloge FASTplex](#)). Ta postopek izboljša kakovost odčitkov, da se zagotovi zanesljivo tipkanje HLA in ne vpliva na ločljivost ali kakovost rezultatov tipiziranja HLA. Odprava obdelave odčitkov z uporabo napačne predloge analize lahko povzroči napačne dodelitve alelov.

Naslednje meritve sekvenciranja v poročilu Torrent Suite Run Summary so bile validirane za zagotavljanje zanesljivih rezultatov tipiziranja HLA za tek z 48 vzorci. Skupno število odčitkov je število odčitkov, ki ustreza filtrom QC sekvencerja in je dobra metrika za oceno, ali je tek ustvaril dovolj odčitkov. Povprečna dolžina odčitka označuje, ali odčitki sekvence branja ustrezajo minimalni dolžini, ki je potrebna za fazno sekvenco za tipizacijo visoke ločljivosti. Odčitek % CV črtne kode pomeni, da vsebuje knjižnica enako število odčitkov za vsak vzorec. Visok %CV z vzorci z bistveno nižjimi odčitki kaže na slab vnos vzorca ali normalizacijo, ki lahko vodi do težav, značilnih za vzorec. Odstopanje posamezne metrike ne pomeni nujno napake sekvenciranja. Kombinacija nizkega skupnega odčitka in visokega %CV stanja branja črtne kode zaradi manjšega odčitka več vzorcev ali manjše dolžine odčitka lahko vodi do dvomne ali nepravilne tipizacije zaradi nezadostnega odčitka.

Metrika QC za sekvenciranje:

- Skupni odčitki: ≥ 13 milijonov
- Povprečna dolžina odčitka: > 200 bp
- % CV ravnotežje odčitkov črtne kode: ≤ 30 % brez prenizkih odčitkov vzorca(ev)

SPECIFIČNE ZNAČILNOSTI DELOVANJA

Značilnosti delovanja kompleta AllType FASTplex NGS 11 Loci - 48 so bile proučene v internem preverjanju in validaciji, kot je opisano spodaj.

Notranje preverjanje in validacija sta testirala delovanje kompleta AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit - 48 s šestimi kategorijami testov, vključno z natančnostjo, obnovljivostjo, pripravo vzorca, ponovljivostjo, interferenčno snovjo in mejo zaznavanja. Rezultati teh testov so pokazali, da komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit, kadar se uporablja v skladu s temi navodili za uporabo, daje natančne rezultate HLA tipkanja z visoko ločljivostjo, ki so obnovljivi in ponovljivi med operaterji in med tremi ločeno proizvedenimi serijami. Robustnost izdelka je bila dokazana tudi v testih priprave vzorca, meje detekcije in motečih substanc, ki so pokazali, da na delovanje izdelka niso vplivale spremembe v dveh bioloških virih DNK, tri različne metode ekstrakcije DNK, prisotnost šestih pogosto najdenih serumskih faktorjev, znani zaviralec PCR, in zmanjšanje koncentracije vnosa genomske DNK na 12 % zahtevane koncentracije.

Na splošno je v vseh testih komplet AllType FASTplex NGS 11 Loci Kit dosegel nad 99,0 % odstotne skladnosti z uporabo metode LB Clopper-Pearson. Podrobnosti testa za reprezentativno kategorijo testov so predstavljene v spodnji preglednici.

Test Podrobnost – natančnost za komplete čipov 530 in 520 Chip Kits

Skupno število testiranih vzorcev	Število analize	Število uporabnikov	Število Navedb brez alela	Število Neskladnih navedb alela	Skupno število navedb alela	% ujemanja	% ujemanja LB Clopper-Pearson
262	7	2	0	4	4.704	99,9 %	99,8 %

Podrobnosti testa – natančnost

Kategorija testa	Število vzorcev na analizo	Število analize	Število uporabnikov	Število Navedb brez alela	Število Neskladnih navedb alela	Skupno število navedb alela	% ujemanja
Obnovljivost	48	15	3	0	22	12.900	99,8 %
Ponovljivost	24	3	1	0	0	1.296	100 %

INFORMACIJE ZA STIK

Proizvajalec



One Lambda, Inc.
22801 Roscoe Blvd, West Hills, CA 91304, ZDA
T: 747.494.1000 | F: 747.494.1001

