

Инструкции за употреба (СЕ)

Комплект AllType™ FASTplex™ NGS 11
Loci Flex – 96



Продукт: Комплект AllType™ FASTplex™ NGS 11 Loci Flex – 96

REF Каталоген идентификационен №: ALL-FAST11LF

IVD Медицинско изделие за in vitro диагностика

За разпространение само в Европейския съюз
Не е предназначено за продажба в САЩ и Канада

 **ONE LAMBDA**
A Thermo Fisher Scientific Brand

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Съдържание

ВЪВЕДЕНИЕ	4	ОБЩА ПОДГОТОВКА ЗА АНАЛИЗИТЕ	14
ОПИСАНИЕ НА ПРОДУКТА	4	АМПЛИФИКАЦИЯ	18
Официално име на продукта	4	Материали и оборудване	18
Информация за каталог	4	Част 1: Амплифициране на проба	18
Предназначение	4	Част 2: Пречистване на ампликон	20
Предназначение	4	Част 3: Количествено определяне на ампликон	21
Описание на продукта	5	Част 4: Разреждане на ампликон	22
Принципи на метода	5	МАРКИРАНЕ НА ПРОБИ С БАРКОД	24
ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ	6	Материали и оборудване	24
ПРЕДОСТАВЕНИ МАТЕРИАЛИ	7	Част 1: Реакционна смес за маркиране на проби с баркод (SB), спиране на реакция, обединяване на проби и пречистване	24
Съдържание на опаковката и съхранение	7	Част 2: Реакционна смес за универсално маркиране с баркод (UB), спиране на реакция и пречистване	28
ВНИМАНИЕ:	7	АМПЛИФИКАЦИЯ НА БИБЛИОТЕКА	31
Предоставени компоненти в комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex	7	Материали и оборудване	31
Индикации за нестабилност	7	Част 1: Реакционна смес за амплификация на библиотека	31
МАТЕРИАЛИ – НЕОБХОДИМИ, НО НЕПРЕДОСТАВЕНИ	8	Част 2: Пречистване на амплифицирана библиотека	32
Допълнителни материали и консумативи	8	Част 3: Количествено определяне на финалната библиотека	33
ОБОРУДВАНЕ – НЕОБХОДИМО, НО НЕПРЕДОСТАВЕНО	9	ПОДГОТОВКА ЗА СЕКВЕНИРАНЕ НА ПЛАТФОРМА ILLUMINA	36
Оборудване	9	Материали и оборудване	36
ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ	10	Част 1: Подготовка на PhiX Control	36
ВАЖНИ УКАЗАНИЯ	10	Част 2: Секвениране MiSeq – Подготовка на листа за проби	36
Обичайна лабораторна практика	10	Част 3: Секвениране MiSeq – Подготовка на обединена библиотека	37
Техника и оборудване	10	Част 4: Секвениране MiniSeq – Подготовка на листа за проби	38
Реактиви	10	Част 5: Секвениране MiniSeq – Подготовка на обединена библиотека	38
Точка на безопасно спиране	11		
ВЗЕМАНЕ И ПОДГОТОВКА НА ПРОБИ	12		
Вид проба	12		
Съхранение на проби	12		
Методи за екстракция на ДНК	12		
Съхраняване на ДНК	12		
РАБОТЕН ПРОЦЕС ЗА АНАЛИЗИТЕ	13		

Част 6: Секвениране iSeq 100 – подготовка на листа за проби	40	ИЗВЕСТИЯ ЗА СЕРИОЗЕН ИНЦИДЕНТ	47
Част 7: Секвениране iSeq 100 – подготовка на обединена библиотека	40	ПРИЛОЖЕНИЯ	48
РЕЗУЛТАТИ	42	Приложение 1: Референтни насоки за PCR програма	48
Получаване на данни	42	Приложение 2: Работен лист за FASTplex Sample Flex Plate 96	49
Изчисляване на данни	42	Приложение 3: Бърза справка (Вижте инструкциите за употреба за повече подробности.)	50
Анализ на данни	42	БИБЛИОГРАФИЯ	52
ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОЦЕДУРАТА	43	ТЪРГОВСКИ МАРКИ	53
ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ	45	ОТКАЗ ОТ ОТГОВОРНОСТ	53
Амплифициране на проба	45	УПЪЛНОМОЩЕН ПРЕДСТАВИТЕЛ ЗА ЕВРОПА	53
Подготовка на библиотеки	45	ОПИСАНИЕ НА СИМВОЛИТЕ	54
Секвениране на ДНК	45	ОПИСАНИЕ НА ПОЛЕЗНИ СИМВОЛИ	55
СПЕЦИФИЧНИ РАБОТНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ	46	ИСТОРИЯ НА РЕВИЗИИТЕ	56
ИНФОРМАЦИЯ ЗА КОНТАКТ	47		
Производител	47		
Техническа помощ	47		

ВЪВЕДЕНИЕ

Тези инструкции за употреба описват начина на подготовка на съвместими библиотеки от ампликони, генерирани от комплект AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex за системи за секвениране Illumina™.

Инструкциите за употреба съдържат стъпки, необходими за генериране на следните PCR ампликони:

Локус	Целеви регион
HLA-A	Пълен ген
HLA-B	Пълен ген
HLA-C	Пълен ген
HLA-DRB1	Екзон 1 & Екзон 2 до 3' UTR *
HLA-DRB3/4/5	Екзон 2 до 3' UTR *
HLA-DQB1	Екзон 1 & Екзон 2 до 3' UTR *
HLA-DPB1	Екзон 1 & Екзон 2 до 3' UTR *
HLA-DQA1	Пълен ген
HLA-DPA1	Пълен ген

* Включва интронна секвенция

След амплифициране останалата част от инструкциите за употреба обхващат стъпки за маркиране с баркод на проба, маркиране с баркод на група от проби и генериране на библиотека.

За да предотвратите нараняване и за оптимална употреба на комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex, прочетете цялата инструкция за употреба.

ОПИСАНИЕ НА ПРОДУКТА

Официално име на продукта

Комплект AllType™ FASTplex™ NGS 11 Loci Flex – 96

Информация за каталог



Каталожен идентификационен №

- ALL-FAST11LF

Предназначение



Продуктите AllType™ FASTplex™ NGS HLA Typing са предназначени за in vitro диагностична употреба и професионална употреба на HLA типизиране за локуси HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 и -DPB1.

Предназначение

Продуктите AllType FASTplex NGS HLA Typing са предназначени за in vitro диагностична употреба и професионална употреба на HLA типизиране за локуси HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 и -DPB1 чрез секвениране от следващо поколение чрез синтез, циклично обратимо терминиране (CRT) за диагностика при трансплантация. Продуктите AllType FASTplex NGS HLA Typing са качествени тестове за амплификация и подготовка на библиотеки и секвениране на ДНК, екстрактирани от цяла кръв или натривка от букална лигавица.

Описание на продукта

Продуктите AllType FASTplex NGS HLA Flex Typing включват реактиви за обогатяване на 11-локусните HLA гени за HLA-A, B, C, DRB1, DRB345, DQB1, DPB1, DPA1 и DQA1 чрез метод на мултиплексна полимеразна верижна реакция (PCR), пречистване на продуктите от амплификация и изграждане на библиотеки, съдържащи до 96 проби за секвениране на системите Illumina

Продуктите AllType FASTplex NGS HLA Flex Typing се състоят от предварително оптимизиран разтвор на праймер за амплификация на HLA ген във воден течен формат, 5X реакционен буфер и дезоксирибонуклеотиди (dNTP), предоставени при препоръчителна температура на съхранение при -20°C. Дизайнът на праймер за амплификация се основава на известните ДНК секвенции, съобщавани в публични бази данни за ДНК секвенции, като Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и IMGT (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>).

Продуктите AllType FASTplex NGS HLA Flex Typing осигуряват 96-ямкова плака, съдържаща уникални реактиви за маркиране с баркодове на проби във всяка ямка и един реактив за универсално маркиране с баркодове (вижте „Идентификация на продукта“). Когато се комбинира, потребителят може да подготви библиотека за 8 до 96 проби с уникални i7 баркодове и обща i5 секвенция за последваща амплификация на библиотеката. Праймерният микс за амплификация на библиотеката, включен в комплекта, идентифицира общите секвенции P7 и P5 в краищата на ДНК фрагменти и амплифицира всички библиотечни фрагменти, маркирани правилно с баркод. В комплекта са включени също и допълнителни реактиви, необходими по време на подготовката на библиотеката, включително буфер за маркиране с баркод, стоп разтвор и парамагнитни перли.

Пропускателна способност за продуктите AllType FASTplex NGS HLA Flex Typing със секвенатори Illumina

Секвенатор Illumina	Комплект реактиви Illumina	Брой проби Максимална пропускателна способност
MiSeq	Комплект MiSeq Reagent Kit v2 (300 цикъла)	96
	Комплект MiSeq Reagent Micro v2 (300 цикъла)	24
	Комплект MiSeq Reagent Nano v2 (300 цикъла)	8
MiniSeq	Комплект MiniSeq High Output (300 цикъла)	96
	Комплект MiniSeq Mid Output (300 цикъла)	72
iSeq	Реактив iSeq 100 i1 Reagent v2 (300 цикъла)	24

Принципи на метода

Типизирането на гени на човешки левкоцитен антиген (HLA) в главния комплекс за хистосъвместимост (МНС) при хора е основен диагностичен тест за трансплантация на органи и костен мозък, различни асоциации със заболявания и фармакогенетика за скрининг за свръхчувствителност към лекарства [\[1\]](#) [\[2\]](#). Поради голямото разнообразие от полиморфизми и хомоложни секвенции в гените на HLA технологиите за секвениране от следващо поколение (NGS), които позволяват клонално секвениране на пълни или почти пълни гени, се превръщат в необходим метод за осигуряване на резултати от типизиране с най-висока разделителна способност.

Продуктът AllType FASTplex NGS генерира продукти на амплификацията, специфични за мишената, за няколко гени на HLA в единична мултиплексна полимеразна верижна реакция (PCR). Данните от ДНК секвениране за типизиране на HLA се получават чрез обработка на амплифицирания продукт с работен процес на библиотека за фрагментация, за да се подготви библиотека, която може да бъде секвенирана с помощта на платформи за секвениране на Illumina.

Комплектът AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex е проектиран и оптимизиран да произвежда почти еквимоларно количество от всяка мишена, за да осигури адекватно покритие на секвенцията. Получените данни се анализират с помощта на софтуера TypeStream™ Visual NGS Analysis Software за генериране на присвояване на алели на HLA с висока разделителна способност.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: За повече информация вижте информационния лист за безопасност. Отделните информационни листове за безопасност могат да се изтеглят от www.onelambda.com и/или www.thermofisher.com.

ПРЕДОСТАВЕНИ МАТЕРИАЛИ

Съдържание на опаковката и съхранение



Комплектът AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex се състои от две отделни кутии. Комплектът AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex – 96 (Кутия 1 от 2) може да бъде безопасно съхраняван при температура -20°C и комплектът AllType FASTplex NGS (Кутия 2 от 2) може да бъде безопасно съхраняван при температура от +2 до 8°C. Препоръчителните условия на съхранение за FAST-STOP и FAST-BBUF са +20 до 25°C. Продуктът при -20°C може да бъде замразяван/размразяван до 12 пъти.



ВНИМАНИЕ: След получаване пазете всяка кутия непокътната и съхранявайте до готовност за употреба. Избягвайте ненужни манипулации.

Пълен списък на предоставени материали и съответните им условия за съхранение могат да бъдат открити в раздел „[Предоставени компоненти в комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex](#)“. На етикета на продукта са указани и условия за съхранение на отделни компоненти.

Предоставени компоненти в комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex

Кутия 1 от 2

Компонент	Каталожен идентификационен №	Количество	Количество (µl)	Съхранение
AllType FASTplex 11 Loci Primer Flex Mix	ALF-P11F	1 флакон	600	-20°C
AllType FASTplex 11 Loci Exon 1 Primer Flex Mix	ALF-P11FE1	1 флакон	240	
AllType dNTPs	ALL-NTP	1 флакон	200	
AllType Buffer	ALL-BUF	1 флакон	500	
AllType LR Polymerase	ALL-LRPOL	1 флакон	100	
FASTplex Sample Flex Plate 96	FAST-SFP96	1 флакон	6 за ямка	
FASTplex Univ Barcode Flex A	FAST-UBFA	1 флакон	48	
FASTplex Library Primer Flex Mix	FAST-LPFM	1 флакон	100	
FASTplex Library Amp Mix	FAST-LAM	1 флакон	900	

Кутия 2 от 2

Компонент	Каталожен идентификационен №	Количество	Количество (µl)	Съхранение
FASTplex Barcoding Buffer	FAST-BBUF	1 флакон	1500	от +2 до 25°C
FASTplex Stop Solution	FAST-STOP	2 флакона	1200 за флакон	
FASTplex Paramagnetic Beads	FAST-BEAD	1 флакон	7 700	от +2 до 8°C
FASTplex DNA Suspension Buffer	FAST-SUSP	1 флакон	8 000	

Индикации за нестабилност



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ: Не използвайте, ако кутиите са повредени, продуктът не е получен при необходимата температура за съхранение или продуктът е с изтекъл срок на годност. Свържете се с отдела по техническа поддръжка на One Lambda на 1lambda-TechSupport@thermofisher.com.

