

VARIANTPlex™-HT Dx Liquid Reagents

Intended Use

For *in vitro* diagnostic use.

For professional use only.

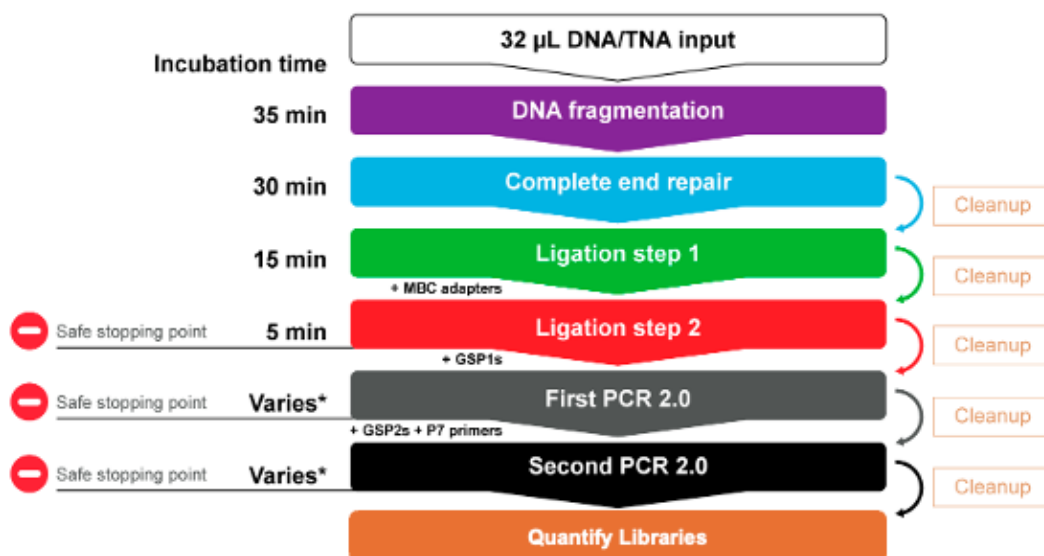
The VARIANTPlex™-HT Dx is a set of reagents and consumables used to prepare sample libraries, using manual or automated methods, from Nucleic Acid (DNA or TNA) extracted from fresh-frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue or cells. User-supplied oligonucleotide panels are required for the preparation of libraries targeting specific genomic regions of interest. The generated sample libraries incorporate P5 and P7 sequences for downstream use.

Summary and Principles of Procedure

Library preparation utilizing Anchored Multiplex PCR (AMP) is a rapid and scalable method to generate target-enriched libraries for NGS. AMP technology can be used for applications in targeted DNA sequencing to generate a sequencing library. Designed for low nucleic acid input, this process delivers robust performance.

AMP utilizes unidirectional gene-specific primers (GSPs) that enrich for both known and unknown mutations. Adapters that contain both molecular barcodes and sample indices permit quantitative multiplex data analysis, read deduplication, and accurate mutation calling.

Workflow Overview



* First and Second PCR times vary based on the specific GSP panel as well as individual lab cycling conditions. See Product Insert for more information.

Recommendations

- Read through the entire protocol before starting your library preparation.
- Take note of safe stopping points throughout the protocol where samples can be safely frozen (-30° C to -10° C) to plan your workflow.
- Wipe down workstation and pipettes with nuclease and nucleic acid cleaning products (e.g., RNase AWAY, Thermo Fisher Scientific).
- If utilizing 96-well plates, make sure they are nuclease free, wells are of sufficient volume and plate seals are sufficient to prevent moisture loss.

Warnings and Precautions

- Use good laboratory practices to prevent contamination of samples by PCR products.
- Use nuclease-free PCR tubes, microcentrifuge tubes, and aerosol-barrier pipette tips.

- Verify that the thermal cycler used for library preparation is in good working order and currently calibrated according to manufacturer specifications. When using a thermal cycler with a 100% ramp rate >6°C/sec, set the ramp rate to go no higher than 6°C/sec for First PCR and Second PCR.
- Ensure Reaction cleanup beads (used repeatedly throughout the workflow) are equilibrated to room temperature (20°C to 25°C) and fully resuspended prior to use.
- Ligation Step 2 Components are viscous and must be fully mixed prior to aliquoting.
- Do not use reagents beyond labeled expiry date.
- Immediately report any serious incidents related to this product to IDT and the Competent Authority or other local regulatory authority in which the user and the patient reside.