Tehnična pomoč

Za tehnična vprašanja ali podporo strankam nas kontaktirajte na:

Tehnična podpora One Lambda

Severna Amerika: +1 747-494-1000 možnost št. 2 (PST)
Brezplačna številka Severna Amerika: +1 800-822-8824 možnost št. 2 (PST)
Mednarodno: +49 3302883-426 (CET)
Mednarodna brezplačna številka: 00800 6200 0000 (CET)

Splet: www.onelambda.com E-pošta: 1lambda-TechSupport@thermofisher.com

OBVEŠČANJE O RESNIH ZAPLETIH

Če uporabnik opazi resen zaplet, ki se je zgodil v zvezi s tem medicinskim pripomočkom in vitro, mora uporabnik o resnem zapletu obvestiti proizvajalca, katero koli lokalno regulativno agencijo in pristojni organ države članice, v kateri ima uporabnik sedež.

PRILOGE

Priloga 1: Referenčni vodnik programa PCR

Spodaj je seznam programov PCR, ki se uporabljajo za teste:

A. Program HLA 11-Loci Amplification:

Temperatura	Čas	Cikel
94 °C	2 min	1
98 °C	10 sek	22
69 °C	3 min	
98 °C	10 sek	8
60 °C	3 min	
4 °C	ZADRŽI	1

Hitrost emulacije 9600 in ogrevan pokrov

B. Program TAG:55 °C za 15 min., 25 °C zadrži, z ogrevanim pokrovom

C. Program STOP:68 °C za 10 min., 25 °C zadrži, z ogrevanim pokrovom

D. Program FASTplex Ion Library Amplification:

Temperatura	Čas	Cikel
72 °C	10 min	1
98 °C	3 min	1
98 °C	15 sek	9
66 °C	30 sek	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	1
4 °C	ZADRŽI	1

Hitrost emulacije 9600 in ogrevan pokrov

Priloga 2: Delovni seznam FASTplex Sample Plate 48

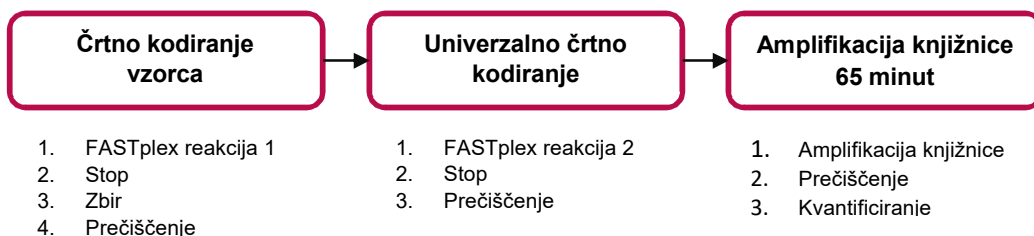
H	G	F	E	D	C	B	A	
								1
								2
								3
								4
								5
								6
								7
								8
								9
								10
								11
								12

Slika 20. Plošča FASTplex Sample Plate 48, ki vsebuje dovolj reagenta za črtno kodiranje vzorcev (SB) za pripravo knjižnice z 48 vzorci dvakrat ali do dvanajstih knjižnic z 8 vzorci.

Priloga 3: Hitri vodnik (Za več podrobnosti glejte Navodila za uporabo.)

Hitra navodila za analizo Ion – AllType FASTplex NGS

- Po amplificiranju vzorca DNK prečistite z magnetnimi kroglicami in izmerite koncentracijo s standardnim protokolom Qubit.
- Vrednosti Qubit vnesite v kalkulator TSV NGS. Razredčite amplikone s pufrom FASTplex DNA Suspension Buffer iz kompleta, kot je navedeno.
- Razredčeni amplikoni so pripravljeni za pripravo knjižnice.



Opomba: Pred začetkom odmrznite reagente in jih hranite na ledu. Paramagnetne kroglice FASTplex Paramagnetic Beads postavite na sobno temperaturo vsaj 30 minut. Prepričajte se, da pufr NE vsebuje kristalov.

POMEMBNO: Uporabite samo pufer FASTplex DNA Suspension Buffer.

