

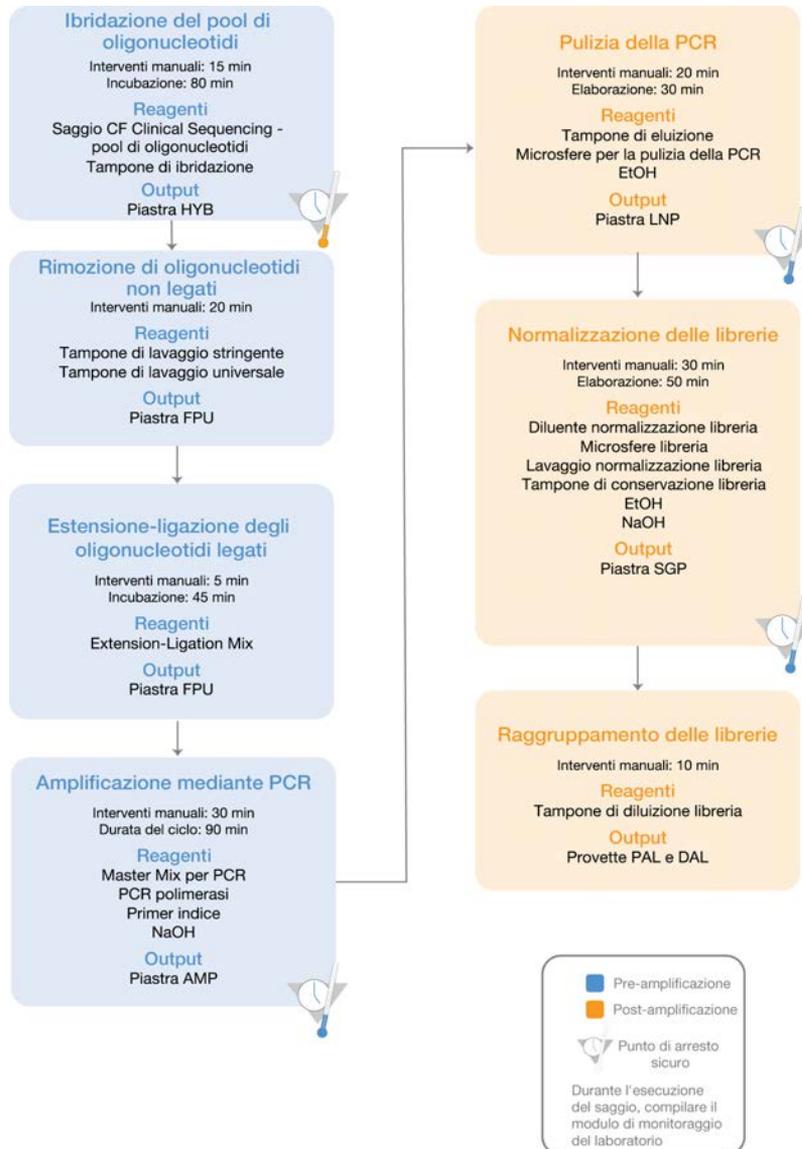
Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Data: _____
N. di lotto Kit Illumina: _____

Descrizione: _____



Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Materiali di consumo

Item	Numero di lotto
Saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi	N. di lotto: _____
Tampone di ibridazione	N. di lotto: _____
Tampone di lavaggio stringente	N. di lotto: _____
Tampone di lavaggio universale	N. di lotto: _____
Piastra filtro	N. di lotto: _____
Extension-Ligation Mix	N. di lotto: _____
Master Mix per PCR	N. di lotto: _____
PCR polimerasi	N. di lotto: _____
NaOH 0,05 N – Data di preparazione: _____	NaOH 10 N – N. di lotto: _____ Acqua priva di template – N. di lotto: _____
Tampone di eluizione	N. di lotto: _____
Microsfere per la pulizia della PCR	N. di lotto: _____
Etanolo all'80% – Data di preparazione: _____	Etanolo al 100% – N. di lotto: _____ Acqua priva di template – N. di lotto: _____
Diluente normalizzazione libreria	N. di lotto: _____
Microsfere libreria	N. di lotto: _____
Lavaggio normalizzazione libreria	N. di lotto: _____
Tampone di conservazione libreria	N. di lotto: _____
NaOH 0,1 N – Data di preparazione: _____	NaOH 10 N – N. di lotto: _____ Acqua priva di template – N. di lotto: _____
Tampone di diluizione libreria	N. di lotto: _____
Campione di controllo interno PhiX da 10 nM	N. di lotto: _____
Tampone TE	N. di lotto: _____
Cartuccia di reagenti MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing	N. di lotto: _____
Cella a flusso MiSeqDx - saggio CF Clinical Sequencing	N. di lotto: _____
Soluzione SBS MiSeqDx (PR2) - saggio CF Clinical Sequencing	N. di lotto: _____