Limitations

- For *in vitro* diagnostic use.
- For use with input masses of 10 to 200ng
- The enzymes provided are sensitive to frequent temperature changes and potential freeze-thaw events.
- Enzymes will not freeze when stored at recommended storage temperature range but may freeze during shipment.
- For best results, it is recommended that you store the enzymes provided in a -20°C benchtop cooler box and use this to transport enzymes between workspaces and freezers.
- Enzyme components will remain stable for up to 5 freeze-thaw cycles without effecting the functionality.
- Buffers will freeze at recommended storage temperature and should be thawed on ice prior to use. For best results, Buffers should be aliquoted to appropriate batch sizes for single use with adequate overage, such that aliquots are not re-frozen after thawing. Input nucleic acid (DNA) in EDTA-free buffer (pH 7-8) or ultrapure water is the optimal starting template for AMP library preparation. Do NOT use EDTA-containing buffers.
- Contact technical support (archer-tech@idtdna.com) for commercially available extraction kit recommendations.
- Use the maximum allowable input mass (200 ng) whenever possible. Higher input quantities enable more sensitive variant detection.

Reagents Preparation

- The volumes shown below need to be increased if you are preparing more than 24 libraries.
- Make at least **10 mL** fresh 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 from 1M Tris-HCl, pH 8.0 and ultrapure water.
 - Mix **100 µL** 1M Tris-HCl, pH 8.0 with **9,900 µL** ultrapure water.
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 can be used for up to one week after mixing.
- Make at least **50 mL** fresh 70% ethanol from 100% ethanol and ultrapure water.
 - Add **35 mL** 100% ethanol to **15 mL** ultrapure water.
 - Tightly close the cap to minimize evaporation when not in use.
 - 70% ethanol is appropriate for use for up to one week after mixing.
- Make at least **1 mL** fresh 5 mM NaOH working stock from concentrated NaOH and ultrapure water.
 - If working from 1 M NaOH, add **5 µL** of 1 M NaOH to **995 µL** of ultrapure water to yield 5 mM final NaOH.
 - If working from 5 M, add **10 µL** of 5 M NaOH to **990 µL** of ultrapure water to yield 50 mM NaOH. Mix well and briefly spin down. Take **100 µL** of 50 mM NaOH and combine with **900 µL** of ultrapure water to yield 5 mM NaOH. Mix well and briefly spin down.

Product Components

The VARIANT[™]Pl[™]ex[™]-HT Dx Kit components are listed as follows:

VARIANT[™]Pl[™]ex[™]-HT Dx Liquid Reagents – 96 reactions, REF 10029097

VARIANT[™]Pl[™]ex[™]-HT Dx Liquid Reagents – 24 reactions, REF 10029100

Archer[™] Cleanup Reagents - 96 reactions, REF 10029134

Archer[™] Cleanup Reagents - 24 reactions, REF 10029142

Archer[™] Liquid Adapter Dx Kit Set A – 96 reactions, REF 10029148

Archer[™] Liquid Adapter Dx Kit Set B – 96 reactions, REF 10029151

Materials Provided

VARIANTPlex™-HT Dx Liquid Reagents (96 reaction, 10029097; 24 reaction, 10029100)

Product	Contents	REF
DNA Fragmentation Buffer	77 or 308μL of reaction buffer for enzymatic DNA shearing (-30°C to -10°C)	10029101, 10029098
DNA Fragmentation Enzyme	116 or 416μL of enzyme for cleaving DNA (-30°C to -10°C)	10029102, 10029099
Complete End Repair Buffer	213 or 851μL of reaction buffer for end polishing (-30°C to -10°C)	10029070, 10029088
Complete End Repair Enzyme A	24 or 96μL aqueous solution containing glycerol and enzyme (-30°C to -10°C)	10029068, 10029086
Complete End Repair Enzyme B	3.4 or 13.5μL aqueous solution containing glycerol and enzyme (-30°C to -10°C)	10029069, 10029087
Ligation Step 1 Buffer	89 or 356μL of reaction buffer for Ligation Step 1 (-30°C to -10°C)	10029072, 10029090
Ligation Step 1 Enzyme	7.2 or 29μL aqueous solution containing glycerol and enzyme (-30°C to -10°C)	10029071, 10029089
Ligation Step 2 Buffer	591 or 1190μL of reaction buffer for Ligation Step 2 (-30°C to -10°C)	10029074, 10029092
Ligation Step 2 Enzyme	9.6 or 38.5μL aqueous solution containing glycerol and enzyme (-30°C to -10°C)	10029073, 10029091
First PCR Buffer 2.0	269 or 1076μL of reaction buffer for first PCR (-30°C to -10°C)	10029076, 10029094
Second PCR Buffer 2.0	269 or 1076μL of reaction buffer for second PCR (-30°C to -10°C)	10029077, 10029095
PCR Enzyme	38.4 or 154μL aqueous solution containing glycerol and enzyme (-30°C to -10°C)	10029075, 10029093