МАТЕРИАЛИ – НЕОБХОДИМИ, НО НЕПРЕДОСТАВЕНИ

Допълнителни материали и консумативи

Описание	Доставчик	Кат. №
Плаки 96-Well 0,2 ml PCR Plate	MLS*	---
Пластмасови материали/фолио за запечатване на 96-ямкова плака	MLS	---
Плаки Thermo Scientific Nunc™ 96-Well Polypropylene MicroWell™ Plates	Fisher Scientific	12-565-369
Охладител за PCR плаки и 0,2 ml епруветка	MLS	---
Eppendorf DNA LoBind Tubes, 5,0 ml	Eppendorf	0030108310
Eppendorf DNA LoBind Tubes, 2,0 ml	Eppendorf	022431048
PCR епруветка, 0,2 ml	MLS	---
Конични епруветки, несъдържащи нуклеаза, 50 ml	MLS	---
Конични епруветки, несъдържащи нуклеаза, 15 ml	MLS	---
Серологични пипети, 10 или 25 ml	MLS	---
Контролер на пипети	MLS	---
Пълна матрица от ръчни едноканални пипети (20 µl, 200 µl, 1 ml)	MLS	---
Ръчни многоканални пипети 20 µl и 200 µl	MLS	---
Пълна матрица от филтрирани, предварително стерилизирани върхове за пипета	MLS	---
Стерилни резервоари за реактиви	MLS	---
Стрип от епруветки/капачета	MLS	---
Thermal Cycler PCR Pressure Pad	MLS	---
Комплект контроли PhiX	Illumina	FC-110-3001
Комплект MiSeq Reagent Kit v2 (300 цикъла)	Illumina	MS-102-2002
Комплект MiSeq Reagent Nano v2 (300 цикъла)	Illumina	MS-103-1001
Комплект MiSeq Reagent Micro v2 (300 цикъла)	Illumina	MS-103-1002
Реактив iSeq 100 i1 Reagent v2 (300 цикъла)	Illumina	20031371
Комплект MiniSeq High Output (300 цикъла)	Illumina	FC-420-1003
Комплект MiniSeq Mid Output (300 цикъла)	Illumina	FC-420-1004

*MLS: Major Laboratory Supplier

ОБОРУДВАНЕ – НЕОБХОДИМО, НО НЕПРЕДОСТАВЕНО

Оборудване

Описание	Доставчик	Кат. №
Софтуер TypeStream™ Visual NGS Analysis Software (Версия 2.0.1 или по-нова)	One Lambda, Inc.	TSVPGR
Система iSeq™ 100	Illumina, Inc	FS10000717
Система MiniSeq™	Illumina, Inc	MN01037
Система MiSeq™	Illumina, Inc	M01817
Статив с магнитни пръстени (96-ямков)	Thermo Fisher Scientific	AM10027 или AM10050
Магнитен статив за 2,0 ml епруветка	Thermo Fisher Scientific	12321D
Амплификатор Veriti 96-Well Thermal Cycler*	Thermo Fisher Scientific	4375786
Флуорометър Qubit™ или еквивалентен	Thermo Fisher Scientific	Q33216 или Q33226
Комплект за анализ Qubit dsDNA HS	Thermo Fisher Scientific	Q32854
Епруветки за анализ Qubit	Thermo Fisher Scientific	Q32856
Центрофуга за плаки с възможност за 1500 x g	MLS**	---
Мини/микро центрофуга	MLS	---
Вортекс	MLS	---

*Амплификаторът Veriti 96-Well Thermal Cycler може да бъде заменен с амплификатор с възможности за регулиране на температурни настройки, оптимизирани за PCR реакция – 0,8°C в секунда скорост на нагряване и 1,6°C в секунда скорост на охлаждане – и реакционни обеми 100 µl.

**MLS: Major Laboratory Supplier

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ



ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ ЗА БЕЗОПАСНОСТ: Използвайте ръкавици и подходящи ЛПС.

ВНИМАНИЕ: Следвайте техниките за почистване на работния плот, за да намалите риска от замърсяване.

Почистете старателно работния плот с препарат за отстраняване на ДНК (напр. DNA Away™, Termi-DNA-Tor, 10% белина, последвана от 70% алкохол или еквивалентни) за намаляване на риска от замърсяване на пробата.

Когато работите на плота, избърсвайте често ръкавиците със средство за премахване на ДНК, за да намалите риска от кръстосано замърсяване на пробата и реактива. Или сменяйте често ръкавиците.

ВАЖНИ УКАЗАНИЯ

Обичайна лабораторна практика

- Препоръчва се използването на ръчни многоканални пипети. Едноканалните пипети се препоръчват единствено за работни процеси за проби с малки количества.
- Всички инструменти и пипети трябва да бъдат калибрирани и поддържани съгласно указанията на производителя.


Техника и оборудване

- Препоръчва се използването на специално оборудване както преди, така и след PCR.
- За удобство настройте всички програми на амплификатора, преди да започнете.
- Използвайте амплификатора Veriti 96-Well или модел с възможност за скорост от 9600 емуляции или нагряване с +0,8°C/сек. и охлаждане -1,6°C/сек. и нагревателен капак при температура 105°C или еквивалентен за всички програми.
- Ако ще се използва амплификатор, различен от Veriti-96, валидирайте го.
- Ако ще се използва метод за количествено определяне, различен от флуорометър Qubit™, валидирайте метода за количествено определяне.

Реактиви

- Елементите в кутия 1 от 2 на комплекта трябва да се съхраняват върху лед по време на употреба и да се върнат на -20°C веднага след употреба.
- Съхранявайте отделно реактивите за предварителна амплификация (кутия 1 от комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex) и реактивите за последваща амплификация.
- Приготвянето и дозирането на мастър микса трябва да се извършват върху лед и с достатъчно бързи темпове, за да се избегнат нежелани резултати.
- Използвайте FASTplex DNA Suspension Buffer за всички разреждания на гДНК и ампликони и за елуация на библиотеката.
- Не използвайте EDTA съдържащи разтвори (напр. TE буфер или буфер с ниско съдържание на TE) след амплификацията, тъй като може да се инхибират реакциите в този анализ. Вижте по-долу, геномната ДНК може да бъде разреждана в EDTA буфер за суспензия на ниско съдържание на ДНК (0,1 mM или по-малко).

Точка на безопасно спиране

- За оптимални резултати изпълнете всички стъпки по подготовката на библиотеките в един ден.
 - Но, ако е необходимо повече време, вижте  **ТОЧКА НА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ**, за да съхраните междинен материал при температура -20°C.
- Поради неизвестното количество остатъчни ензими и тяхната активност не съхранявайте материалите повече от 72 часа при температура -20°C. По-дългото време за съхранение би изисквало валидиране.

ВЗЕМАНЕ И ПОДГОТОВКА НА ПРОБИ

Вид проба

Проби, включително антикоагулирана периферна кръв, културирани лимфоцити и епителни клетки от букална лигавица, които са валидирани с комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex.

ДНК може да бъде изолирана от проби до 2 седмици след първоначалното вземане на кръв или събиране на епителни клетки от букална лигавица, въпреки че се препоръчва пробите да бъдат обработени в рамките на 2 до 3 дни след вземането им (4, 5). ДНК може да се запази при условията на съхранение и продължителността, валидирани от отделната лаборатория.

Съхранение на проби

Цялата кръв трябва да се събира в антикоагуланти ACD или EDTA и да се съхранява при температура 4°C.

Натривката от букална лигавица трябва да се вземе с тампони, които са валидирани за вземане на епителни клетки, и трябва да се съхранява при стайна температура в запечатан контейнер, за да се избегне прекомерно изсушаване.

Методи за екстракция на ДНК

Следните методи за екстракция са валидирани с комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex:

- Комплект Maxwell 16 Blood DNA Purification (Promega Corporation, Кат. № AS1010)
- Комплект QIAamp DNA Blood Mini (QIAGEN, Кат. №/ИД: 51104)
- Комплект Automated MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra (Thermo Fisher Scientific, Кат. № A25597) със система KingFisher Flex Purification System (Thermo Fisher Scientific, Кат. № 5400630, 5400610).

Други методи за екстракция на ДНК може да се използват, но методите и оборудването трябва да бъдат валидирани от крайния потребител.

Уверете се, че пробите не съдържат инхибитори на ДНК полимераза.

Не ресуспендирайте пробите в разтвори, съдържащи хелиращи агенти, например EDTA, при концентрация над 0,1 mM.

Ресуспендирайте ДНК пробите, които ще се използват за PCR в Low (below 0.1mM) EDTA DNA Suspension buffer, стерилна вода или в 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 при оптимална концентрация 25 ng/μl с флуорометричен метод, такива като Qubit Fluorometer и комплект Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific). Могат да се използват други спецификации, но трябва да бъдат валидирани от лабораторията.

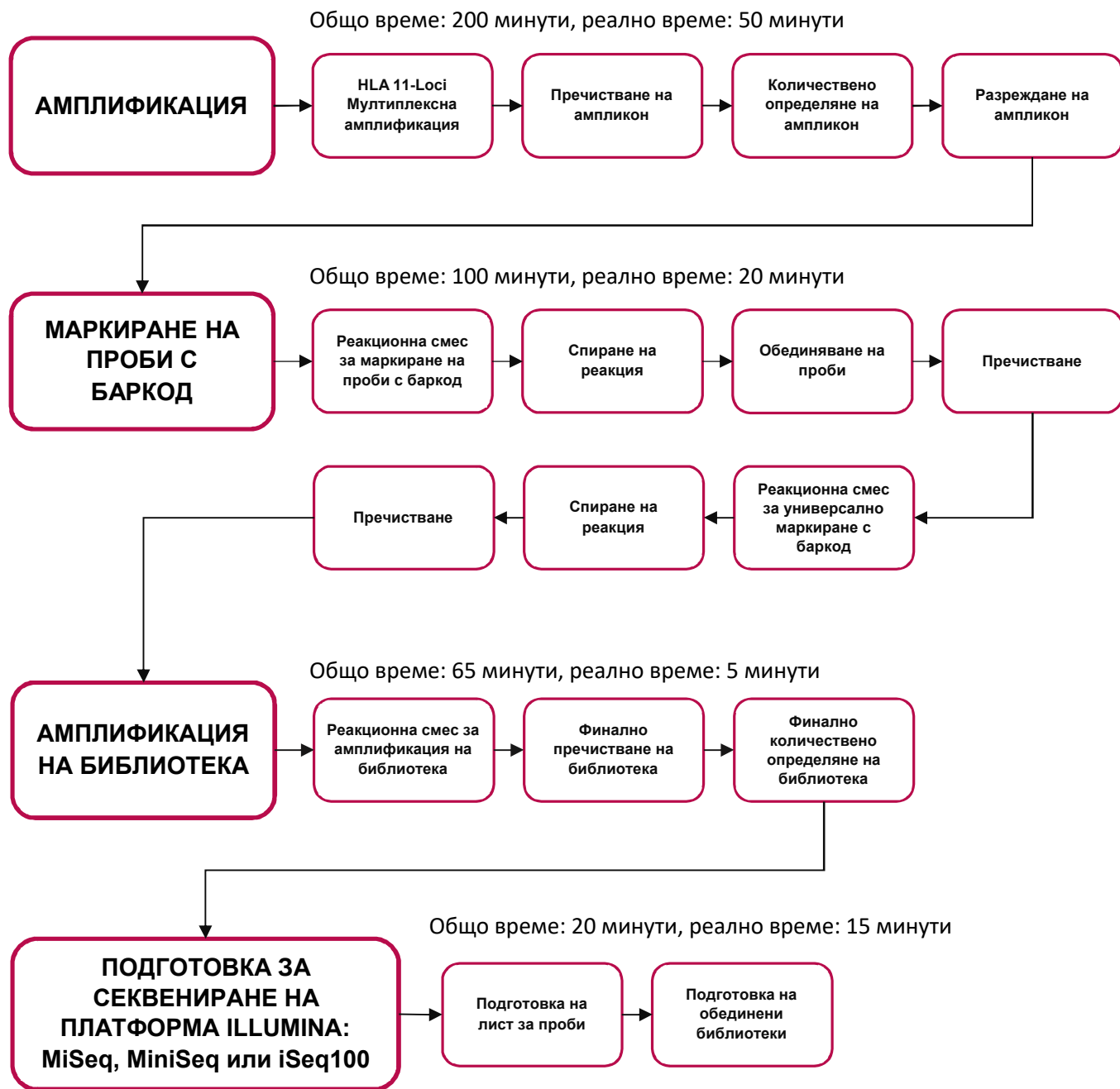
ВАЖНО: Само при разреждането на геномната ДНК могат да се използват горните реактиви. Във всички последователни стъпки, когато е посочен DNA Suspension Buffer, може да се използва само FASTplex DNA Suspension Buffer.

Съхраняване на ДНК

- Използвайте проби за ДНК непосредствено след изолиране или съхраняване на ДНК при температура -20°C или по-ниска.
- Транспортирайте пробите за ДНК при температура 4°C или по-ниска, за да се запази тяхната цялост по време на транспортиране.

Извлечената ДНК е валидирана, че е съхранявана до 14 дни, с комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex. Допълнително съхраняване на ДНК може да се валидира съгласно изискванията на отделната лаборатория.

РАБОТЕН ПРОЦЕС ЗА АНАЛИЗИТЕ



ОБЩА ПОДГОТОВКА ЗА АНАЛИЗИТЕ

1. **Отделете** зоните преди PCR и след PCR.
2. **Съберете** следните елементи и реактиви така, че да са достъпни през целия работен процес:
 - Пълен диапазон на филтрирани пипетни върхове
 - Едно- и многоканални пипети
 - Плаки 96-Well 0,2 ml PCR Plate
 - Епруветки Eppendorf LoBind™
 - Епруветки 0,2 ml PCR
 - Магнитни стативи за 96-ямкова плака и епруветка 2,0 ml
 - Вода без нуклеаза
 - Лед
 - Охладител за PCR плаки
 - Консумативи за етикетиране на епруветки
 - FASTplex DNA Suspension Buffer
 - 200 Proof етанол
 - Стерилни резервоари за реактиви
3. **Ресуспендирайте** ДНК пробите във FASTplex DNA Suspension Buffer, Low (below 0.1mM) EDTA DNA Suspension Buffer, стерилна вода или в 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 при оптимална концентрация 25 ng/μl с флуорометричен метод, като например флуорометър Qubit и комплект Qubit dsDNA HS Assay. Методите с оптична плътност (OD) не трябва да се използват за измерване на концентрацията на ДНК; показанията могат да бъдат надценени.

Допустимият диапазон на концентрация на геномна ДНК е 3,00 ng/μl до 50 ng/μl.

Очакваното съотношение A260/A280 е в диапазона от 1,65 – 1,80, ако методът с оптична плътност (OD) се използва за измерване на качеството на ДНК.
4. **Запишете** мястото на всяка проба, обемът на FASTplex Sample Flex Plate 96 (Вижте [Приложение 2](#) за схема на плаката.) и реактивът FASTplex Univ Barcode Flex A (UB), който ще се използва за подготовка на библиотека.
5. **Преди започване на процедурата поставете ясен етикет** на стрипа(овете) с PCR 8 епруветки или 96-ямкова плака.
6. **Проследявайте** кои ямки от FASTplex Sample Flex Plate 96 и колко реактив UB е използва при подготовката на библиотеките. Потребителите може да проверят схемата на плаката в края на този документ.
7. **Не изхвърляйте** реактивите в комплекта, докато не се изпразнят, тъй като те са предназначени за многократна употреба.
8. **Избягвайте** замърсяване на всички реактиви/компоненти на комплекта.
9. **Върнете** неизползваните части за съхранение при температурата, посочена на етикета.
10. **Вземете** предпазни мерки, за да избегнете кръстосано замърсяване между ямките.