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Primer indice

Primer indice C (A503) N. di lotto: _____	Primer indice 1 (A701) N. di lotto: _____
Primer indice D (A504) N. di lotto: _____	Primer indice 2 (A702) N. di lotto: _____
Primer indice E (A505) N. di lotto: _____	Primer indice 10 (A710) N. di lotto: _____

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Acronimi

Tabella 1 Acronimi del saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing Illumina

Acronimo	Definizione
AMP	Piastra di amplificazione
CLP	Piastra di pulizia
DAL	Libreria di ampliconi diluita
FPU	Unità piastra filtro
HYB	Piastra di ibridazione
LNP	Piastra di normalizzazione della libreria
NTC	Controllo senza template
PAL	Libreria di ampliconi raggruppati in pool
SGP	Piastra di conservazione

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Ibridazione del pool di oligonucleotidi

Questo passaggio consiste nell'ibridazione del pool di oligonucleotidi per la fibrosi cistica contenente a monte e a valle oligonucleotidi specifici del gene regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR) con campioni di DNA genomico.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 1 ora e 35 minuti
- ▶ Interventi manuali: 15 minuti

Preparazione

- 1 Portare il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi, il tampone di ibridazione, i campioni di DNA genomico e il campione di controllo positivo a temperatura ambiente.
- 2 Agitare energicamente il saggio CF Clinical Sequencing - pool di oligonucleotidi e il tampone di ibridazione per accertarsi che tutti i precipitati si sciolgano completamente, quindi centrifugare brevemente le provette per recuperare il liquido.
- 3 Impostare un blocco termico per piastra a 96 pozzetti su 95 °C.
- 4 Preriscaldare un incubatore a 37 °C.
- 5 Creare la piastra campioni in base all'immagine stampata da Illumina Worklist Manager o Local Run Manager.
Nome del foglio campioni: _____
oppure
Nome della corsa (Local Run Manager): _____

Procedura

- 1 Preparare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti (di seguito definita piastra **HYB**).
ID piastra: _____
- 2 Dispensare 5 µl di campione o campione di controllo a 50 ng/µl (250 ng totali) nei pozzetti appropriati nella piastra **HYB**. Seguire il layout della piastra generato per la corretta selezione dei pozzetti.
- 3 Aggiungere 5 µl del pool di oligonucleotidi del saggio CF Clinical Sequencing a tutti i pozzetti dei campioni.
- 4 Dispensare 40 µl di tampone di ibridazione in ogni pozzetto contenente il campione sulla piastra **HYB**. Pipettare delicatamente su e giù 3-5 volte per miscelare.
- 5 Sigillare la piastra **HYB** e centrifugare 1.000 × g a 20 °C per 1 minuto.
- 6 Inserire la piastra **HYB** nel blocco preriscaldato a 95 °C e incubare per 1 minuto.

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

- 7 Ridurre la temperatura del blocco termico a 40 °C e continuare a incubare fino a quando il blocco termico raggiunge 40 °C (circa 80 minuti).
Il raffreddamento graduale è essenziale per un'ibridazione corretta; pertanto, per questo processo non si consigliano termociclatori per PCR con raffreddamento attivo (ad es., Peltier, raffreddato termoelettricamente).

Ora d'inizio: _____

Ora di arresto: _____



PUNTO DI ARRESTO SICURO

Quando il blocco termico raggiunge i 40 °C, la piastra **HYB** è stabile a una temperatura di 40 °C per due ore.