Archer™ Cleanup Reagents (24 reaction, 10029142; 96 reaction, 10029134)

Description	Contents and Storage Temperature	REF
Ligation Cleanup Beads	1200μL tube(s) of buffered magnetic bead slurry for capture of ligated products (2°C to 8°C)	10029135
Ligation Cleanup Buffer	10.8 or 43.2mL of buffered solution for washing ligation cleanup binding reactions (2°C to 8°C)	10029144, 10029136
Reaction Cleanup Beads	11.8 or 35.2mL of buffered magnetic bead slurry for immobilization of nucleic acids (2°C to 8°C)	10029145, 10029137

Archer™ Liquid Adapter Dx Kit (Set A 10029148; Set B 10029151)

Description	Contents and Storage Temperature	REF
Liquid P5 Adapter Plate A (Index 1-96)	96-well plate containing 2μL of MBC Adapter oligo (-30°C to -10°C)	10029146
Liquid P7 Index Plate A (Index 1-96)	96-well plate containing 4μL second PCR indexing primer (-30°C to -10°C)	10029147
Liquid P5 Adapter Plate B (Index 97-192)	96-well plate containing 2μL of MBC Adapter oligo (-30°C to -10°C)	10029149
Liquid P7 Index Plate B (Index 97-192)	96-well plate containing 4μL second PCR indexing primer (-30°C to -10°C)	10029150

Materials Required but Not Supplied

- 1 M Tris-HCl, pH 8.0 (molecular biology grade)
- Ultrapure water (molecular biology grade)
- 200 mM Tris-HCl, pH 7.0 (for sequencing)
- 100% ethanol (ACS grade) Various
- Concentrated NaOH solution (ACS grade)
- RNase AWAY™ (Thermo Fisher Scientific-REF:7003)
- KAPA Universal Library Quantification Kit (KAPA Biosystems-REF:KK4824)
- Standard PCR thermal cycler
- Real-Time PCR thermal cycler
- qPCR tubes
- 0.2 mL PCR tubes or 96-well plates
- DynaMag™-96 Side Magnet (Thermo Fisher Scientific-REF:12331D)
- Microcentrifuge
- Plate centrifuge
- Pipettes (P10, P20, P200 and P1000) (Pipetman or equivalent)
- Sterile, nuclease-free aerosol barrier pipette tips
- Vortex mixer
- PCR tube cooling block
- Gloves
- Qubit® Fluorometer (3.0 or higher) (Thermo Fisher Scientific-REF:Q33216)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific-REF:Q32854)
- -20°C 1.5mL Tube Benchtop Cooler Box Various
- Gene-Specific Primers (compatible with Anchored Multiplex PCR)

Summary of Performance Characteristics

Library yield of 4nM or greater is expected when input masses are from 10-200ng. The table below summarizes the performance results for library yield of VARIANTPlex™-HT Dx. All results pass the acceptance criteria.

Primer Panel	Input Description (Manufacturer and part number)	Input mass (ng)	Replicates	Result (Pass criteria >90% OPA)
Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 3	Mimix Myeloid Cancer Panel (Horizon Discovery HD829)	10	3	Pass
		50	3	
		200	3	
	Water (Sigma-Aldrich W4502-50ML)	0	5	Pass
Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 4	Mimix™ Quantitative Multiplex, FFPE Reference Standard IVD (Horizon Discovery HD200-IVD)	10	3	Pass
		50	3	
		200	3	
	Water (Sigma-Aldrich W4502-50ML)	0	5	Pass

Procedure

Before beginning, review “Working with Liquid Reagents” section for additional information regarding best practices for enzymes and buffers. For ease begin by programming thermal cycler to include the following:

Incubation Program	Step	Temperature (°C)	Time (min)
DNA Fragmentation	1	4	1
	2	30	4
	3	65	30
	4	4	Hold
Second Strand cDNA Synthesis	1	16	60
	2	75	20
	3	4	Hold
Complete End Repair (Heated lid off)	1	25	30
	2	4	Hold
Ligation Step 1	1	37	15
	2	4	Hold
Ligation Step 2 (Heated lid off)	1	22	5
	2	4	Hold