FASTplex Sample Flex Plate, предоставена в комплекта, съдържа достатъчно обем, за да подготви библиотека с 96 проби веднъж или до дванадесет библиотеки с 8 проби. Комплектът FASTplex е съвместим също и с всеки размер на библиотека между 8 и 96 проби. Плаката е проектирана така, че да позволява разделяне на колонки с баркодове (ямки); останалото съдържание на FASTplex Sample Plate трябва да се съхранява при -20°C до следващата употреба. Трябва да се внимава, за да се избегне кръстосано замърсяване между ямките.

11. Програмирайте амплификатора(ите).

12. Настройте всички програми на амплификатора, преди да започнете.

13. Използвайте следните програми:

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

Температура	Време	Цикъл
94°C	2 мин	1
98°C	10 сек	30
69°C	3 мин	
4°C	ЗАДЪРЖАНЕ	1

Скорост на емуляция 9600 и поставен нагревателен капак

- **TAG Program:** 55°C за 15 мин., 25°C задържане, поставен нагревателен капак
- **STOP Program:** 68°C за 10 мин., 25°C задържане, поставен нагревателен капак
- **FASTplex Illumina Library Amplification Program:**

Температура	Време	Цикъл
72°C	10 мин	1
98°C	3 мин	1
98°C	15 сек	12
64°C	30 сек	
72°C	1 мин	
72°C	5 мин	1
4°C	ЗАДЪРЖАНЕ	1

Скорост на емуляция 9600 и поставен нагревателен капак

ВАЖНО: При завършване на всяка PCR стъпка изберете следващата програма на амплификатора, която да се използва, така че термокапакът да е предварително загрят. Капакът на амплификатора трябва да бъде с подходящата целева температура, преди да се стартира реакцията. Избягвайте стартиране на реакция в студен амплификатор.

14. Импулно завъртете комплекта компоненти в подходяща центрофуга, за да съберете реактивите на дъното на ямката или епруветката преди всяка употреба на FASTplex Sample Plate и преди отмерване от епруветките с реактиви, тъй като течностите може да кондензират или да се разменят местоположенията в контейнерите по време на транспортиране или съхранение.

15. Ако компонентите от комплекта на стойна температура бъдат замразени по време на транспортиране или съхранение, изпълнете следните стъпки преди употреба:

- Размразете компонентите на комплекта.
- Смесете компонентите на комплекта.
- Импулно завъртете компонентите от комплекта.

16. Кондиционирайте FASTplex Paramagnetic Beads до стайна температура. FASTplex Paramagnetic Beads могат да бъдат съхранявани до 2 седмици при стайна температура или по-дълги периоди при температура 2 – 8°C.

- **Ако FASTplex Paramagnetic Beads се съхраняват на студено, изпълнете** следните стъпки преди употреба:
 - а) Оставете перлите на стайна температура в продължение на 30 минути.
 - б) Смесете във вортекс перлите напълно, за да се ресуспендират.

ВАЖНО: За точно прехвърляне на обемите не мокрете предварително пипетните върхове и пипетирайте бавно.

17. Проверете стоп разтвора за утайка преди употреба.

- **Ако се вижда утайка, изпълнете** следните стъпки:
 - а) Инкубирайте епруветката при температура 37°C за 5 минути.
 - б) Смесете внимателно чрез обръщане, докато се разтвори утайката.

ВАЖНО: Не смесвайте във вортекс. Стоп разтворът съдържа SDS и ще се утаи, ако се съхранява под стайна температура. Прекалено енергичното смесване ще доведе до образуване на пяна.

18. Съхранявайте FASTplex Barcoding Buffer при стайна температура, когато се използва, защото е вискозен.

ВАЖНО: За точно прехвърляне на буфера за маркиране с баркод не мокрете предварително пипетните върхове и пипетирайте бавно. Докато добавяте буфер за маркиране с баркод към реакционните смеси, разбъркайте добре буфера за маркиране с баркод чрез пипетиране нагоре и надолу няколко пъти с едни и същи пипетни върхове, използвани за добавяне.

19. Ежедневно пригответе 80% етанол.

20. Планирайте маркиране на проби с баркод преди започване на анализа.

21. При планиране на маркиране на проби с баркод имайте предвид следното:

- Комплектът съдържа общо 96 уникални баркода като баркодове на проби (SB) и уникален FASTplex Universal Barcode (UB) за подготовка на библиотека с до 96 проби.
- Комплектът AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex (Кат. № ALL-FAST11LF) е тестван, като е използван Illumina MiSeq v2 Standard (до 96 проби), MiSeq v2 Micro (до 24 проби), MiSeq v2 Nano (до 8 проби), MiniSeq High Output (до 96 проби), MiniSeq Mid Output (до 72 проби) и iSeq v2 (до 24 проби).
- Една библиотека може да съдържа между 8 и 96 проби и се маркира с баркод с един уникален UB.
- Всяка ямка съдържа достатъчно реактиви за маркиране с баркод за една реакционна смес.

- Фигура 1 предоставя схема на библиотека от 96 проби. Показани са ИД на баркодовете на Illumina и техните позиции.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X101	X102	X103	X104	X105	X106	X107	X108	X109	X110	X111	X112
B	X113	X114	X115	X116	X117	X118	X119	X120	X121	X122	X123	X124
C	X125	X126	X127	X128	X129	X130	X131	X132	X133	X134	X135	X136
D	X137	X138	X139	X140	X141	X142	X143	X144	X145	X146	X147	X148
E	X149	X150	X151	X152	X153	X154	X155	X156	X157	X158	X159	X160
F	X161	X162	X163	X164	X165	X166	X167	X168	X169	X170	X171	X172
G	X173	X174	X175	X176	X177	X178	X179	X180	X181	X182	X183	X184
H	X185	X186	X187	X188	X189	X190	X191	X192	X193	X194	X195	X196

Фигура 1. Схема на плака с проби с баркодове

- TypeStream Visual (TSV) NGS Calculator има раздел за листа за проби, който отразява този ред на баркодове.

ВАЖНО: Алтернативни конфигурации, комплекти и системи за секвениране не се поддържат от това приложение и трябва да бъдат определени и валидирани от потребителя.

22. Ако работите с различни размери на проби, имайте предвид следното за работа с обеми на реактивите:

- Когато се обработват различни размери на пробата, различни обеми на обединената SB реакционна смес и на FASTplex Paramagnetic Beads ще бъдат използвани след стъпката на маркиране на пробата с баркод.
- TSV NGS Calculator показва необходимите обеми на реактивите. В раздел „SB UB Lib Amp“ общият брой проби автоматично ще се актуализира на базата на броя на пробите, добавени в раздел „Pool Configuration“. В раздел „SB – UB-Lib. Amp“ се извеждат необходимите обеми на реактивите.
- За да сте сигурни, че ИД на пробите са правилно попълнени навсякъде, вижте ръководството на потребителя на TypeStream Visual NGS Analysis Software.
- Комплектът съдържа достатъчно реактиви за маркиране с баркод, буфер за маркиране с баркод и стоп разтвор за изпълнение на 12 цикъла от 8 проби

АМПЛИФИКАЦИЯ

Материали и оборудване

- Разредена геномна ДНК (25 ng/μl)
- Eppendorf DNA LoBind Tubes, 2,0 ml
- Плаки 96-Well 0,2 ml PCR Plate
- AllType FASTplex 11 Loci Primer Flex Mix (Кат. ID ALF-P11F)
- AllType FASTplex 11 Loci Exon 1 Primer Flex Mix (Кат. ID ALF-P11FE1)
- AllType Buffer (Кат. ID ALL-BUF)
- AllType dNTPs (Кат. ID ALL-NTP)
- AllType LR Polymerase (Кат. ID ALL-LRPOL)
- Вода без нуклеаза
- FASTplex Paramagnetic Beads (Кат. ID FAST-BEAD)
- FASTplex DNA Suspension Buffer (Кат. ID FAST-SUSP)
- 200 Proof етанол, клас за молекулярна биология
- Nunc 96-Well Polypropylene MicroWell Plates
- Магнитен статив за плаки
- 50 ml полистиролни резервоари за реактиви
- Комплект за анализ Qubit dsDNA High Sensitivity
- Флуорометър Qubit
- Пълна матрица от ръчни едноканални пипети (20 μl, 200 μl, 1 ml)
- Пълна матрица от филтрирани, предварително стерилизирани върхове за пипета
- Серологични пипети, 10 или 25 ml
- Центрофуга за PCR плаки
- Миницентрофуга
- Вортекс
- Лед или охлаждащ блок
- Thermal cycler PCR Pressure Pad
- [Амплификатор Veriti 96-Well Thermal Cycler или еквивалентен](#)
- TSV NGS Calculator

Част 1: Амплифициране на проба

1. **Включете** амплификатор.
2. **Програмирайте** амплификатора за изпълняване на следната програма HLA 11-Loci Amplification Illumina Program:

HLA 11-Loci Amplification Illumina Program

Температура	Време	Цикъл
94°C	2 мин	1
98°C	10 сек	30
69°C	3 мин	
4°C	ЗАДЪРЖАНЕ	1

3. **Използвайте** скорост на емулация 9600 или затопляне +0,8°C/сек. и охлаждане -1,6°C/сек. с нагревателен капак, зададен на 105°C

ВАЖНО: Проверете температурата на капака на амплификатора, преди да добавите реакционната смес. Уверете се, че капакът на амплификатора е на подходящата целева температура. Не стартирайте реакция в студен амплификатор.

4. **Използвайте** раздела „gDNA Dilution“ в TSV NGS Calculator за изчисляване на първоначалните обеми на пробите и обемите на DNA Suspension Buffer за подготовка на разреждания 25 ng/μl.



Забележка: За да сте сигурни, че ИД на пробите са правилно попълнени навсякъде, вижте ръководството на потребителя на TypeStream Visual NGS Analysis Software.

5. **Размразете** AllType FASTplex 11 Loci Primer Flex Mix, AllType FASTplex 11 Loci Exon 1 Primer Flex Mix, AllType dNTP и AllType Buffer при стайна температура.
6. **Дръжте** епруветката с AllType LR Polymerase върху лед.
7. **За кратко** смесете във вортекс и забавете въртенето на всички реактиви, С ИЗКЛЮЧЕНИЕ НА полимеразата.
8. **Дръжте** ги върху лед, докато се приготвят за употреба.
9. **В плака 96-Well 0,2 ml PCR Plate аликвотирайте** 4,0 μl геномна ДНК с концентрация, коригирана до 25 ng/μl.
10. **Отидете** в раздел „Amp-Clean Up“ на TSV NGS Calculator, който автоматично ще изчисли обемите на всеки реактив за амплифициране в зависимост от броя на пробите, въведени в раздел „gDNA Dilution“.
11. **Поставете отметка** на полето „Exon 1“, ако използвате праймерна смес Exon 1.
12. **В епруетка 2,0 ml LoBind Tube пригответе** Amplification Master Mix в зависимост от обемите на реактивите, показани в раздел „Amp Clean Up“ на TSV NGS Calculator.
13. **Пригответе** реактивите в реда, показан в таблицата „Amplification“ на раздел „Amp-Clean Up“ в TSV NGS Calculator.
- ВАЖНО:** На този етап пригответе само микса за амплифициране, включващ първите пет компонента. Не добавяйте полимеразата на този етап.
14. **Смесете с вортекс** и завъртете пулсово микса за 10 секунди.
15. **Дръжте** микса върху лед.
16. **Завъртете бързо** полимеразата.

17. **Добавете** полимераза към мастър микса в съответствие с таблицата „Amplification“ в TSV NGS Calculator.
18. **Смесете добре** чрез пипетиране 15 – 20 пъти с обем на пипетата, зададен на половината от общия обем на мастър микса.
19. **Аликвотирайте** 16 µl от мастър микса към всяка ямка с ДНК.
20. **Запечатайте** плаката със запечатваща тарелка.
21. **Завъртете пулсово** плаката.
22. **Заредете** плаката в предварително затоплен амплификатор.
23. **Покрийте** плаката с компресираща подложка.
24. **Стартирайте** програмата HLA 11-loci Amplification.

ВАЖНО: Проверете температурата на капака на амплификатора, преди да добавите реакционната смес. Уверете се, че капакът на амплификатора е на подходящата целева температура. Не стартирайте реакция в студен амплификатор.



ТОЧКА НА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ: Продължете незабавно със следващата стъпка или съхранявайте ампликона при температура -20°C.

Част 2: Пречистване на ампликон

1. **Кондиционирайте** FASTplex Paramagnetic Beads до стайна температура за 30 минути.
2. **Пригответе** пресен 80% етанолов разтвор чрез измерване на етанола и водата без нуклеаза отделно и разбъркайте. Вижте TSV NGS Calculator и раздел „Amp Clean Up“ в секцията Amplification Purification.
3. **Смесете с вортекс** FASTplex Paramagnetic Beads при средна скорост за 30 секунди до пълно ресуспендиране на перлите.
4. **В плаката Nunc LoBind 96-well аликвотирайте** 12 µl от перлите във всяка ямка. Използвайте многоканална пипета и резервоар с реактив за удобство.
5. **Прехвърлете** целия амплифициран продукт (~20 µl) в съответните ямки.
6. **Смесете** чрез пипетиране нагоре и надолу 10 пъти.

ВАЖНО: Сменете върховете за всяка проба и избягвайте създаването на мехурчета.

7. **Инкубирайте** на стайна температура в продължение на 5 минути.
8. **Поставете** плаката върху магнитния статив. Коригирайте плаката според нуждите така, че перлите да образуват пелета от едната страна на всяка ямка. Оставете да престои ~3 минути или докато се избистри.
9. **С помощта на пипета, настроена на 28 µl, внимателно отстранете и изхвърлете** супернатантата от всяка ямка, без да нарушавате пелетата от перли.
10. **С поставена плака върху магнита добавете** 100 µl от 80% етанол във всяка ямка.
11. **Инкубирайте** при стайна температура за 30 секунди или повече, докато разтворът се избистри.

12. С помощта на пипета, настроена на 110 µl, отстранете и изхвърлете супернатантата.

ВАЖНО: Внимавайте да не нарушите пелетата от перли.

13. Повторете стъпки от 10 до 12 по-горе за второ измиване с етанол.

14. С поставена плака върху магнита отстранете видимия остатък от етанол с пипета P-20.

15. Изсушете на въздух перлите при стайна температура до 3 минути върху магнита.