Commenti

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Rimozione di oligonucleotidi non legati

Questo processo consiste nella rimozione di oligonucleotidi non legati dal DNA genomico mediante un filtro in grado di selezionare le dimensioni. Due fasi di lavaggio con il tampone di lavaggio stringente garantiscono la rimozione completa degli oligonucleotidi non legati. Una terza fase di lavaggio con il tampone di lavaggio universale rimuove i residui di tampone di lavaggio stringente e prepara i campioni per la fase di estensione-ligazione.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 20 minuti
- ▶ Interventi manuali: 20 minuti

Preparazione

- 1 Portare la miscela di estensione-ligazione, il tampone di lavaggio stringente e il tampone di lavaggio universale a temperatura ambiente, quindi agitare brevemente.
- 2 Assemblare l'unità piastra filtro (di seguito definita **FPU**) nell'ordine dall'alto verso il basso: coperchio, piastra filtro, colletto adattatore e piastra MIDI.
ID piastra filtro: _____
- 3 Pre-lavare la membrana della piastra filtro come segue:
 - a Dispensare 45 µl di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto.
 - b Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 × g a 20 °C per 5 minuti.



NOTA

Verificare che tutti i pozzetti della piastra filtro siano completamente drenati. Se il tampone di lavaggio non fa defluire tutto il liquido, centrifugare di nuovo a 2.400 × g a 20 °C finché tutto il liquido non viene espulso (ulteriori 5-10 minuti).



ATTENZIONE

Durante le fasi di lavaggio è fondamentale controllare la temperatura della centrifuga. Se la temperatura raggiunge i 25 °C, o una temperatura maggiore, questa potrebbe provocare un legame dei primer più stringente. In casi rari, se i campioni presentano varianti di singolo nucleotide (Single Nucleotide Variant, SNV) nelle regioni di legame dei primer, la maggiore rigidità potrebbe portare a una perdita di alleli.

Procedura

- 1 Estrarre la piastra **HYB** dal blocco termico e centrifugare a 1.000 × g a 20 °C per 1 minuto.
- 2 Trasferire tutto il volume di ciascun campione (circa 55 µl) nei corrispondenti pozzetti della piastra filtro.
- 3 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 × g a 20 °C per 5 minuti.
- 4 Lavare la piastra filtro come segue:
 - a Dispensare 45 µl di tampone di lavaggio stringente in ciascun pozzetto contenente il campione.
 - b Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 × g a 20 °C per 5 minuti.
- 5 Ripetere il lavaggio come descritto nella fase precedente.

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____



NOTA

Se il tampone di lavaggio non fa defluire tutto il liquido, centrifugare di nuovo a $2.400 \times g$ a $20^\circ C$ finché tutto il liquido non viene espulso (ulteriori 5-10 minuti).

- 6 Smaltire tutto il materiale defluito (contenente formammide), quindi riassemblare la piastra **FPU**.
- 7 Dispensare $45 \mu l$ di tampone di lavaggio universale in ogni pozzetto contenente il campione.
- 8 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a $2.400 \times g$ a $20^\circ C$ per 10 minuti.



NOTA

Accertarsi che tutto il liquido sia defluito dopo la centrifugazione. Ripetere la centrifugazione se necessario.

Commenti

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Estensione-ligazione degli oligonucleotidi legati

Questo processo collega gli oligonucleotidi ibridati a monte e a valle. Una DNA polimerasi si estende dall'oligonucleotide a monte fino alla regione target e successivamente si lega all'estremità 5' dell'oligonucleotide a valle mediante una DNA ligasi. Il risultato consiste nella formazione di prodotti contenenti le regioni di interesse target affiancate da sequenze necessarie per l'amplificazione.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 50 minuti
- ▶ Interventi manuali: 5 minuti

Procedura

- 1 Dispensare 45 µl di Extension-Ligation Mix in ogni pozzetto contenente il campione della piastra filtro.
- 2 Sigillare la piastra filtro con un foglio di alluminio adesivo e quindi coprire con il coperchio.
- 3 Incubare l'unità **FPU** nell'incubatore preriscaldato a 37 °C per 45 minuti.
Ora d'inizio: _____ Ora di arresto: _____
- 4 Durante l'incubazione della piastra **FPU**, preparare l'AMP (piastra di amplificazione) come descritto nella prossima sezione.