Ligation Elution	1	75	10
	2	4	Hold

PCR Cycling Programs	Step	Temperature (°C)	Time	Cycles
First PCR	1	95	3 min	1
	2	95	30 sec	Varies—See panel specific product insert)
	3	Varies—See panel specific product insert)	10 sec	
	4		Varies—See panel specific product insert) 100% ramp rate*	
	5	72	3 min	1
	6	4	Hold	1
Second PCR	1	95	3 min	1
	2	95	30 sec	Varies—See panel specific product insert)
	3	Varies—See panel specific product insert)	10 sec	
	4		Varies—See panel specific product insert) 100% ramp rate*	
	5	72	3 min	1
	6	4	Hold	1

*See ramp rate guidelines in the "Warnings and Precautions" section.

Step 1: DNA Fragmentation

1. Thaw the **DNA Fragmentation Buffer** on ice. Briefly vortex Buffer, then spin down and return to ice. **Do not vortex the enzyme**, instead gently invert the tube 3-5 times and flick to mix, then spin down.
2. Adjust purified DNA samples to a final volume of **32 µL** and transfer to a new 0.2 mL 8-strip tube or plate wells. Keep samples on ice.

Component	Reaction Mix
Ultrapure water	32 - Xµl
Purified nucleic acid	Xµl
Total volume	32µl

3. On ice, make a **DNA Fragmentation Master Mix** working solution based on the desired number of reactions (including but not exceeding 20% overage) using the table below.

DNA Fragmentation Master Mix	1X (µL)	___X (µL)
DNA Fragmentation Buffer (10029101 or 10029098)	3.2	
DNA Fragmentation Enzyme (10029102 or 10029099) Do NOT vortex, invert 3-5x and flick tube before adding	4.8	
Total volume	8	

- a. Mix by briefly vortexing and spin down.
 - b. Keep master mix on ice.
4. To each **32 µL** input sample, add **8 µL** DNA Fragmentation Master Mix.
 - a. Mix by briefly vortexing and spin down.
 - b. Return tubes to ice.
 5. Start the following thermal cycler program, and only transfer reactions to the block once temperature reaches 4°C. Pause the program if necessary.
 - a. Use a heated lid (≥100°C).

DNA Fragmentation incubation conditions

Step	Temperature (°C)	Time (minutes)
1	4	1
2	30	4
3	65	30
4	4	Hold

- b. After the program has reached 4°C, briefly spin down reactions and place on ice.

Step 2: Complete End Repair

- Thaw the **Complete End Repair Buffer** on ice. Briefly vortex Buffer and either vortex or pipette mix enzymes, then spin down.
- On ice, make a **Complete End Repair Master Mix** working solution based on the desired number of reactions (including but not exceeding 20% overage) using the table below.

Complete End Repair Master Mix	1X (μL)	___X (μL)
Complete End Repair Buffer (10029070 or 10029088)	8.86	
Complete End Repair Enzyme A (10029068 or 10029086)	1	
Complete End Repair Enzyme B (10029069 or 10029087)	0.14	
Total Volume	10	

- Mix by briefly vortexing and spin down.
 - Keep master mix on ice.
- To each **40 μL** DNA sample from Step 1: DNA Fragmentation, add **10 μL** of Complete End Repair Master Mix.
 - Mix by briefly vortexing and spin down.
 - Return tubes to ice.
 - Transfer reactions to a preheated thermal cycler and initiate an incubation using the following program and guidelines:
 - Heated lid off. If the lid is still hot, consider using a different thermal cycler or leaving the lid open.

Complete End Repair incubation conditions

Step	Temperature (°C)	Time (minutes)
1	25	30
2	4	Hold

- Place samples in the thermal cycler and start the program.
- When the run has completed, briefly spin down reactions and place on ice.

Reaction Cleanup after Complete End Repair

Refer to **Warnings and Precautions** section of this Instructions for Use for guidance on working with Reaction Cleanup beads.