Koraki črtnega kodiranja vzorca:

- Centrifugirajte ploščo z vzorci FASTplex in prenesite **16 µl** reagenta za črtno kodiranje na svežo ploščo.
- Dodajte **8 µl** razredčenega amplikona in mešanico pipetirajte 10-krat.
- Dodajte **12 µl** pufru FASTplex Barcoding Buffer in mešanico 10-krat pipetirajte.
- Zatesnite ploščo in impulzno centrifugirajte. Izvedite program FASTplex **TAG**.
- Dodajte **18 µl** raztopine FASTplex Stop Solution in mešanico 5-krat pipetirajte.
- Zatesnite ploščo in impulzno centrifugirajte. Izvedite **program STOP FASTplex**.
- Združite **18 µl** iz vsake vdolbinice reakcije črtno kodiranega vzorca.
- Dokončajte prečiščenje vzorca črtne kode Sample Barcode (SB) po kalkulatorju TSV NGS.
- Eluirajte v volumnu pufru suspenzije DNK **v skladu** s kalkulatorjem TSV NGS.
- Prenesite **48 µl** prečiščenega zbira SB v 0,2-ml epruveto PCR.

Korak Universal Barcoding (UB) (glejte kalkulator TSV NGS za ustrezne volumne vsakega reagenta):

- Dodajte reagent FASTplex Univ Barcode P1 v **48 µl** prečiščenega zbira SB.
- Dodajte pufer FASTplex Barcoding Buffer, mešanico pipetirajte in impulzno centrifugirajte. Izvedite program FASTplex **TAG**.
- Dodajte raztopino FASTplex Stop Solution, mešanico pipetirajte in pulzno centrifugirajte. Izvedite **program STOP FASTplex**.
- Impulzno centrifugirajte in končajte prečiščenje UB tako, da dodate 1 ekvivalent volumna paramagnetnih kroglic FASTplex Paramagnetic Beads.
- Eluirajte v **13 µl** pufru FASTplex DNA Suspension Buffer.
- Prenesite **10 µl** prečiščenega zbira UB v 0,2-ml epruveto PCR.

Koraki amplifikacije knjižnice:

- Dodajte **15 µl** mešanice FASTplex Library Primer Mix v **10 µl** prečiščenega zbira UB.
- Dodajte **75 µl** mešanice FASTplex knjižnica Amp Mix in pipetirajte, da zmešate.
- Izvedite program FASTplex Ion Library Amplification.
- Razredčite knjižnico – **95 µl** knjižnice v **305 µl** pufru FASTplex DNA Suspension Buffer
- Dokončajte prečiščenje knjižnice z dvojno izbiro velikosti, 0,6-kratnim volumnom in 0,113-kratnim prostorninskim ekvivalentom paramagnetnih kroglic FASTplex Paramagnetic Beads.
- Eluirajte v **35 µl** pufru FASTplex DNA Suspension Buffer in prenesite **33 µl** končne knjižnice v 2-ml epruveto LoBind.
- Razredčite končno knjižnico za nalaganje v Ion Chef pri 0,045 ng/µl.

LITERATURA

1. Jonathan C. Barone, Katsuyuki Saito, Karl Beutner, Maria Campo, Wei Dong, Chirayu P. Goswami, Erica S. Johnson, Zi-Xuan Wang, Susan Hsu, »HLA-genotyping of clinical specimens using Ion Torrent-based NGS,« *Tissue Antigens* (2015) 76:903-909
2. Takashi Shiina, Kazuyoshi Hosomichi, Hidetoshi Inoko and Jerzy K Kulski: »The HLA genomic loci map: expression, interaction,diversity and disease,« *Journal of Human Genetics* (2009) 54:15-39
3. SGE Marsh, ED Albert, WF Bodmer, RE Bontrop, B Dupont, HA Erlich, M Fernández-Vina, DE Geraghty, R Holdsworth, CK Hurley, M Lau, KW Lee, B Mach, WR Mayr, M Maiers, CR Müller, P Parham, EW Petersdorf, T Sasazuki, JL Strominger, A Svejgaard, PI Terasaki, JM Tiercy, J Trowsdale: »Nomenclature for factors of the HLA system,« 2010. *Tissue Antigens* (2010) 75:291-455
4. *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics Laboratory Manual*, 4th Edition Volume 1, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (2000)
5. *EFI Standards for Histocompatibility & Immunogenetics Testing*, različica 7.0The European Federation for Immunogenetics, Strasbourg, France (2017)

BLAGOVNE ZNAMKE

Vse druge blagovne znamke so last družbe Thermo Fisher Scientific in njenih podružnic, razen če je navedeno drugače.