Commenti

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Amplificazione mediante PCR

Questo passaggio consiste nell'amplificazione dei prodotti del processo di estensione-ligazione mediante primer che aggiungono sequenze d'indici per il multiplex campioni, oltre a comuni adattatori necessari per la generazione di cluster.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: circa 90 minuti
- ▶ Interventi manuali: 30 minuti

Preparazione

- 1 Preparare una nuova soluzione di NaOH 0,05 N.
- 2 Determinare i primer indice da utilizzare in base alla stampa dello schema della piastra di Illumina Worklist Manager o Local Run Manager.
- 3 Portare Master Mix per PCR e i primer indice appropriati a temperatura ambiente. Inserire in un agitatore ogni provetta scongelata per miscelare e quindi centrifugare brevemente le provette.
- 4 Preparare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti (di seguito definita piastra **AMP**).
- 5 Dispensare i primer indice sulla piastra **AMP** in base al foglio campioni come segue:
 - a Dispensare 4 µl dei primer indice C (A503), D (A504) e E (A505) nei pozzetti appropriati in una colonna della piastra **AMP**.
 - b Smaltire i tappi bianchi originali e applicare tappi bianchi nuovi.
 - c Dispensare 4 µl dei primer indice selezionati 1 (A701), 2 (A702) e 10 (A710) nei pozzetti appropriati in una riga della piastra **AMP**. *Le punte devono essere sostituite dopo ogni riga per evitare la contaminazione incrociata.*
 - d Smaltire i tappi arancioni originali e applicare tappi arancioni nuovi.
- 6 Preparare la soluzione di lavoro per la PCR con Master Mix per PCR/PCR polimerasi nel modo seguente:
 - a Centrifugare brevemente la provetta della polimerasi per PCR prima dell'utilizzo per rimuovere eventuali bolle d'aria.
 - b Dispensare 5,6 µl di PCR polimerasi a 280 µl di Master Mix per PCR.
 - c Capovolgere 20 volte la soluzione di lavoro preparata per la PCR per miscelarla.

Procedura

- 1 Rimuovere la piastra **FPU** dall'incubatore e rimuovere il sigillo in alluminio.
- 2 Coprire la piastra filtro con il coperchio e centrifugare a 2.400 × g a 20 °C per 2 minuti.
- 3 Dispensare 25 µl di 0,05 N di NaOH in ogni pozzetto di campione sulla piastra filtro. Pipettare NaOH su e giù 5-6 volte.
- 4 Coprire e incubare la piastra filtro a temperatura ambiente per 5 minuti.

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

- 5 Durante l'incubazione della piastra filtro, trasferire 22 µl della soluzione di lavoro per la PCR in ogni pozzetto della piastra AMP contenente i primer indice.
- 6 Trasferire i campioni eluiti dal filtro alla piastra AMP come segue:
 - a Pipettare i campioni nella prima colonna della piastra filtro su e giù 5-6 volte.
 - b Trasferire 20 µl dalla piastra filtro alla colonna corrispondente della piastra AMP.
 - c Pipettare delicatamente su e giù 5-6 volte per miscelare accuratamente il DNA con la soluzione di lavoro per la PCR.
 - d Trasferire le colonne restanti dalla piastra filtro alla piastra AMP in modo simile.
Le punte devono essere sostituite dopo ogni colonna per evitare la contaminazione incrociata.
- 7 Sigillare la piastra AMP e assicurarla con un rullo di gomma.
- 8 Centrifugare a 1.000 × g a 20 °C per 1 minuto.
- 9 Trasferire la piastra AMP nell'area di post-amplificazione.
- 10 Eseguire la PCR utilizzando il seguente programma su un termociclatore:
 - 95 °C per 3 minuti
 - 25 cicli di:
 - 95 °C per 30 secondi
 - 62 °C per 30 secondi
 - 72 °C per 60 secondi
 - 72 °C per 5 minuti
 - Mantenere la temperatura a 10 °C

Ora d'inizio: _____

Ora di arresto: _____



PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se non si procede immediatamente alla pulizia della PCR, la piastra AMP può restare sul termociclatore per la notte oppure può essere conservata a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di 48 ore.

Commenti

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Pulizia della PCR

Questo processo consiste nel purificare i prodotti della PCR dagli altri componenti della reazione mediante le microsfere per la pulizia della PCR.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 50 minuti
- ▶ Interventi manuali: 20 minuti

Preparazione

- 1 Portare le microsfere per la pulizia della PCR a temperatura ambiente.
- 2 Preparare al momento etanolo all'80% a partire dall'etanolo assoluto.