ВАЖНО: Избягвайте прекомерно изсушаване.

16. С поставена плака върху магнита добавете 27 µl от FASTplex DNA Suspension Buffer във всяка ямка.

17. Отстранете плаката от магнита.

18. Смесете всяка проба чрез пипетиране нагоре и надолу 10 пъти, като се избягва образуването на мехурчета.

19. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.

20. Поставете плаката отново върху магнит за ~3 минути или докато се избистри.

21. С обем на пипета, настроен на 25 µl, прехвърлете супернатантата в нова 96-ямкова PCR плака 0,2 ml без нарушаване на перлите.



ТОЧКА НА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ: Продължете незабавно със следващата стъпка или съхранявайте пречистените продукти при температура -20°C.

Част 3: Количествено определяне на ампликон

1. Поставете етикет върху епруветки Qubit Assay Tubes за всяка проба и две допълнителни епруветки за Qubit Standard #1 и #2.

2. Пригответе Working Qubit Solution, като използвате обемите на всяка от пробите, показани по-долу, плюс 15% остатък чрез смесване на еквивалента на:

а) 199 µl от Qubit dsDNA HS Buffer (компонент B) за всяка проба.

б) 1 µl от Qubit dsDNA HS Reagent (компонент A) за всяка проба. Преди употреба смесете с вортекс.

3. Смесете с вортекс Working Qubit Solution и пазете от светлина. Използвайте в рамките на 2 часа.

4. Добавете 198 µl от работния разтвор във всяка епруветка Qubit Assay Tube с поставен етикет.

5. Добавете 190 µl от работния разтвор към всеки две епруветки за стандартите.

6. Добавете 2 µl от съответния пречистен ампликон във всяка епруветка с етикет.

7. Добавете 10 µl от съответния стандарт в подходящата епруветка с етикет.

8. За кратко смесете във вортекс и завъртете всички епруветки.

9. Защитете всички епруветки от светлина.

10. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 2 минути.

11. **Включете** флуорометъра Qubit.
12. **Изберете** DNA от началния екран.
13. **Изберете** dsDNA High Sensitivity.
14. **Натиснете** съответния бутон, за да се започне отчитането на стандартите.
15. **Измерете** Standards 1 и 2 за завършване на калибрирането.
16. **Започнете отчитането на** епруветките с ампликон.
17. **Когато се изведе съобщение, задайте** обема на използвана проба на 2 µl и мерните единици на ng/µl.
18. **Запишете** концентрацията на пробата.
19. **Повторете** стъпки 16 до 18 за всички проби.
20. **Ако някоя проба надвишава горното откриване, изпълнете** следните стъпки:
 - a) Разрежете пробите.
 - b) Измерете отново разредените проби.
 - c) Умножете отчетените показания по коефициента на разреждане. Вижте протокола Qubit за допълнително изясняване.

Част 4: Разреждане на ампликон

Пробите с по-ниска концентрация може да не съдържат достатъчно количество ампликони. Следващите стъпки в този раздел ще помогнат да се изчисли обем на FASTplex DNA Suspension Buffer за разреждане на ампликони.

1. **Използвайте** разделите „Amplicon Dilution“ и „Plate Layout“ на TSV NGS Calculator за изчисляване на разреждането на ампликона.

Функции на разделите „Amplicon Dilution“ и „Plate Layout“

Име на раздел на инструмента за изчисляване	Функции
Amplicon Dilution	Изчисляване на 96 (макс.) коефициента на разреждане на ампликони и обеми на разредителите за приготвяне на 3 – 30 ng въвеждана ДНК за реакционна смес за маркиране на проби с баркод
Plate Layout	Вижте резултата за обемите на входната ДНК и FASTplex DNA Suspension Buffer във формат на плаката 8 x 12

2. **Отворете** TSV NGS Calculator.

ИД на пробите автоматично ще се попълнят от въведените в раздел „gDNA Dilutions“ ИД на проби.

3. **В раздела “Amplicon Dilution“ въведете** концентрацията на ампликони в колоната с име “Amplicon Conc. (ng/µl).“
 - В таблицата ще е показан обемът на FASTplex DNA Suspension Buffer, който да се добави към 2 µl от всеки ампликон [колони „Sample (µl)“].

- Проби, чиито концентрации на ампликони след разреждане попаднат извън желаня въведен обем от 3 – 30 ng в Library Preparation, ще бъдат маркирани в оранжево („High“) или червено („Low“).
 - Колоната „Range“ ще показва „High“ или „Low“ за съответната проба и обеми на проба и буфер, които да се използват.
 - Клетката за обем на заредена проба в калкулатора може да се регулира, ако е необходим повече обем.
4. **В чиста 96-ямкова плака добавете** посоченото количество FASTplex DNA Suspension Buffer и 2 µl в изходния ампликон.
- **За аномални проби добавете** обеми FASTplex DNA Suspension Buffer и изходен ампликон, които са посочени в колоните Sample (µl) и FASTplex DNA Suspension Buffer (µl) за всяка проба. Оптималното въвеждано количество е 10 ng в 4 µl обем при 2,5 ng/µl.
 - **Използвайте** раздела „Plate Layout“, за да локализирате позициите на аномалните проби в плаката
- ВАЖНО:** За всички проби, които излизат извън нормалния диапазон на концентрации, е важно да се добави посоченият обем.
5. **Смесете внимателно** разредения ампликон добре чрез пипетиране. Избягвайте кръстосано замърсяване.
6. **Запечатайте** плаката
7. **Завъртете пулсово** плаката.
8. **Съхранявайте** върху лед за незабавна употреба или при температура -20°C.



ТОЧКА НА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ: Продължете незабавно със следващата стъпка или съхранявайте пречистените продукти при температура -20°C.

МАРКИРАНЕ НА ПРОБИ С БАРКОД

Материали и оборудване

- Разредени ампликони
- Eppendorf DNA LoBind Tubes, 2,0 ml
- PCR епруветка, 0,2 ml
- Плаки 96-Well 0,2 ml PCR Plate
- Магнитен статив за 2,0 ml епруветка
- Серологични пипети, 10 или 25 ml
- FASTplex Sample Flex Plate 96 (Кат. ID FAST-SFP96)
- FASTplex Univ Barcode Flex A (Кат. ID FAST-UBFA)
- FASTplex Barcoding Buffer (Кат. ID FAST-BB)
- FASTplex Stop Solution (Кат. ID FAST-STOP)
- FASTplex Paramagnetic Beads (Кондиционирани до стайна температура) (Кат. ID FAST-BEAD)
- FASTplex DNA Suspension Buffer (Кат. ID FAST-SUSP)
- 200 Proof етанол, клас за молекулярна биология
- Пълна матрица от ръчни едноканални пипети (20 µl, 200 µl, 1 ml)
- Пълна матрица от филтрирани, предварително стерилизирани върхове за пипета
- 8 стрипа с епруветки
- Thermal cycler PCR Pressure Pad
- [Амплификатор Veriti 96-Well Thermal Cycler или еквивалентен](#)
- TSV NGS Calculator

Част 1: Реакционна смес за маркиране на проби с баркод (SB), спиране на реакцията, обединяване на проби и пречистване

ВАЖНО: Преди да започнете изпълнението на тази стъпка, уверете се, че капакът на амплификатора е на подходящата целева температура. Не стартирайте реакцията в студен амплификатор.

ВАЖНО: Преди да започнете изпълнението на тази стъпка, уверете се, че разделът „SB UB Lib Amp“ на TSV NGS Calculator е попълнен.



Полезен съвет: В следващия раздел „Маркиране с баркод на проби“ до стъпка 20 отделните проби трябва да се третират отделно. 8-канална пипета и използването на стрип с 8 епруветки може да направи изпълнението на тази стъпка по-бързо и по-малко податливо на грешки. Обичайните реактиви, буферът за маркиране с баркод и стоп разтворът могат да бъдат аликвотирани в стрип с 8 епруветки или еквивалентен за употреба с 8-канална пипета. Обемите на реактивите за аликвотите с използването на стрип с 8 епруветки са дадени по-долу.

Обем на буфер за маркиране с баркод и стоп буфера (µl) за една ямка в стрип с 8 епруветки (с остатък)

Реактив	8 проби	16 проби	24 проби	48 проби	96 проби
Буфер за маркиране с баркод	7,0	14,0	21,0	42,0	84,0
Стоп разтвор	10,0	20,0	30,0	60,0	120,0

1. **Завъртете пулсово** FASTplex Sample Flex Plate 96 в центрофуга.
2. **След центрофугиране внимателно отстранете** запечатващото фолио от плаката FASTplex Sample Flex Plate.
3. **Изхвърлете** запечатващото фолио.
ВАЖНО: Не използвайте повторно запечатващото фолио.
4. **Поставете** плаката FASTplex Sample Flex Plate върху лед.
5. **Кондиционирайте** FASTplex Paramagnetic Beads на стайна температура.
6. **Установете** реакционната смес за маркиране на проби с баркод на стайна температура.
7. **Прехвърлете** 6 µl от реактива от FASTplex Sample Flex Plate 96 в предварително обозначена с етикет PCR плака или PCR стрип(ове) с 8 епруветки, като използвате точна пипета.
ВАЖНО: Използвайте чисти върхове за всеки трансфер.
8. **Визуално потвърдете**, че обемът на реактивите в плаката изглежда равен.
9. **Върнете** плаката във фризера (съхранение при -20°C), ако не се използват всички 96 проби.
10. **Прехвърлете** 4 µl от разредената входна ДНК (2,5 ng/µl) във всяка ямка (по една проба в ямка) или епруветка, като използвате точна пипета.
11. **Смесете** добре ДНК с реактива за маркиране на проба с баркод във всяка епруветка чрез пипетиране нагоре и надолу десет пъти с 5 µl.
ВАЖНО: Внимавайте да не се образува прекомерна пяна.
12. **Използвайте** чисти върхове за всяка проба.
13. **Внимателно пипетирайте** 5 µl от буфера за маркиране на проба с баркод във всяка ямка или епруветка, като използвате нови пипетни върхове за всеки трансфер.
14. **Смесете напълно, но бавно чрез пипетиране нагоре и надолу** десет пъти с 6 µl.
ВАЖНО: Внимавайте да не се образува прекомерна пяна. Буферът за маркиране с баркод е много вискозен и е податлив на разпенване.
15. **Внимателно и напълно запечатайте или запушете с капачка** SB реакционните смеси, за да предотвратите изпаряване.
16. **Завъртете пулсово** плаката.
17. **Поставете** в амплификатор.
18. **Поставете** PCR компресираща подложка върху плаката.
19. **Стартирайте** следната програма (TAG) с поставен нагревателен капак:
TAG Program: 55°C за 15 мин., 25°C задържане, Обем на реакционната смес: **15 µl**
ВАЖНО: Проверете температурата на капака на амплификатора, преди да добавите реакционната смес. Уверете се, че капакът на амплификатора е на подходящата целева температура. Не стартирайте реакция в студен амплификатор.
20. **Незабавно извадете** плаката от амплификатора, завъртете пулсово.

21. **Добавете** 7,5 µl FASTplex Stop Solution към всяка SB реакция.
22. **Пипетирайте бавно** нагоре и надолу 5 пъти, за да смесите, като внимавате да не внесете мехурчета.

ВАЖНО: Използвайте чисти върхове за всеки трансфер.

23. **След смесване със стоп разтвора запечатайте добре отново** PCR плаката.

24. **Завъртете пулсово** PCR плаката.

25. **Прехвърлете** PCR плаката в амплификатор

26. **Стартирайте** следната STOP програма с поставен нагревателен капак:

STOP program: 68°C за 10 мин., 25°C задържане, Обем на реакционната смес: **22,5 µl**

ВАЖНО: Проверете температурата на капака на амплификатора, преди да добавите реакционната смес. Уверете се, че капакът на амплификатора е на подходящата целева температура. Не стартирайте реакция в студен амплификатор.

27. **Смесете във вортекс миксер** (или енергично пипетирайте) FASTplex Paramagnetic Beads на стайна температура, за да се суспендират напълно перлите.

28. **След амплифициране завъртете пулсово** PCR плаката, съдържаща спрени SB реакции.

29. **Като използвате пипета с обем 10 – 20 µl, прехвърлете** 15 µl от всяка SB реакционна смес в една епруветка 2 ml LoBind, поставете етикет на тази епруветка, на който е изписано „Tube A“, и внимателно смесете чрез бавно пипетиране нагоре и надолу.

Финалният обем на комбинирания пул от SB реакционни смеси се определя от размера на партидата.

30. **След завършване на обединяването вижте** секция „Sample and Universal Barcoding“ на раздел „SB UB Lib Amp“ на TSV NGS Calculator за обема на FASTplex Paramagnetic Beads, който да се добави към обединената SB реакционна смес.

31. **В нова епруветка 2,0 ml LoBind прехвърлете** обема, посочен в клетката „Volume of stopped, pooled SB reaction“ на калкулатора от „Tube A“ в „Tube B“. Няма да се използва целият обем на епруветка с обозначение Tube A.

32. **Поставете етикет** на тази епруветка с надпис „Tube B“.

33. **Продължете** със следващата стъпка с епруветка с обозначение „Tube B“ и нейното съдържание

Обемите на пула и парамагнитните перли за обичайни размери проби са посочени в следващата таблица „Обеми на пул от SB реакционни смеси и FASTplex Paramagnetic Bead“. Обемите за различните размери проби могат да се покажат, като се използва TSV NGS Calculator.

Обеми на пул от SB реакционни смеси и Paramagnetic Bead

Размер на партидата (проби в пул)	8 проби	16 проби	24 проби	48 проби	96 проби
Обем на пул от спрени SB реакционни смеси	80 µl	160 µl	240 µl	480 µl	960 µl
Добавете FASTplex Paramagnetic Beads	72 µl	144 µl	216 µl	432 µl	864 µl

- 34. Преминете към** раздел „SB UB Lib Amp“, за да видите обемите на пула, парамагнитните перли и реактивите за останалата част от работния процес.
- 35. Добавете** съответния обем FASTplex Paramagnetic Beads към пула от спрени SB реакции в „Tube B“.
- 36. Смесете** добре чрез пипетиране нагоре и надолу 10x.
- 37. Инкубирайте** в статив за епруветки (немагнитен) върху плот за 5 минути, за да може ДНК да се свърже.
- 38. Прехвърлете** епруветката в магнитен статив за ~ 5 минути или докато се избистри. Ще се образува пелета от перли.
- 39. Отстранете бавно** супернатантата с пипета и изхвърлете.
- ВАЖНО:** Внимавайте да не нарушите пелетата от перли.
- 40. С епруветката в магнитния статив добавете** 2,0 ml 80% етанол до пълно потапяне на пелетата от перли, без да се разместват перлите.
- ВАЖНО:** Внимавайте да не разместите перлите.
- 41. След 30 секунди бавно отстранете и изхвърлете** супернатантата.
- ВАЖНО:** Внимавайте да не нарушите пелетата от перли.
- 42. Повторете** стъпки 40 и 41 за общо две измивания с 80% етанол. Използвайте малка пипета (напр. P20), за да отстраните остатъчния етанол след второто измиване.
- 43. Изсушете на въздух** перлите, като оставите епруветката незатворена върху магнитния статив в продължение на 2 минути.
- 44. Проверете**, за да се уверите, че няма видими капки етанол в епруветките в края на 2-те минути.