»Eppendorf« in »LoBind« sta blagovni znamki družbe Eppendorf AG.

OMEJITEV ODGOVORNOSTI

Vsi izdelki za programsko opremo One Lambda so zasnovani tako, da pomagajo osebjem, ki ima izkušnje z analizo HLA tako, da predlagajo tipizacijo rezultatov ali dodelitev protiteles. Vse rezultate testov mora skrbno pregledati usposobljeno osebje, da se zagotovi pravilnost.

Specifikacije, pogoji in cene se lahko spremenijo. Vsi izdelki niso na voljo v vseh državah. Za podrobnosti se posvetujte z lokalnim prodajnim zastopnikom.














EVROPSKI POOBLAŠČENI PREDSTAVNIK



MDSS GmbH, Schiffgraben 41, 30175, Hannover, Nemčija

RAZLAGA SIMBOLOV




Referenčna EN ISO 15223-1: Medicinski pripomočki – simboli, ki se uporabljajo z nalepkami medicinskih pripomočkov, oznakami in informacijami, ki jih je treba dobaviti.

Simbol	Opis	Simbol	Opis
 ISO 7000 reg. št. 1641	Preberite si navodila za uporabo. Sklic na elektronska navodila za uporabo (eIFU) je lahko URL spletne strani proizvajalca ali kakšen drug ustrezen sklic, da so navodila za uporabo na voljo v elektronski obliki.	 ISO 7000 reg. št. 0518	Vsebuje dovolj vsebine za <n> testov
 ISO 7000 reg. št. 2493	Kataloška številka	 ISO 7000 reg. št. 3082	Proizvajalec
 ISO 7000 reg. št. 0434A	Diagnostični medicinski pripomoček in vitro	 ISO 7000 reg. št. 2497	Pooblaščen predstavnik v Evropski skupnosti
 ISO 7000 reg. št. 0632	Pozor	 ISO 7000 reg. št. 2607	Datum proizvodnje
 ISO 7000 reg. št. 0633	Temperaturne omejitve	 ISO 7000 reg. št. 2492	Rok uporabnosti
 ISO 7000 reg. št. 2492	Zgornja temperaturna omejitev		Koda serije
Drugi simboli			
	Dražeča snov (koža, oči)		Kancerogen

Polje serije na etiketi je za sledljivost proizvodnega dogodka.

Za Povzetek varnosti in učinkovitosti se obrnite na službo za stranke TDX.

RAZLAGA KORISTNIH SIMBOLOV

Ikona	Opis
	Varna točka ustavitve
	Opomba
	Koristni namig

ZGODOVINA SPREMEMB

Revizija	Datum izdaje	Opis revizije
01	12. apr. 2022	Začetna izdaja
02	Trenutno	<p>Pojasnilo o korakih je:</p> <ul style="list-style-type: none">• Na strani 41 dodano besedilo »Vložek z reagenti Ion S5™ ExT Chef Reagents Cartridge odstranite iz škatle 45 minut pred uporabo, nato pa pustite, da se segreje na sobno temperaturo.«• V točki 9 na strani 43 dodan stavek »Vložek z raztopinami Ion S5 Ext Chef Solutions Cartridge namestite v položaj E, zatem ko ste odprli štiri epruvete na vložku.« Odstranjen isti stavek iz točke 10.• V točki 11 na str. 43 dodan stavek »naložite tehniko čipov v prazen položaj centrifuge za nalaganje čipov Ion Chef«

CE 0197



© 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. Vse pravice pridržane. Vse druge blagovne znamke so last družbe Thermo Fisher Scientific in njenih podružnic, razen če je navedeno drugače. Specifikacije, pogoji in cene se lahko spremenijo. Vsi izdelki niso na voljo v vseh državah. Za podrobnosti se posvetujte s svojim lokalnim prodajnim zastopnikom.