Procedura

- 1 Centrifugare la piastra AMP a $1.000 \times g$ a $20^\circ C$ per 1 minuto.
- 2 Preparare una nuova piastra MIDI (di seguito definita piastra **CLP**).
ID piastra: _____
- 3 Capovolgere le microsfere per la pulizia della PCR 10 volte. Agitare energicamente e quindi capovolgere altre 10 volte. Controllare visivamente la soluzione per assicurarsi che le microsfere siano risospese.
- 4 Dispensare $45 \mu l$ di microsfere per la pulizia della PCR in ogni pozzetto della piastra **CLP**.
- 5 Trasferire l'intero prodotto della PCR dalla piastra AMP alla piastra **CLP**.
- 6 Sigillare la piastra **CLP** e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 rpm per 2 minuti.
- 7 Incubare a temperatura ambiente senza agitare per 10 minuti.
- 8 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o fino alla scomparsa del surnatante.
- 9 Lasciando la piastra **CLP** sul supporto magnetico, rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
- 10 Lasciando la piastra **CLP** sul supporto magnetico, lavare le microsfere nel modo seguente:
 - a Dispensare $200 \mu l$ di etanolo all'80% appena preparato in ogni pozzetto contenente il campione.
 - b Incubare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 30 secondi o finché il surnatante è limpido.
 - c Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
- 11 Ripetere il lavaggio come descritto nella fase precedente.
- 12 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su $20 \mu l$ per rimuovere l'eccesso di etanolo.

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

- 13 Rimuovere la piastra **CLP** dal supporto magnetico e asciugare all'aria le microsfere per 10 minuti.
Ora d'inizio: _____ Ora di arresto: _____
- 14 Aggiungere 30 µl di tampone di eluizione a ciascun campione.
- 15 Sigillare la piastra **CLP** e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 rpm per 2 minuti. Dopo aver agitato, controllare che i campioni siano risospesi. Altrimenti, ripetere questo passaggio.
- 16 Incubare a temperatura ambiente per 2 minuti.
- 17 Posizionare la piastra **CLP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.
- 18 Preparare una nuova piastra MIDI (di seguito definita piastra **LNP**).
ID piastra: _____
- 19 Trasferire 20 µl di surnatante dalla piastra **CLP** alla piastra **LNP**.
- 20 [Opzionale] Trasferire i restanti 10 µl di surnatante dalla piastra **CLP** su una nuova piastra ed etichettare la piastra con il nome della corsa e la data. Conservare questa piastra a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C fino al completamento della corsa di sequenziamento e analisi dei dati. I prodotti per PCR puliti possono essere usati per scopi di ricerca ed eliminazione guasti in caso di problemi a carico dei campioni.



PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se ci si ferma a questo punto, sigillare la piastra **LNP** e centrifugare a $1.000 \times g$ a 20 °C per 1 minuto. La piastra è stabile per un massimo di 3 ore a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Commenti

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Normalizzazione delle librerie

Questo processo consiste nel normalizzare la quantità di ciascuna libreria per garantirne una rappresentazione equilibrata nel pool di campioni.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 1 ora e 20 minuti
- ▶ Interventi manuali: 30 minuti

Preparazione

- 1 Preparare al momento NaOH 0,1 N aggiungendo 30 μ l di NaOH 10 N a 2.970 μ l di acqua priva di RNasi/DNasi.
- 2 Portare il diluente di normalizzazione della libreria, le microsfere della libreria e il lavaggio di normalizzazione della libreria a temperatura ambiente.
- 3 Agitare energicamente il diluente di normalizzazione della libreria e verificare che tutti i precipitati si sciolgano.
- 4 Agitare le microsfere della libreria energicamente per 1 minuto con inversione intermittente fino a risospensione delle microsfere e assenza di pellet sul fondo della provetta quando quest'ultima viene capovolta.

Procedura

- 1 Miscelare il diluente di normalizzazione della libreria e le microsfere della libreria in una nuova provetta da 1,5 ml come segue:
 - a Dispensare 394 μ l di diluente di normalizzazione della libreria.
 - b Risospendere le microsfere della libreria pipettando su e giù 10 volte.
 -  **NOTA**
È fondamentale risospendere completamente il pellet delle microsfere della libreria in fondo alla provetta. L'uso di una provetta P1000 garantisce che le microsfere vengano risospese in modo omogeneo e che non ci sia massa di microsfere sul fondo della provetta. Questo è fondamentale per ottenere una densità cluster omogenea sulla cella a flusso.
 - c Pipettare 72 μ l di microsfere della libreria nella provetta contenente il diluente di normalizzazione della libreria.
 - d Miscelare capovolgendo la provetta 15-20 volte.
- 2 Dispensare 45 μ l di soluzione di lavoro contenente diluente di normalizzazione della libreria e microsfere della libreria in ciascun pozzetto della piastra **LNP** contenente le librerie.
- 3 Sigillare la piastra **LNP** e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 rpm per 30 minuti.