- **Ако се виждат все още капки етанол, оставете да изсъхнат на въздух** перлите по-дълго.



ВНИМАНИЕ: Не сушете перлите повече от 3 минути общо или ще бъде компрометирано възстановяването на ДНК.

- 45. Отстранете** епруветката от магнитния статив.
- 46. Пипетирайте** обема FASTplex DNA Suspension Buffer, предоставен в раздел „SB UB Lib Amp“ на TSV NGS Calculator. Този обем пряко зависи от броя на пробите и ще варира съответно.

Обемите на буфера за обичайни размери проби са посочени в следващата таблица „Обеми на пул от SB реакционни смеси и FASTplex Paramagnetic Bead“.

Обеми на пул от SB реакционни смеси и Paramagnetic Bead

Размер на партидата (проби в пул)	8 проби	16 проби	24 проби	48 проби	96 проби
Обем на FASTplex DNA Suspension Buffer за елуиране	50 µl	96 µl	144 µl	288 µl	576 µl

47. **Пипетирайте** разтвора буфер-перли по протежение на вътрешната стена на епруветката няколко пъти до пълно смесване и ресуспендиране на пелетата от перли.
48. **Инкубирайте** епруветката в статив за епруветки (немагнитна) на плота за най-малко 5 минути, за да се елуира пречистеният пул от SB реакционни смеси от перлите.
49. **Върнете** епруветката на магнитния статив и изчакайте да се формира отново пелета от перли върху вътрешната стена на епруветката ~ 2 минути или докато се избистри.
50. **Когато супернатантата се избистри изцяло, внимателно прехвърлете** пълния библиотечен елуат в нова епруветка с обем 2,0 ml. Прехвърленият елуат съдържа пречистен пул от SB реакционни смеси.



ТОЧКА НА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ: Продължете незабавно със следващата стъпка или съхранявайте пречистените продукти при температура -20°C.

Част 2: Реакционна смес за универсално маркиране с баркод (UB), спиране на реакцията и пречистване

ВАЖНО: Преди да започнете изпълнението на тази стъпка, уверете се, че капакът на амплификатора е на подходящата целева температура. Не стартирайте реакцията в студен амплификатор.

1. **Създайте** UB реакционна смес в PCR епруветка с обем 0,2 ml, като използвате 48 µl от пречистения пул от SB реакционни смеси от последната стъпка. За всички библиотечни пулове > 8 проби ще има излишък от пречистения пул от SB реакционни смеси.
2. **Добавете** UB реактива и буфера за маркиране с баркод, като използвате TSV NGS Calculator или в съответствие с количествата в следващата таблица:

Обеми на UB реактив и буфер за маркиране с баркод

UB реактив и буфер за маркиране с баркод	Обем
Пречистена SB реакционна смес	48,0 µl
FASTplex Univ. Barcode Flex A	4,0 µl
FASTplex Barcoding Buffer	26,0 µl
Общ обем на реакционната смес	78,0 µl

3. **Като използвате пипета, настроена на 50 µl, смесете** UB реакционната смес изцяло чрез пипетиране нагоре и надолу 10 пъти.
4. **Запушете** PCR епруветката, съдържаща UB реакционната смес.
5. **Завъртете пулсово** PCR епруветката.
6. **Поставете** епруветката в амплификатор.
7. **Използвайте** PCR компресираща подложка.
8. **Стартирайте** следната програма (TAG) с подходящ обем на реакционната смес и с поставен нагревателен капак:

TAG Program: 55°C за 15 мин., 25°C задържане, **Обем на реакционната смес:** 78 µl за всички размери на библиотеките.

ВАЖНО: Проверете температурата на капака на амплификатора, преди да добавите реакционната смес. Уверете се, че капакът на амплификатора е на подходящата целева температура. Не стартирайте реакция в студен амплификатор.

9. След TAG програмата отстранете епруветката от амплификатора.

10. Добавете 39 µl Stop Solution.

11. Като използвате пипета, настроена на 50 µl, смесете изцяло чрез пипетиране нагоре и надолу 10 пъти.

ВАЖНО: Внимавайте да не се образува прекомерна пяна.

12. Запушете отново PCR епруветката, съдържаща UB реакционната смес.

13. Завъртете пулсово PCR епруветката.

14. Поставете епруветката в амплификатор.

15. Стартирайте следната програма (STOP) с подходящ обем на реакционната смес и с поставен нагревателен капак:

STOP program: 68°C за 10 мин., 25°C задържане. Използвайте обем от 100 µl в PCR програмата.

ВАЖНО: Проверете температурата на капака на амплификатора, преди да добавите реакционната смес. Уверете се, че капакът на амплификатора е на подходящата целева температура. Не стартирайте реакция в студен амплификатор.

16. Прехвърлете целия обем на спряната UB реакционна смес в епруетка 2,0 ml LoBind.

17. Смесете във вортекс миксер (или енергично пипетирайте) парамагнитните перли на стайна температура, за да се суспендират напълно. Обемът на UB реакционната смес трябва да бъде 117 µl, но изпарение по време на реакцията може да намали този обем.

18. Измерете обема на UB реакционната смес, като използвате пипета.

19. Добавете същия обем, измерен в стъпка 18, от парамагнитните перли в епруетката 2,0 ml LoBind

20. Смесете напълно чрез пипетиране.

21. Инкубирайте при стайна температура в статив за епруетки (немагнитен) върху плот за 5 минути, за да може ДНК да се свърже.

22. Поставете епруетката 2,0 ml LoBind на магнитен статив.

23. Оставете перлите да се отделят напълно в продължение на 3 минути. По протежение на едната страна на епруетката ще се образува пелета от перли и след ~3 минути супернатантата ще изглежда напълно бистра.

24. Отстранете бавно супернатантата с пипета и изхвърлете.

ВАЖНО: Внимавайте да не нарушите пелетата от перли.

25. С епруетката в магнитния статив добавете 500 µl 80% етанол до пълно потапяне на пелетата от перли.

ВАЖНО: Внимавайте да не разрушите пелетата.

26. Бавно отстранете и изхвърлете супернатантата след 30 секунди или докато се избистри.

ВАЖНО: Внимавайте да не нарушите пелетата от перли.

27. Повторете стъпки 25 и 26 за общо 2 измивания с 80% етанол.

28. Използвайте голяма пипета, за да отстраните повечето от етаноловия отпадък.

29. Използвайте по-малка пипета (напр. P20), за да отстраните остатъчния етанол, който се събира на дъното на епруветката.

30. Изсушете на въздух перлите, като оставите епруветката незатворена върху магнитния статив в продължение на 2 минути.

31. Проверете, за да се уверите, че няма видими капки етанол в епруветката в края на 2-те минути.

- **Ако се виждат все още капки етанол, оставете да изсъхнат на въздух** перлите по-дълго.



ВНИМАНИЕ: Не сушете перлите повече от 3 минути общо или ще бъде компрометирано възстановяването на ДНК.

32. Отстранете епруветката от магнитния статив.

33. Добавете 20 µl FASTplex DNA Suspension Buffer.

- **Пипетирайте** течността по протежение на вътрешната стена на епруветката няколко пъти до пълно ресуспендиране на пелетата от перли.

34. Инкубирайте в статив за епруветки (немагнитен) на плота за най-малко 5 минути, за да се елуира пречистената ДНК от перлите.

35. Върнете епруветката в магнитния статив.

36. Изчакайте да се формира пелетата от перли по вътрешната стена на епруветката за ~2 минути или докато се избистри.

37. Когато супернатантата се избистри изцяло, внимателно прехвърлете 17 µl от елуата на ДНК в чиста PCR епруветка с обем 0,2 ml. Прехвърленият елуат съдържа ДНК, пречистена от UV реакционната смес, и вече е готова за амплифициране на библиотека.



ТОЧКА НА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ: Продължете незабавно със следващата стъпка или съхранявайте пречистените продукти при температура -20°C.

АМПЛИФИКАЦИЯ НА БИБЛИОТЕКА

Материали и оборудване

- UB маркирана с баркод библиотека
- PCR епруветка с обем 0,2 ml
- FASTplex Library Amp Mix (Кат. ID FAST-LAM)
- FASTplex Library Primer Flex Mix (Кат. ID FAST-LPFM)
- FASTplex Paramagnetic Beads (Кат. ID FAST-BEAD)
- FASTplex DNA Suspension Buffer (Кат. ID FAST-SUSP)
- Ръчни едноканални пипети (20 µl, 200 µl, 1 ml)
- Филтрирани, предварително стерилизирани пипетни върхове
- 200 Proof етанол, клас за молекулярна биология
- [Амплификатор Veriti 96-Well Thermal Cycler](#) или еквивалентен
- Магнитен статив за 2,0 ml епруветка
- Вода без нуклеаза
- Eppendorf DNA LoBind Tubes, 2,0 ml
- Флуорометър Qubit™ или еквивалентен
- Комплект за анализ Qubit dsDNA HS
- Епруветки за анализ Qubit
- Инструмент за изчисление

Част 1: Реакционна смес за амплификация на библиотека

ВАЖНО: Преди да започнете изпълнението на тази стъпка, уверете се, че капакът на амплификатора е на подходящата целева температура. Не стартирайте реакцията в студен амплификатор.

Обеми на реактиви за следващите стъпки

Реактив	Обем
FASTplex Library Primer Flex Mix	8 µl
Маркирана с баркодове библиотека от стъпка 37 в Част 2 на раздел „Маркиране на проби с баркод“	17 µl
FASTplex Library Amp Mix	75 µl

1. **Както е описано в таблицата по-горе, добавете 8 µl от Library Primer Mix към 17 µl елуат на маркирана с баркодове библиотека в PCR епруветката с обем 0,2 ml от [стъпка 37](#) в Част 2 на процеса за маркиране на проби с баркод.**
2. **Добавете 75 µl от Library Amp Mix.**
3. **Смесете добре чрез пипетиране.**
4. **Запушете PCR епруветката и завъртете пулсово.**
5. **Използвайте** подходяща PCR компресираща подложка.

6. **Стартирайте** следната програма FASTplex Illumina Library Amplification PCR с поставен нагревателен капак и режим на емулиране 9600 или +0,8°C/сек. загряване и -1,6°C/сек. охлаждане с нагревателен капак, настроен на 105°C. Общият обем на реакционната смес е 100 µl.

• **FASTplex Illumina Library Amplification Program:**

ТЕМПЕРАТУРА	ВРЕМЕ	ЦИКЪЛ
72°C	10 мин	1
98°C	3 мин	1
98°C	15 сек	12
64°C	30 сек	
72°C	1 мин	
72°C	5 мин	1
4°C	ЗАДЪРЖАНЕ	1

Скорост на емулация 9600 и поставен нагревателен капак

ВАЖНО: Проверете температурата на капака на амплификатора, преди да добавите реакционната смес. Уверете се, че капакът на амплификатора е на подходящата целева температура. Не стартирайте реакция в студен амплификатор.

7. **След PCR завъртете пулсово** реакционната смес за амплификация на библиотеката.
8. **Прехвърлете** 95 µl от реакционната смес за амплификация на библиотеката в епруетка 2,0 ml LoBind.
- **Ако е по-малко от 95 µl, отбележете** обема за ЧАСТ 2: Пречистване на амплифицирана библиотека, [стъпка 1](#).

ВАЖНО: Обемът ще намалее поради изпаряване по време на термичния цикъл, така че е важно да се измери обемът преди етапите на пречистване.



ТОЧКА НА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ: Продължете незабавно със следващата стъпка или съхранявайте пречистените продукти при температура -20°C.

Част 2: Пречистване на амплифицирана библиотека

1. **В нова епруетка 2,0 ml LoBind разрежете** реакционната смес за амплификация на библиотека до финалния обем 200 µl чрез добавяне на 105 µl (или повече в случай на изпаряване) FASTplex DNA Suspension Buffer към амплифицирания продукт.
2. **Смесете във вортекс миксер** при стайна температура FASTplex Paramagnetic Beads, за да се суспендират напълно.
3. **Добавете** 160 µl FASTplex Paramagnetic Beads (0,8x обемни еквиваленти) към разредената мултиплексна библиотека.
4. **Смесете** напълно чрез пипетиране нагоре и надолу.
5. **Инкубирайте** в статив за епруетки (немагнитен) върху плот за 5 минути, за да може ДНК да се свърже.
6. **Поставете** епруетката 2,0 ml LoBind на магнитен статив.

7. **Оставете** перлите да се утаят напълно приблизително за 3 минути. По протежение на едната страна на епруветката ще се образува пелета от перли и след ~3 минути супернатантата ще изглежда напълно бистра синя.
8. **Отстранете бавно** супернатантата с пипета и изхвърлете.
ВАЖНО: Внимавайте да не нарушите пелетата от перли.
9. **С епруветката в магнитния статив добавете 500 µl 80% етанол.**
ВАЖНО: Внимавайте да не разместите перлите.
10. **Инкубирайте** за 30 секунди, докато разтворът се избистри.
11. **Оставете** епруветката в магнитния статив.
12. **Внимателно отстранете и изхвърлете** супернатантата.
13. **Повторете** стъпки 9 до 12 за общо две измивания с 80% етанол.
14. **Използвайте** малка пипета (напр. P20), за да отстраните остатъчния етанол след второто измиване.
15. **Изушете на въздух** перлите, като оставите епруветката незатворена върху магнитния статив в продължение на 2 минути.
16. **Проверете**, за да се уверите, че няма видими капки етанол в епруветките след 1 минута.
 - **Ако се виждат все още капки етанол, оставете да изсъхнат на въздух** перлите по-дълго.



ВНИМАНИЕ: Не сушете перлите повече от 3 минути общо или ще бъде компрометирано възстановяването на ДНК.