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____



NOTA

Se lo stesso giorno si procede con il sequenziamento, questo è un buon momento per iniziare lo scongelamento della cartuccia di reagenti. Attenersi alle istruzioni relative allo scongelamento della cartuccia di reagenti MiSeqDx contenute nella sezione *Preparazione della cartuccia di reagenti* a pagina 17.

Ora d'inizio: _____ Ora di arresto: _____

- 4 Posizionare la piastra su un supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o fino alla scomparsa del surnatante.
- 5 Lasciando la piastra **LNP** sul supporto magnetico, rimuovere attentamente il surnatante e smaltirlo.
- 6 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e lavare le microsfere con il lavaggio di normalizzazione della libreria nel modo seguente:
 - a Dispensare 45 µl di lavaggio di normalizzazione della libreria in ciascun pozzetto contenente il campione.
 - b Sigillare la piastra **LNP** e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.
 - c Posizionare la piastra sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti o finché il surnatante è limpido.
 - d Rimuovere attentamente e smaltire il surnatante.
- 7 Ripetere la procedura del lavaggio di normalizzazione della libreria come descritto nella fase precedente.
- 8 Utilizzare una pipetta multicanale P20 impostata su 20 µl per rimuovere l'eccesso di lavaggio di normalizzazione della libreria.
- 9 Rimuovere la piastra **LNP** dal supporto magnetico e dispensare 30 µl di NaOH 0,1 N in ciascun pozzetto.
- 10 Sigillare la piastra **LNP** e agitare su uno shaker per micropiastre a 1.800 rpm per 5 minuti.
- 11 Durante l'eluizione di 5 minuti, impostare una nuova piastra PCR a 96 pozzetti (di seguito definita piastra **SGP**).
ID piastra: _____
- 12 Dispensare 30 µl di tampone di conservazione della libreria in ciascun pozzetto da usare nella piastra **SGP**.
- 13 Dopo l'eluizione di 5 minuti, assicurarsi che tutti i campioni nella piastra **LNP** siano completamente risospesi. Se i campioni non sono completamente risospesi, pipettare delicatamente i campioni su e giù oppure battere delicatamente la piastra sul banco per risospingere le microsfere, quindi agitare per altri 5 minuti.
- 14 Posizionare la piastra **LNP** sul supporto magnetico per un minimo di 2 minuti.
- 15 Trasferire il surnatante dalla piastra **LNP** alla piastra **SGP**. Pipettare delicatamente su e giù 5 volte per miscelare.
- 16 Sigillare la piastra **SGP** e centrifugare a 1.000 × g a 20 °C per 1 minuto.



PUNTO DI ARRESTO SICURO

Qualora non si proceda immediatamente alla creazione di un pool di librerie e al successivo sequenziamento su MiSeqDx, conservare la piastra **SGP** sigillata tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 3 giorni.

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Commenti

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Raggruppamento delle librerie

In preparazione per generazione di cluster e sequenziamento, volumi uguali di librerie normalizzate vengono combinati, diluiti nel tampone di ibridazione, e denaturati mediante calore prima del sequenziamento con MiSeqDx. Il campione di controllo PhiX è usato a fini di verifica interna per il sequenziamento.

Durata stimata

- ▶ Durata totale: 10 minuti
- ▶ Interventi manuali: 10 minuti

Preparazione del pooling delle librerie

- 1 Predisporre un blocco termico adatto a centrifugare provette da 1,5 ml a 96 °C.
- 2 In un portaghiaccio, preparare un bagno d'acqua e ghiaccio. Raffreddare il tampone di diluizione libreria nel bagno d'acqua e ghiaccio.
- 3 Cominciare a scongelare la cartuccia di reagenti MiSeqDx.

Preparazione della cartuccia di reagenti

- 1 Scongelare la cartuccia di reagenti MiSeqDx - Saggio CF Clinical Sequencing in un bagno d'acqua contenente abbastanza acqua da laboratorio a temperatura ambiente da consentire l'immersione della base della cartuccia di reagenti fino alla linea di livello acqua stampata sulla cartuccia stessa. Evitare che l'acqua superi la linea di massimo livello acqua.
- 2 Lasciare la cartuccia di reagenti a scongelare nel bagno d'acqua a temperatura ambiente per circa un'ora o fino a scongelamento.
- 3 Rimuovere la cartuccia dal bagno d'acqua e picchiettarla delicatamente sul banco per far fuoriuscire l'acqua in eccesso dalla base. Asciugare la base della cartuccia. Verificare che sulla parte superiore della cartuccia di reagenti non sia caduta dell'acqua.

Ispezione della cartuccia di reagenti

- 1 Capovolgere la cartuccia dieci volte per miscelare i reagenti scongelati, quindi ispezionare tutte le posizioni per accertarsi che siano scongelate.
 **NOTA**
È fondamentale che i reagenti nella cartuccia siano scongelati completamente e miscelati per assicurare il sequenziamento corretto.
- 2 Ispezionare i reagenti nelle posizioni 1, 2 e 4 per accertarsi che siano ben miscelati e privi di precipitati.
- 3 Picchiettare delicatamente la cartuccia sul banco per ridurre le bolle d'aria nei reagenti.
 **NOTA**
I tubi dei pescanti di MiSeqDx vanno fino al fondo di ciascun serbatoio per aspirare i reagenti, per questa ragione è importante che i serbatoi non contengano bolle d'aria.

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

- 4 Riporre la cartuccia in ghiaccio o conservarla a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C (fino a sei ore) finché non si è pronti a impostare la corsa. Per risultati ottimali, procedere direttamente caricando il campione e impostando la corsa.

Denaturazione e diluizione del campione di controllo interno PhiX

- 1 Preparare 0,1 N di NaOH combinando i seguenti volumi in una provetta conica:
- Acqua priva di DNasi/RNasi (2.475 µl)
 - 10 N di NaOH standard (25 µl)
- 2 Capovolgere la provetta diverse volte per miscelare.
-  **ATTENZIONE**
L'utilizzo di una soluzione di NaOH diluito subito prima dell'operazione è essenziale per denaturare completamente i campioni in vista della generazione di cluster su MiSeqDx.
-  **NOTA**
Se il campione di controllo PhiX viene preparato lo stesso giorno della normalizzazione della libreria, può essere utilizzata la stessa quantità di 0,1 N di NaOH standard.
- 3 Combinare i seguenti volumi per diluire la libreria del campione di controllo interno PhiX a 2 nM:
- 10 nM di libreria del campione di controllo interno PhiX (2 µl)
 - 1X di tampone TE (8 µl)
- 4 Combinare i seguenti volumi per ottenere una libreria del campione di controllo interno PhiX da 1 nM:
- 2 nM di libreria del campione di controllo interno PhiX (10 µl)
 - 0,1 N di NaOH (10 µl)
- 5 Agitare brevemente per miscelare la soluzione della libreria del campione di controllo interno PhiX da 1 nM.
- 6 Centrifugare il campione di controllo interno PhiX da 1 nM a 280 × g a 20 °C per un minuto.
- 7 Incubare per 5 minuti a temperatura ambiente per denaturare la soluzione della libreria del campione di controllo interno PhiX in filamenti singoli.
- 8 Combinare i seguenti volumi in una nuova provetta per microcentrifuga per ottenere una libreria del campione di controllo interno PhiX da 20 pM:
- Denaturare la libreria del campione di controllo interno PhiX (f2 µl)
 - Tampone di diluizione libreria pre-raffreddato (98 µl)
-  **NOTA**
La libreria del campione di controllo interno PhiX da 20 pM denaturata può essere conservata per un massimo di tre settimane a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C sotto forma di aliquote monouso.

Preparazione dei campioni per il sequenziamento

- 1 Portare il tampone di diluizione della libreria a temperatura ambiente. Agitare il tampone di diluizione della libreria e verificare che tutti i precipitati si siano completamente sciolti.
- 2 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, scongelarla a temperatura ambiente.
- 3 Centrifugare la piastra **SGP** a 1.000 × g a 20 °C per 1 minuto.