17. **Отстранете** епруветката от магнитния статив.
18. **Добавете 35 µl FASTplex DNA Suspension Buffer.**
19. **Пипетирайте** течността по протежение на вътрешната стена на епруветката няколко пъти до пълно дисперсиране на перлите.
20. **Инкубирайте** в продължение на 5 минути в немагнитен статив за епруветки върху плота за елуиране на мултиплексната библиотека от магнитните перли.
21. **Върнете** епруветките в магнитния статив.
22. **Изчакайте** да се формира пелетата от перли по вътрешната стена на епруветката за ~2 минути или докато се избистри.
23. **Когато супернатантата се избистри изцяло, внимателно прехвърлете 33 µl от елуата на ДНК в нова 2,0 ml LoBind епруветка.** Прехвърленият елуат съдържа финалната библиотека.



ТОЧКА НА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ: Продължете незабавно със следващата стъпка или съхранявайте пречистените продукти при температура -20°C.

Част 3: Количествено определяне на финалната библиотека

1. **Поставете етикет върху** пет епруветки Qubit Assay Tubes – три за количествено определяне на три копия на библиотеката и две допълнителни епруветки за Qubit Standard #1 и #2.

2. **Подгответе** Working Qubit Solution в 5 ml епруветка за 10 проби (за отчитане на измерването в [стъпка 16](#) и [стъпка 23](#) за проби преди и след разреждане) чрез смесване на еквивалента на:
 - a) 199 µl от Qubit dsDNA HS Buffer (компонент B) за всяка проба.
 - b) 1 µl от Qubit dsDNA HS Reagent (компонент A) за всяка проба. Смесете във вортекс преди употреба.
3. **Смесете във вортекс** Working Qubit Solution.
4. **Покрийте** с фолио.

ВАЖНО: Използвайте в рамките на 2 часа.
5. **Добавете** 198 µl от работния разтвор в три епруветки Qubit Assay Tubes, използвани за количествено определяне на три копия на библиотеката.
6. **Добавете** 190 µl от работния разтвор в две епруветки, използвани за Qubit Standards.
7. **Добавете** 2 µl от пречистената библиотека в три епруветки Qubit Assay Tubes, използвани за количествено определяне на три копия на библиотеката.
8. **Добавете** 10 µl от съответния Qubit Standard в две епруветки, използвани за Qubit Standards.
9. **За кратко смесете във вортекс** и завъртете всички епруветки.
10. **Покрийте** епруветките с фолио.
11. **Инкубирайте** епруветките на стайна температура в продължение на 2 минути.
12. **Включете** флуорометъра Qubit,
13. **Изберете** DNA от началния екран.
14. **Изберете** dsDNA High Sensitivity.
15. **Натиснете** съответния бутон, за да се започне отчитането на стандартите.
16. **Измерете** Standards 1 и 2 за завършване на калибрирането. Това калибриране може да се използва за количествено определяне на крайната библиотека в [стъпка 23](#) на този раздел, ако финалното количествено определяне се изпълни в рамките на 2 часа.
17. **Започнете отчитането на** трите епруветки с библиотеката.
18. **Когато се изведе съобщение, променете** обема на използвана проба на 2 µl и мерните единици на ng/µl.
19. **Запишете** концентрацията на библиотеката в трите копия.
20. **В TSV NGS Calculator отворете** раздела, наречен „Final Quant“
21. **Изберете** подходящия Instrument от падащото меню в горния ляв ъгъл на раздела.

Различните системи за секвениране изискват различни финални концентрации на библиотеката. В следващата таблица се изброяват концентрациите за системите за секвениране MiSeq, MiniSeq и iSeq.

Финални концентрации на библиотеки

Система за секвениране	Концентрация на библиотека
MiSeq	2,1 ng/μl
MiniSeq	0,53 ng/μl
iSeq	0,056 ng/μl

- 22. Въведете** средната концентрация от резултатите на трите копия, която беше определена от Qubit в TSV NGS Calculator „Pool Quant Values (ng/μl)“.

Калкулаторът ще изчисли количеството FASTplex DNA Suspension Buffer и обемът на обединените проби, който трябва да бъде комбиниран в нова епруветка 2,0 ml LoBind за постигане на правилната концентрация на библиотеката.

„Diluted Pool Volume (μl)“ може да бъде коригиран при необходимост, но финалната желана целева концентрация не може да бъде редактирана в калкулатора. Това може да е полезно, за да се направи междинно разреждане, особено за библиотеки, които трябва да бъдат секвенирани на iSeq, когато финалната концентрация на библиотеката е ниска.

- 23. Определете количествено** разредената библиотека в три копия, като използвате Qubit Working Solution, за да се провери дали е с подходящата концентрация.

Обеми на Qubit Working Solution в зависимост от системата за секвениране

Система за секвениране	Обем на Qubit Working Solution	Обем на библиотеката
MiSeq	198 μl	2 μl
MiniSeq	198 μl	2 μl
iSeq	195 μl	5 μl

ПОДГОТОВКА ЗА СЕКВЕНИРАНЕ НА ПЛАТФОРМА ILLUMINA

Материали и оборудване

- Финалната библиотека с концентрация, коригирана за подходящ комплект за секвениране на Illumina
- Комплект(и) за секвениране на Illumina по избор (вижте „Непредоставени необходими материали и оборудване“ по-горе за съвместими комплекти)
- Комплект контроли PhiX
- Разтвор на NaOH $\geq 1,0$ M, клас за молекулярна биология (само за MiSeq и MiniSeq)

Част 1: Подготовка на PhiX Control

1. **В нова епруветка 2,0 ml LoBind комбинирайте** 2 μ l от 10 nM PhiX изходен разтвор към 3 μ l FASTplex DNA Suspension Buffer за разреждане на PhiX до 4 nM.
2. **Смесете с вортекс** и завъртете пулсово.
3. **В същата епруветка, съдържаща 4 nM PhiX, добавете** 5 μ l от прясно приготвен 0,2 M разтвор на NaOH
4. **Смесете с вортекс** и завъртете пулсово.
5. **Инкубирайте** на стайна температура в продължение на 5 минути.
6. **Когато завърши 5-минутното инкубиране, добавете** 990 μ l от HT1/Hybridization buffer към денатурирания PhiX, за да се понижи концентрацията до 20 pM.
7. **Смесете с вортекс** и завъртете пулсово 20 pM PhiX.

20 pM PhiX може да се използва незабавно в следващата подготовка на библиотеката или да се съхранява при температура -20°C за срок от до 2 седмици.

Част 2: Секвениране MiSeq – Подготовка на листа за проби

1. **Отворете** раздела „Sample Sheet“ в TSV NGS Calculator.
2. **Ако се използва MiSeq с операционна система Windows 7, изберете „MiSeq“** от падащото меню в горния ляв ъгъл на калкулатора.
Колоните „Sample_Name“ и „Sample_ID“ на листа за проби автоматично ще се попълват.
3. **Ако се използва MiSeq с операционна система Windows 10, изберете „MiSeqV2“** от падащото меню в горния ляв ъгъл на калкулатора.
Колоните „Sample_Name“ и „Sample_ID“ на листа за проби автоматично ще се попълват.
4. **Попълнете** името на експеримента в маркираната клетка (в жълто). Датата ще се попълни автоматично, но може да бъде редактирана.
5. **Експортирайте** завършения лист за проби с бутона „Export“
6. **Дайте име** на листа за проби.
7. **Копирайте** файла на USB памет.

Част 3: Секвениране MiSeq – Подготовка на обединена библиотека

ВАЖНО: Преди да започнете следващата серия от стъпки, размразете напълно MiSeq Reagent Cartridge, като я поставите във вода със стайна температура до линията на водата за най-малко един час. След като се размрази напълно, касетата може да бъде съхранявана при температура 4°C, докато се подготвите за секвениране.

1. **В допълнение към размразяването на касетата с реактив размразете** HT1/Hybridization Buffer, който е включен в комплекта MiSeq Reagent Kit. След като се размрази, съхранявайте HT1/Hybridization Buffer върху лед.
2. **В нова епруетка 1,5 ml LoBind комбинирайте** 5 µl от обединената библиотека с 2,1 ng/µl (или друга използвана стойност) с 5 µl от прясно подготвен 0,2 M разтвор на NaOH.
3. **Смесете с вортекс** и завъртете пулсово.
4. **Инкубирайте** на стайна температура в продължение на 5 минути.
5. **Когато завърши 5-минутното инкубиране, добавете** 990 µl от HT1/Hybridization buffer към денатурираната библиотека, за да се понижи концентрацията до 20 pM.
6. **Смесете с вортекс** и завъртете пулсово.
7. **Добавете** 25 µl от 20 pM PhiX към 1 ml денатурирана и разреждана библиотека. Смесете с вортекс и завъртете пулсово.
8. **Снабдете** се с размразената MiSeq Reagent Cartridge.
9. **Обърнете** MiSeq Reagent Cartridge 10 пъти, за да се смеси.
10. **Потупайте внимателно** касетата в изправено положение върху работния плот.
11. **Избършете** всяка течност или конденз от касетата с помощта на лабораторна кърпичка.
12. **Пробийте** ямка 17 на MiSeq Reagent Cartridge, като използвате пипетен връх 1 ml.
13. **Изхвърлете** пипетния връх, след като се пробие MiSeq Reagent Cartridge.
14. **Прехвърлете** 600 µl от комбинираната библиотека и разтвора PhiX в ямка 17, като използвате пипета.
15. **Уверете се**, че разтворът се разпределя на дъното на ямката.
16. **Натиснете** бутона Sequence от интерфейса на инструмента, за да преминете през останалата част от настройката на цикъла за секвениране.
17. **Когато се изведе съобщение за въвеждане на проточната клетка, отстранете** проточната клетка от нейния контейнер.
18. **Почистете** проточната клетка чрез пълно изплакване с вода с лабораторно качество.
19. **След като се изплакне, подсушете добре** повърхността на проточната клетка чрез внимателно попиване с лабораторна кърпичка.
20. **Уверете се**, че всички видими петна, прах и власинки от лабораторни кърпички са отстранени от повърхността на проточната клетка.
21. **Вкарайте** проточната клетка в отсека за проточни клетки на MiSeq и затворете ключалката.
22. **Продължете** с инициране на цикъла за секвениране на екрана на секвенатора MiSeq.

23. След зареждане на касетата за секвениране и буфера за инкорпориране, заредете листа за пробите, създаден в предходната секция, [Част 2:Секвениране MiSeq – Подготовка на листа за проби](#), като лист за проби от USB паметта, като използвате бутона за търсене сред папките.
24. Натиснете бутона Restart/Check, за да продължите с настройката на цикъла за секвениране.
25. Когато цикълът приключи, почистете инструмента своевременно според препоръките на производителя.

Част 4: Секвениране MiniSeq – Подготовка на листа за проби

1. Отворете раздела „Sample Sheet“ в TSV NGS Calculator.
2. Потребителите на MiniSeq избират „MiniSeq“ от падащото меню в горния ляв ъгъл на калкулатора.

Колоните „Sample_Name“ и „Sample_ID“ на листа за проби автоматично ще се попълват.
3. Попълнете името на експеримента в маркираната клетка (в жълто).

Датата ще се попълни автоматично, но може да бъде редактирана.
4. Експортирайте попълнения лист за проби, като щракнете върху бутона „Export“.
5. Дайте име на листа за проби.
6. Копирайте файла на USB памет.
7. Влезте като Local Run Manager.
8. Щракнете върху синия бутон „Create Run“ горе вдясно на страницата.
9. Изберете „GenerateFASTQ“.
10. Щракнете върху бутона „Import Sample Sheet“ горе вляво на страницата.
11. Навигирайте до мястото, където е записан листът за проби.
12. Отворете листа за проби.

Run Name трябва автоматично да се актуализира с това, което е въведено в клетка B3 на Sample Sheet.

Комплектът Library Prep kit автоматично трябва да се актуализира на „Custom“.
13. Превъртете до долната страна на страницата.
14. Щракнете върху бутона „Save Run“.

Част 5: Секвениране MiniSeq – Подготовка на обединена библиотека

ВАЖНО: Преди да започнете следващата серия от стъпки, размразете MiniSeq Reagent Cartridge, като я поставите във вода със стайна температура до долната страна на ръкохватката в продължение на 3+ часа. След като се размрази напълно, касетата може да бъде съхранявана при температура 4°C, докато се подготвите за секвениране.

Кондиционирайте проточната клетка, която се съхранява отделно при температура 4°C, до стайна температура за 30 минути преди секвениране.

1. **В допълнение към размразяването на касетата с реактив размразете** HT1/Hybridization Buffer, който е опакован отделно от касетата.
2. **След като се размрази, съхранявайте** HT1/Hybridization Buffer върху лед.
3. **В нова епруетка 1,5 ml LoBind комбинирайте** 5 µl от обединената библиотека с 0,53 ng/µl с 5 µl от прясно подготвен 0,1 M разтвор на NaOH.
ВАЖНО: Денатурацията MiniSeq използва по-ниска концентрация на NaOH от MiSeq.
4. **Смесете с вортекс** и завъртете пулсово.
5. **Инкубирайте** на стайна температура в продължение на 5 минути.
6. **Когато завърши 5-минутното инкубиране, добавете** 5 µl от FASTplex DNA Suspension Buffer към денатурираната библиотека, за да се понижи концентрацията до 333 pM.
7. **Смесете с вортекс** и завъртете пулсово.
8. **Добавете** 985 µl от HT1/Hybridization Buffer към денатурираната библиотека, за да се понижи концентрацията до 5 pM.
9. **Смесете с вортекс** и завъртете пулсово.
10. **Добавете** 2,5 µl от приготвения 20 pM PhiX към денатурирана и разрежена библиотека.
11. **Добавете** 180 µl от денатурираната и разрежена библиотека към 320 µl от HT1/Hybridization Buffer, за да се понижи до финалната концентрация на зареждане 1,8 pM.
12. **Смесете с вортекс** и завъртете пулсово.
13. **Снабдете** се с размразената MiniSeq Reagent Cartridge.
14. **Обърнете** 10 пъти, за да се смеси.
15. **Потупайте внимателно** касетата в изправено положение върху работния плот.
16. **Избършете** всяка течност или конденз от касетата с помощта на лабораторна кърпичка.
17. **Пробийте** ямка 16 на MiniSeq Reagent Cartridge, като използвате пипетен връх 1 ml. Изхвърлете върха, след като го използвате за пробиване.
18. **Прехвърлете** 500 µl от комбинираната библиотека и разтвора PhiX в ямка 16, като използвате пипета.
19. **Уверете се**, че разтворът се разпределя на дъното на ямката.
20. **Натиснете** бутона Sequence от интерфейса на инструмента, за да преминете през останалата част от настройката на цикъла за секвениране.
Интерфейсът ще подкани потребителя да постави проточната клетка.
21. **Проверете** внимателно проточната клетка за прах или други белези.
22. **Уверете се**, че всички видими петна, прах и власинки от лабораторни кърпички са отстранени от повърхността на проточната клетка.
23. **Вкарайте** проточната клетка в отсека, закрепете я и затворете капака.
24. **Продължете** с инициране на цикъла за секвениране на екрана на секвенатора MiniSeq.
25. **Заредете** MiniSeq Reagent Cartridge, съдържаща приготвената библиотека за секвениране.