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

- 4 Predisporre una provetta Eppendorf nuova (di seguito definita provetta **PAL** [Pooled Amplicon Library, libreria di ampliconi raggruppati in pool]).
ID provetta: _____
- 5 Se la piastra **SGP** è stata conservata congelata, mescolare ciascuna libreria da sequenziare pipettando su e giù per 3-5 volte.
- 6 Trasferire 5 µl di ciascuna libreria da sequenziare dalla piastra **SGP** a una striscia a otto provette per PCR. Sigillare l'**SGP** con un sigillo adesivo per piastre e metterla da parte.
 **NOTA**
Dopo l'uso, conservare la piastra **SGP**, sigillata, fra -25 °C e -15 °C che rimarrà stabile, a tali condizioni, per un massimo di 3 giorni.
- 7 Combinare e trasferire il contenuto della striscia a otto provette per PCR nella provetta **PAL**. Miscelare energicamente la provetta **PAL** in un agitatore.
- 8 Predisporre una provetta Eppendorf nuova (di seguito definita provetta **DAL** [Libreria di ampliconi diluita] utilizzando un vortex).
ID provetta: _____
- 9 Dispensare 585 µl di tampone di diluizione della libreria nella provetta **DAL**.
- 10 Dispensare 6 µl di campione di controllo interno PhiX 20 pM nella provetta **DAL**. Pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurare che il trasferimento sia completo.
- 11 Trasferire 9 µl di **PAL** nella provetta **DAL** contenente il tampone di diluizione della libreria. Pipettare su e giù per 3-5 volte per sciacquare la punta e assicurarsi che il trasferimento sia completo.
- 12 Miscelare la provetta **DAL** in un agitatore vortex alla velocità più elevata.
- 13 Centrifugare la provetta **DAL** a 1.000 × g a 20 °C per 1 minuto.
- 14 Incubare la provetta **DAL** in un blocco termico a 96 °C per 2 minuti.
- 15 Dopo l'incubazione, capovolgere la provetta **DAL** 1-2 volte per mescolarla, quindi porla immediatamente in un bagno d'acqua e ghiaccio.
- 16 Tenere la provetta **DAL** nel bagno d'acqua e ghiaccio per 5 minuti.

Commenti

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Sequenziamento delle librerie

La cella a flusso viene lavata, asciugata e caricata in MiSeqDx, i campioni sono caricati sulla cartuccia di reagente, che a sua volta viene caricata su MiSeqDx, e la corsa di sequenziamento viene avviata. MiSeqDx effettua la generazione di cluster, il sequenziamento mediante sintesi e l'analisi dei dati.

Durata stimata

- ▶ Durata stimata del sequenziamento: ~27 ore
- ▶ Interventi manuali: ~5 minuti

Procedura

Per dettagli relativi alle fasi descritte qui, consultare la *Guida di consultazione dello strumento MiSeqDx (documento n. 15038353)*.

- 1 Utilizzare una punta per pipette da 1 ml, pulita e vuota, per forare il sigillo in alluminio sopra il serbatoio sulla cartuccia di MiSeqDx reagenti – saggio CF Clinical Sequencing contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Campioni di caricamento).
- 2 Pipettare 600 µl di librerie di campione DAL nel serbatoio contrassegnato con la dicitura **Load Samples** (Campioni di caricamento). Fare attenzione a evitare di toccare il sigillo durante l'erogazione del campione.
Una volta caricato il campione, verificare la presenza di bolle d'aria nel serbatoio. In caso di presenza di bolle d'aria, picchiettare delicatamente la cartuccia sul banco in modo da farle fuoriuscire.
- 3 Eseguire l'accesso a MiSeq Operating Software (MOS).
Numero di serie MiSeqDx: _____
Data dell'ultima manutenzione preventiva: _____
- 4 Selezionare **Sequence** (Sequenziamento).
Si aprirà una serie di schermate per l'impostazione della corsa.
- 5 Pulire la cella a flusso.
- 6 Caricare la cella a flusso.
- 7 Svuotare il flacone degli scarti e caricare la soluzione SBS MiSeqDx (PR2) - saggio CF Clinical Sequencing.
- 8 Caricare la cartuccia di reagenti.
- 9 Confermare le impostazioni della corsa e i risultati della verifica pre-corsa.
- 10 Avviare la corsa.
ID corsa: _____
- 11 Eseguire un lavaggio post-corsa.

Saggio MiSeqDx Cystic Fibrosis Clinical Sequencing

Modulo di monitoraggio del laboratorio

Data/ora: _____

Operatore: _____

Commenti



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Freddy van Riemsdijkweg 15
5657 EE Eindhoven
Paesi Bassi

Sponsor Australiano:
Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Australia