Забележка: Когато цикълът завърши, MiniSeq може да се почисти автоматично, ако е избрана тази опция.

Част 6: Секвениране iSeq 100 – подготовка на листа за проби

1. **Отворете** раздела „Sample Sheet“ в TSV NGS Calculator.
2. **Ако използвате iSeq, изберете „iSeq“** от падащото меню в горния ляв ъгъл на калкулатора.
Колоните „Sample_Name“ и „Sample_ID“ на листа за проби автоматично ще се попълват.
3. **Попълнете** името на експеримента в маркираната клетка (в жълто).
Датата ще се попълни автоматично, но може да бъде редактирана.
4. **Експортирайте** завършения лист, като използвате бутона „Export“ и дайте име на листа за проби. Копирайте файла на USB памет.
5. **Влезте като Local Run Manager** и щракнете върху синия бутон „Create Run“ горе вдясно на страницата и изберете „GenerateFASTQ“.
6. **Щракнете** върху бутона „Import Sample Sheet“ горе вляво на страницата, навигирайте до мястото, където е записан листа за проби, и го отворете.
Run Name трябва автоматично да се актуализира с това, което е въведено в клетка B3 на Sample Sheet.
Комплектът Library Prep kit автоматично трябва да се актуализира на „Custom“.
7. **Превъртете** до долната страна на страницата.
8. **Щракнете** върху бутона „Save Run“.

Част 7: Секвениране iSeq 100 – подготовка на обединена библиотека

ВАЖНО: Преди да започнете следващата серия от стъпки, размразете напълно iSeq Reagent v2 Cartridge чрез потапянето ѝ във вода със стайна температура за поне 6 часа. Като алтернатива, може да се размрази за една нощ при температура 4°C и да се постави на стайна температура за ~ 1 час преди употреба.

1. **В допълнение към размразяването на касетата с реактива извадете** касетата с проточната клетка от съхранение при температура 4°C и я оставете да се кондиционира на стайна температура за поне 15 минути.
2. **Добавете** 20 µl от 20 pM PhiX към 100 µl от 0,056 ng/µl от обединената библиотека.
3. **Смесете с вортекс** и забавете въртенето.
4. **Обърнете** опакованата в плика касета 5 пъти, за да се смесят реактивите.
5. **Потупайте** касетата с етикета нагоре няколко пъти, за да се слоят реактивите надолу от стената на ямките.
6. **Извадете** касетата от плика.
7. **Отворете** опаковката на проточната клетка.
8. **Извадете** опаковката на проточната клетка от пластмасовата поставка.
9. **Проверете** проточната клетка за някакви повреди.

10. **Поставете** проточната клетка в касетата, така че етикетът да се вижда от външната страна на касетата и стъклената част на проточната клетка да се вижда през отвора в касетата. Ще се чуе щракване, когато проточната клетка се постави правилно.
11. **Пробийте** фолиото в оранжевата кутия, обозначена с „Library“.
12. **Налейте** 20 µl от вашата библиотека плюс PhiX на дъното на резервоара Library.
13. **Продължете** с инициране на цикъла за секвениране на екрана на секвенатора iSeq.
14. **Следвайте** инструкциите на екрана, за да продължите.
15. **Когато се покаже екранът с опции на цикъла, изберете „1“** в опцията „Read Index“ за едноиндексно секвениране.
16. **Продължете** със секвенирането.

РЕЗУЛТАТИ

Получаване на данни

След завършване на секвенирането системният софтуер на секвенатора демултиплексира всички прочитания на секвенциите, като използвате баркодовете и генерира файл на прочитанията 1 и 2 за всяка проба. Вижте ръководството за потребителя на системния софтуер на секвенатора, за да изтеглите данни за секвенцията в техния формат по подразбиране или определен формат, като например файл FASTQ за всяка проба. HLA TypeStream Visual NGS Analysis Software импортира файл FASTQ от секвенатора за анализиране.

ИД на пробата може да бъде включено в данновия файл от софтуера на секвенатора или може да се добави, когато се получават данните от TypeStream Visual NGS Analysis Software.

Изчисляване на данни

За подробности вижте ръководството на потребителя на TypeStream Visual NGS Analysis Software. TypeStream Visual NGS Analysis Software предоставя всички необходими показатели за качество – дълбочина на покритие, качествен резултат за прочитанията на базите, прочитанията на изравняваните участъци и определяне на варианти, а лабораторията трябва да определи допустимите стойности за всеки показател за качество, за да осигури точен резултат.

Анализ на данни

TypeStream Visual NGS Analysis Software сортира импортираните прочитания на секвенции, като използва специфичните за локуса референтни секвенции от базата данни IPD-IMGT/HLA, която предоставя специфична база данни за секвенции на човешкия основен комплекс за хистосъвместимост, идентифицира референтни алели, които най-добре съответстват на прочитанията на пробата, предоставя диапазони за качеството, картографира и асемблира последователни секвенции от картографираните прочитания и присвоява алели на локус въз основа на събраните консенсусни последователни секвенции. Използването на друг софтуер за анализ може да доведе до неправилно въвеждане и не се поддържа.

ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОЦЕДУРАТА

- A. Клиничните лаборатории се ръководят от насоките на ASHI, CLIA и EFI, които задължават лабораториите да вземат клинични решения на основата на множество източници. Трансплантациите на твърди органи изискват потвърдително тестване, получено от множество източници, за да се определи годността на донора. Решението за трансплантация няма да се взема само въз основа на положителни или отрицателни резултати от въпросния тест.
- B. Неоптималното качество и/или количество на пробата или библиотеката може да доведе до неуспешно тестване. Причините за такова неуспешно тестване могат да включват малко количество и ниско качество на пробата, замърсяване, наличие на инхибитори, неуспешни случайни ензимни реакции, некалибрирани и неправилно функциониращи инструменти, използване на реактиви с изтекъл срок на годност или реактиви на трети страни, неправилна поддръжка на реактиви, промяна на протокола и неправилно количествено определяне или изчисление.
- C. Пробната ДНК трябва да бъде определена количествено с флуорометър и не трябва да има никой от известните PCR инхибитори. PCR инхибитори могат да бъдат въведени от първоначалния източник на пробата или от различни методи на екстракция на ДНК. Референтни проби трябва да бъдат валидирани за амплификация, като се използват реактивите от комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex.
- D. Работният процес за подготовка на PCR и библиотеки, описан в този протокол, изисква високо контролирани условия. Следвайте стандартните указания за PCR, посочени в раздела по-горе [„ОБЩА ПОДГОТОВКА ЗА АНАЛИЗИ“](#), за да се минимизират замърсяванията.
- E. Комплектът AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex Kit - 96 е тестван за употреба с амплификатор Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler (Кат. № 4375786), модел, който има възможност за скорост от 9600 емуляции или нагряване с +0,8°C/сек. и охлаждане -1,6°C/сек. и нагревателен капак при температура 105°C или еквивалентен за всички програми. Други амплификатори, за които се обмисля използване, изискват оценка и валидиране от крайния потребител.
- F. Комплектът AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex - 96 (Кат. № ALL-FAST11LF) е тестван с помощта на система за секвениране MiSeq на Illumina (300 цикъла) с комплект с реактиви MiSeq Reagent Kit v2 (≤ 96 проби), комплект Micro Kit v2 (≤ 24 проби), Nano Kit v2 (≤ 8 проби), система за секвениране MiniSeq с High (≤ 96 проби) и Mid Output Kit (≤ 72 проби) и система за секвениране iSeq със 100 i1 Reagent v2 Kit (≤ 24 проби). Алтернативни конфигурации, комплекти и системи за секвениране не се поддържат от това приложение и трябва да бъдат определени и валидирани от потребителя.
- G. Минималният размер на пробите за един цикъл е осем.
- H. Комплектът AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex - 96 (Кат. № ALL-FAST11LF) не е тестван с помощта на протокол, който се различава от описания по-горе и може да доведе до грешни резултати.
- I. HLA типизирането при висока разрешителна способност с NGS технологията е комплексен процес, който изисква квалифициран персонал за преглеждане на данните и финално определяне на алелите на HLA.
- J. Този тест не трябва да се използва като единствена база за вземане на клинично решение.
- K. Вижте „Ограничения на разрешителната способност на AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex Kit - 96 – списък на неопределеностите“, за да се запознаете със списък на специфичните за партида неопределености при присвояване на алели за полиморфизми, разположени извън амплифицирания регион. Всеки посочен алел може да доведе до неверни резултати и трябва да бъде оценен, преди да се даде резултат.

- AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex Kit - 96 е проектиран за откриване на DRB4*03:01N и DQB1*03:276N посредством TypeStream Visual 2.1 или по-нова версия.
- L. Неопределености за генотипа се очакват от ограничението в дизайна на праймера и хетерозиготното генотипно фазиране поради ограничения в дължината на прочитане на секвениране и свързаното изравняване на секвенции.
- M. AllType FASTplex 11 Loci Primer Flex Mix за праймерите HLA-DRB1, -DQB1 и -DPB1 не амплифицират екзон 1. AllType FASTplex Exon 1 Primer Flex Mix трябва да се използва за разрешаване на неопределеностите за екзон 1 за тези гени. Когато се използва AllType FASTplex 11 Loci Exon 1 Primer Flex Mix с нискокачествена или силно фрагментирана ДНК, потребителите може да получат слаба информативност от прочитанията на секвенциите.
- N. В редки случаи неизвестни варианти на секвенция в местата за свързване на праймер за амплификация в нетранслираните региони (UTR) могат да повлияят на ефективността на амплификацията на реактивите за молекулярно типизиране, изброени по-горе. Хомозиготното типизиране трябва да бъде потвърдено чрез втори метод, преди да се присвои резултат.
- O. Праймерните смеси AllType FASTplex са тествани с алели, идентифицирани в списъка с номенклатурите в скоби в Индекс 4 за AllType (напр. A*01:01^[1234]). Реактивността на алелите, които не са били налични, е предвидена от наличната секвенция и може да доведе до фалшиви реакции и трябва да бъде оценена, преди да се присвои резултат.
- P. Праймерните смеси AllType FASTplex са тествани само на базата на Поле-3 (6-цифрени HLA типове). Няма заявени характеристики извън това поле.
- Q. Софтуерният анализ за този комплект се поддържа само с TypeStream Visual NGS Analysis Software 2.0.1 или по-нова версия, като се използва каталожния файл на комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex Kit. Употребата на друг софтуер не се поддържа.
- R. За ограничения, специфични за партидата, прегледайте каталожния файл на TSV.
- S. Ако всички инструкции не се прочетат изцяло и не се спазят изрично, може да се получат невалидни резултати от теста, увреждане на продукта(ите), нараняване на хора, включително на потребители или други, и щети на друго имущество. One Lambda, Inc. не поема никаква отговорност, произтичаща от неправилно използване на продукта(ите), описани тук (включително части от тях или софтуер).

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

Амплифициране на проба

Очаква се комплектът AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex да амплифицира и продуцира специфични за HLA локус продукти от амплификация, състоящи се от ~5000 базови двойки със средна дължина (може да има промяна при различни партии). Силно се препоръчва физическо разделяне и наблюдение на замърсяването в лаборатория и оборудване за предварителна амплификация. Ампликоните на екзон 1 ще бъдат в интервала 1,6 - 2,2 kb. Дисбаланс на екзона и по-високи прочитания на екзон 1 могат да възникнат при тестване с праймерна смес Exon 1. Това не оказва влияние върху резултатите от типизирането или отпаданията.

Подготовка на библиотеки

Указанията, предоставени в тези инструкции за употреба, са валидирани за създаване на финална съвместима със секвенции маркирана с баркод библиотека чрез амплифицирана ДНК от комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex Kit за финалната концентрация от 2,1 ng/μl, 0,53 ng/μl и 0,056 ng/μl за системи за секвениране Illumina MiSeq, MiniSeq и iSeq, съответно. Очакваната финална концентрация на библиотеката е 10 ng/μl или повече, измерена в [АМПЛИФИКАЦИЯ НА БИБЛИОТЕКАТА, Част 3, стъпка 19](#). Библиотека с по-ниска концентрация може да покаже неправилно или двусмислено типизиране поради по-ниски показания. Спецификацията на входната проба и процедурите, описани в тези инструкции за употреба, са валидирани за създаване на библиотека, която отговаря на целевия размер на фрагмента от 250 bp до 2500 bp с режим от 650 до 950 bp.

Секвениране на ДНК

Комплектът AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex Kit е валидиран посредством 96 проби за един цикъл на секвениране, за да се гарантира минимална средна дълбочина на прочитането за 50 прочитания или повече за един алел, когато се използва комплект Illumina MiSeq Reagent Kit V2 с производителност 2x150 bp (300 цикъла), 24 проби с комплект V2 Micro Reagent Kit и 8 проби с комплект V2 Nano Reagent Kit. Деветдесет и шест (96) проби са валидирани за MiniSeq High Output Kit и 72 проби за MiniSeq Mid Output Kit. Двадесет и четири проби са валидирани за комплекта iSeq 100 i1 Reagent V2. Алтернативна производителност за комплект на цикъл не се поддържат от това приложение и трябва да бъдат определени и валидирани от потребителя.

Следните показатели за секвениране в доклада на Illumina BaseSpace Sequencing Hub са валидирани за получаване на надеждни резултати от HLA типизиране за цикъл за 96 проби. %Q30 прочитания е броят на прочитанията, който отговаря на филтрите на QC на секвенатора и е добър показател за оценка, ако цикълът даде достатъчно прочитания. Средната дължина на прочитанията показва дали последователните прочитания отговарят на минималната дължина, необходима за фазиране на секвенцията за типизиране с висока разделителна способност. %CV на прочитания, идентифицирани (PF) за индекс показва дали библиотеката съдържа четен брой прочитания за всяка проба. Висок %CV с проби със значително по-малко прочитания показва въвеждане или нормализация на лоша проба, които може да доведат до проблеми с типизирането, специфични за пробата. Отклонението на един показател не означава непременно грешка в секвенирането. Комбинация от нисък общ брой прочитания и висок %CV на баланса на прочитания за баркод поради множество проби с малко прочитания или малка дължина на прочитанията може да доведе до нееднозначно или неправилно типизиране поради недостатъчно прочитания.

Показатели за QC за секвениране:

- %Q30 прочитания: $\geq 70\%$ за MiSeq и MiniSeq, $> 60\%$ за iSeq
- Средна дължина на прочитане: ≥ 130 бази
- %CV на прочитания, идентифицирани (PF) за индекс: $\leq 30\%$ без проби с прекомерно ниски прочитания

СПЕЦИФИЧНИ РАБОТНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Работните характеристики на комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex Kit са проучени при вътрешно тестване за верификация, описано по-долу.

Вътрешната верификация тества ефективността на комплекта AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex, като използва шест категории тестове, включително за точност, прецизност (възпроизводимост и повторяемост), диапазон на измерване, подготовка на пробата и интерфериращо вещество. Резултати от тези тестове показаха, че когато се използва в съответствие с тези инструкции за употреба продуктът AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex Kit дава точни и с висока разрешителна способност на Поле 3 (6-цифрени) резултати за HLA типизиране, които имат възпроизводимост и повторяемост между операторите и в три отделни производствени партиди.

Точността/верността на измерването беше установена спрямо добре характеризирани ДНК панели. 320 ДНК проби са секвенирани на 3 различни платформи за секвениране. AllType FASTplex NGS 11 Loci Flex Kit – 96 отговаря на критериите за приемливост 95% или по-високо съответствие на Illumina MiSeq Standard, Micro и Nano v2 проточни клетки; комплекти MiniSeq Mid и High Output и платформите за секвениране iSeq 100, като средната съгласуваност на всеки тест е 99,2% при използване на разделителна способност на Поле-3 (6 цифри) на базата на метода на LB Clopper-Pearson. Несъответстващите определяния се дължат на ограничена резолюция на референтния тип и грешка на лаборанта.

Повторяемостта и възпроизводимостта бяха установени чрез определяне на променливостта между партидите, като са използвани няколко партиди в рамките на един цикъл, между отделни цикли, оператор, дни и секвенатори. Проучванията показват, че анализът може да издържи на вариации, когато се следва протоколът за анализ, както е описан в тази Инструкция за употреба.

Устойчивостта на продукта беше демонстрирана и при подготовката на пробата, тестовите за интерфериращи вещества в диапазона на измерване, които показаха, че ефективността на продукта не е повлияна.

Проучванията за подготовка на пробите са проведени с два биологични източника (кръв и натривки от букална лигавица) с три различни метода на екстракция на ДНК, заключенията от проучванията са, че очакваното съответствие е постигнато.

Диапазонът на измерване на анализа беше тестван при четири концентрации на ДНК, като показва, че допустимата входна концентрация на ДНК е 3 ng/μl и 50 ng/μl с оптимална концентрация от 25 ng/μl.

Тестът за интерфериращи вещества демонстрира, че наличието на често откривани фактори в кръвния серум или потенциален PCR инхибитор (при тестваната концентрация) не повлиява ефективността на комплекта AllType FASTplex NGS 11-Loci Flex.

Подробности за теста – Точност за MiSeq, MiniSeq и iSeq

Общ брой на тестваните проби	Брой на анализите	Брой на потребителите	Брой на определянията без алели	Брой на несъответстващи определяния на алели	Общ брой на определяния на алели	% съответствие	% съответствие по LB Clopper-Pearson
730	22	4	2	10	13 108	99,9%	99,8%

Подробности за теста – Прецизност за MiSeq, MiniSeq и iSeq

Категория на тест	Брой проби в анализ	Брой на анализите	Брой на потребителите	Брой на определянията без алели	Брой на несъответстващи определяния на алели	Общ брой на определяния на алели	% съответствие
Възпроизводимост	48	15	3	3	9	12 900	99,8%
Повторяемост	24	9	1	0	0	3 888	100%

ИНФОРМАЦИЯ ЗА КОНТАКТ

Производител



One Lambda, Inc.
22801 Roscoe Blvd, West Hills, CA 91304, САЩ
Тел.: 747.494.1000 | Факс: 747.494.1001

Техническа помощ

За технически въпроси или обслужване на клиенти, моля, свържете се с:

Отдела за техническо обслужване на One Lambda

Северна Америка: + 1 747-494-1000 вътр. #2 (PST)

Безплатен номер за Северна Америка: +1 800-822-8824 вътр. #2 (PST)

Международен номер: +49 3302883-426 (CET)

Международен безплатен номер: 00800 6200 0000 (CET)

Уеб адрес: www.onelambda.com имейл: 1lambda-TechSupport@thermofisher.com

ИЗВЕСТИЯ ЗА СЕРИОЗЕН ИНЦИДЕНТ

Ако потребителят установи някакъв сериозен инцидент, възникнал във връзка с това in vitro медицинско изделие, той трябва да докладва за сериозния инцидент на производителя, местната регулаторна агенция и компетентния орган на държавата членка, в която е установен потребителят.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1: Референтни насоки за PCR програма

Следва списък на PCR програмите за анализите:

A. HLA 11-Loci Amplification Illumina Program:

Температура	Време	Цикъл
94°C	2 мин	1
98°C	10 сек	30
69°C	3 мин	
4°C	ЗАДЪРЖАНЕ	1

Скорост на емуляция 9600 и поставен нагревателен капак

B. TAG Program: 55°C за 15 мин., 25°C задържане, поставен нагревателен капак

C. STOP Program: 68°C за 10 мин., 25°C задържане, поставен нагревателен капак

D. FASTplex Illumina Library Amplification Program:

Температура	Време	Цикъл
72°C	10 мин	1
98°C	3 мин	1
98°C	15 сек	12
64°C	30 сек	
72°C	1 мин	
72°C	5 мин	1
4°C	ЗАДЪРЖАНЕ	1

Скорост на емуляция 9600 и поставен нагревателен капак

Приложение 2: Работен лист за FASTplex Sample Flex Plate 96

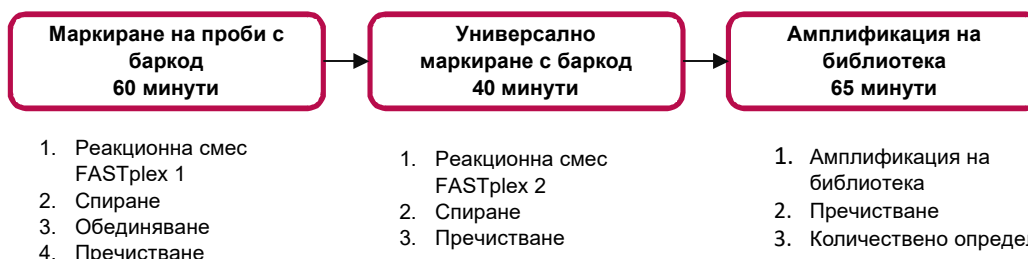
И	Г	Е	Ш	Д	С	В	А	
								1
								2
								3
								4
								5
								6
								7
								8
								9
								10
								11
								12

Фигура 2. FASTplex Sample Flex Plate 96

Приложение 3: Бърза справка (Вижте инструкциите за употреба за повече подробности.)

Illumina – Бърз справочник за AllType FASTplex NGS Assay

- След амплифициране на ДНК проба пречистете с магнитни перли и измерете концентрацията със стандартен протокол Qubit.
- Въведете стойностите за Qubit в TSV NGS Calculator. Разрежете ампликоните с FASTplex DNA Suspension Buffer от комплекта, както е посочено.
- Разредените ампликони са готови за подготовка на библиотеки



Забележка: Преди да започнете, размразете реактивите и ги съхранявайте върху лед. Поставете FASTplex Paramagnetic Beads при стайна температура за поне 30 минути. Уверете се, че в буфера НЯМА кристали

ВАЖНО: Използвайте само FASTplex DNA Suspension Buffer

Стъпки за маркиране на проби с баркод:

- Центрофугируйте FASTplex Sample Plate и прехвърлете **6 µl** от реактива за маркиране с баркод в прясна плака
- Добавете **4 µl** разреден ампликон и смесете с пипета 10 пъти
- Добавете **5 µl** FASTplex Barcoding Buffer и смесете с пипета 10 пъти
- Запечатайте плаката и центрофугируйте пулсово. Стартирайте FASTplex **TAG program**.
- Добавете **7,5 µl** FASTplex Stop Solution и смесете с пипета 5 пъти.
- Запечатайте плаката и центрофугируйте пулсово. Стартирайте FASTplex **STOP program**.
- Обединете **10 µl** от всяка ямка с реакционна смес за маркиране на проби с баркод.
- Изпълнете пречистване на проби с баркод (SB) след TSV NGS Calculator
- Елуируйте обема на буфера за суспензия на ДНК **в съответствие с** TSV NGS Calculator.
- Прехвърлете **48 µl** от пречистения SB пул в PCR епруветка с обем 0,2 ml

Стъпки за универсално маркиране с баркод:

- Добавете **4 µl** от реактива FASTplex Univ Barcode Flex A в 48 µl от пречистен SB пул
- Добавете **26 µl** FASTplex Barcoding Buffer, смесете с пипетиране и пулсово центрофугируйте. Стартирайте FASTplex **TAG program**.
- Добавете **39 µl** FASTplex Stop Solution, смесете с пипетиране и пулсово центрофугируйте. Стартирайте FASTplex **STOP program**.
- Изпълнете пречистване на реакционна смес за универсално маркиране с баркод (UB) (1 еквивалентен обем)
- Елуируйте в **20 µl** FASTplex DNA Suspension Buffer
- Прехвърлете **17 µl** от пречистения UB пул в PCR епруветка с обем 0,2 ml

Стъпки за амплификация на библиотека:

- Добавете **8 µl** от FASTplex Library Primer Flex Mix към 17 µl от пречистен UB пул,
- Добавете **75 µl** FASTplex Library Amp Mix и пипетирайте за смесване
- Стартирайте FASTplex Illumina Library Amplification Program
- Разрежете библиотеката – **95 µl** библиотека към **105 µl** FASTplex DNA Suspension Buffer

- Изпълнете пречистване на библиотека със **160 µl** от FASTplex Paramagnetic Beads (0,8x еквивалентен обем)
- Елуируйте в **35 µl** FASTplex DNA Suspension Buffer
- Прехвърлете **33 µl** от финалната библиотека в епруветка 2 ml LoBind
- Разрежете финалната библиотека за зареждане в секвенатора: Miseq 2,1 ng/µl, MiniSeq 0,53 ng/µl и iSeq 0,056 ng/µl

БИБЛИОГРАФИЯ

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*, Version 7.0 The European Federation for Immunogenetics, Strasbourg, France (2017)

ТЪРГОВСКИ МАРКИ

Всички търговски марки са собственост на Thermo Fisher Scientific и нейните дъщерни компании, освен ако не е посочено друго.

„Eppendorf“ и „LoBind“ са търговски марки на Eppendorf AG. „MiSeq“, „MiniSeq“ и „iSeq“ са търговски марки на Illumina, Inc.

ОТКАЗ ОТ ОТГОВОРНОСТ

Всички продукти на One Lambda са предназначени да подпомагат персонала с опит в анализа на човешкия левкоцитен антиген (HLA) чрез предлагане на резултати за типизиране или определяне на антитела. Всички резултати от тестове трябва да се прегледат внимателно от персонал с подходящата квалификация, за да се прецени правилността им.















Спецификациите, условията и ценообразуването подлежат на промяна. Не всички продукти се предлагат във всички държави. Моля, консултирайте се с местния търговски представител за подробности.

УПЪЛНОМОЩЕН ПРЕДСТАВИТЕЛ ЗА ЕВРОПА

 MDSS GmbH, Schiffgraben 41, 30175, Hannover, Германия

ОПИСАНИЕ НА СИМВОЛИТЕ




Справка EN ISO 15223-1: Медицински изделия – Символи, използвани в етикетите при етикетиране и в предоставяната информация за медицински изделия.

Символ	Описание	Символ	Описание
 ISO 7000 Рег. № 1641	Вижте в инструкциите за употреба. Индикаторът eIFU може да бъде URL адреса на уебсайта на производителя или друг подходяща индикация, че инструкциите за употреба са на разположение в електронен формат.	 ISO 7000 Рег. № 0518	Съдържа достатъчно материали за <n> теста
 ISO 7000 Рег. № 2493	Каталожен номер	 ISO 7000 Рег. № 3082	Производител
 ISO 7000 Рег. № 2493	Медицинско изделие за in vitro диагностика	 ISO 7000 Рег. № 2493	Оторизиран представител за Европейската общност
 ISO 7000 Рег. № 0434A	Внимание	 ISO 7000 Рег. № 2497	Дата на производство
 ISO 7000 Рег. № 0632	Температурно ограничение	 ISO 7000 Рег. № 2607	Да се използва до дата
 ISO 7000 Рег. № 0633	Горна граница на температурата	 ISO 7000 Рег. № 2492	Партиден код
Други символи			
 ISO 7000 Рег. № 0633	Дразнител (кожа, очи)	 ISO 7000 Рег. № 0633	Канцероген

Целта на полето за партида на етикета е проследяване на производствения процес.

За информация относно безопасността и ефективността се свържете с отдела по обслужване на клиенти на TDX.

ОПИСАНИЕ НА ПОЛЕЗНИ СИМВОЛИ

Икона	Описание
	Точка на безопасно спиране
	Забележка
	Полезен съвет

ИСТОРИЯ НА РЕВИЗИИТЕ

Ревизия	Дата на издаване	Описание на промяната
01	12 април 2022 г.	Първоначално пускане
02	Настояща	Коригирана е типографска грешка в Част 5 Miniseq секвениране – Подготвяне на библиотека с пулове 6 от 500 pM на 333 pM.

CE 0197



ThermoFisher
SCIENTIFIC

© 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. Всички права запазени. Всички търговски марки са собственост на Thermo Fisher Scientific и нейните дъщерни компании, освен ако не е посочено друго.

Спецификациите, условията и ценообразуването подлежат на промяна. Не всички продукти се предлагат във всички държави. Моля, консултирайте се с вашия местен търговски представител за подробности.

TDX-OLI-DMR-PS-4395, Ред. 02
Дата на издаване:

Стр. 57 от 57