- Completely resuspend Reaction Cleanup beads by vortexing.
- Remove tubes from ice and add **2.5X** volume (**125 μL**) of Reaction Cleanup beads to each Complete End Repair reaction.
- Vortex well or pipette 10 times to mix and visually inspect the color of the sample to ensure a homogenous mixture.
- Incubate for **5 minutes** at room temperature (20°C to 25°C).
- Briefly spin down tubes.
- Place tubes on the magnet for **4 minutes or until beads are fully pelleted** against the tube wall.
- Without disturbing the bead pellet, use a pipette to remove and discard the supernatant. If the pellet becomes dislodged from the magnet and a portion is drawn into the pipette tip, return contents to tube and repeat magnet incubation step.
- Wash beads **two times** with 70% ethanol while still on the magnet. For each wash:
 - Add **180 μL** 70% ethanol.
 - Incubate for **30 seconds** at room temperature (20°C to 25°C).
 - Carefully remove ethanol and discard.
- After the final wash, use a pipette (≤20 μL capacity) to completely remove visible supernatant residue and allow tubes to dry for **3-5 minutes** at room temperature with open lids. **Take care not to over-dry beads** as this will significantly decrease overall recovery (yield) of nucleic acid.
- Elute DNA by resuspending beads in **16 μL** 10mM Tris-HCl, pH 8.0.

***Note that for automated workflows it is acceptable to add 1 μL 10mM Tris-HCl, pH 8.0 to the bead resuspension volume shown above. This extra 1 μL should be left behind when removing the purified DNA in upcoming steps.**
- Place tubes back on the magnet for **2 minutes**.

Step 3: Ligation Step 1

1. Thaw the **Ligation Step 1 Buffer** on ice. Briefly vortex Buffer and either vortex or pipette mix enzymes, then spin down.
2. On ice, make a **Ligation Step 1 Master Mix** working solution based on the desired number of reactions (including but not exceeding 50% overage) using the table below.

Ligation Step 1 Master Mix	1X (μL)	___X (μL)
Ligation Step 1 Buffer (10029090 or 10029072)	3.7	
Ligation Step 1 Enzyme (10029089 or 10029071)	0.3	
Total Volume	4	

- a. Mix by briefly vortexing and spin down.
- b. Keep master mix on ice.
3. Transfer **16 μL** of eluted DNA from Step 2: Complete End Repair into new 0.2mL 8-strip tubes or plate wells. It is acceptable for a small amount of Reaction Cleanup beads to be transferred.
4. Add **4 μL** of Ligation Step 1 Master Mix to each sample.
- a. Mix by briefly vortexing and spin down.
- b. Return tubes to ice.
5. Transfer reactions to a preheated thermal cycler and initiate an incubation using the following program and guidelines:
 - a. Use a heated lid ($\geq 100^{\circ}\text{C}$).

Ligation Step 1 incubation conditions

Step	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time (minutes)
1	37	15
2	4	Hold

- b. Place samples in the thermal cycler and start the program.
- c. After the program has reached 4°C , remove tubes from the temperature block, briefly spin down reactions and place on ice.

Reaction Cleanup after Ligation Step 1

Refer to **Warnings and Precautions** section of this Instructions for Use for guidance on working with Reaction Cleanup beads.

1. Completely resuspend Reaction Cleanup beads by vortexing.
2. Remove tubes from ice and add **2.5X** volume (**50 μL**) of Reaction Cleanup beads to each Ligation Step 1 reaction.
3. Vortex well or pipette 10 times to mix and visually inspect the color of the sample to ensure even mixing.
4. Incubate for **5 minutes** at room temperature (20°C to 25°C).
5. Briefly spin down tubes.
6. Place tubes on the magnet for **4 minutes or until beads are fully pelleted** against the tube wall.
7. Without disturbing the bead pellet, use a pipette to remove and discard the supernatant. If the pellet becomes dislodged from the magnet and a portion is drawn into the pipette tip, return contents to tube and repeat magnet incubation step.
8. Wash beads **two times** with 70% ethanol while still on the magnet. For each wash:
 - a. Add **180 μL** 70% ethanol.
 - b. Incubate for **30 seconds** at room temperature (20°C to 25°C).
 - c. Carefully remove ethanol and discard.
9. After the final wash, use a pipette (≤ 20 μL capacity) to completely remove visible supernatant residue and allow tubes to dry for **3-5 minutes** at room temperature with open lids. Take care not to over-dry beads as this will significantly decrease overall recovery (yield) of nucleic acid.
10. Elute DNA by resuspending beads in **25 μL** 10 mM Tris-HCl, pH 8.0.
11. Place tubes back on the magnet for **2 minutes**.

Step 4: MBC Adapter Incorporation

1. Thaw **Liquid P5 Adapter Plate(s)** (10029146 or 10029149). Spin down before unsealing plate. It is acceptable to pierce the foil seal with a pipette tip to access the liquid adapters.

Important As this step incorporates the **P5 index tag** for sample-level tracking, be sure to record which **MBC adapter** is being used for each sample.
2. Transfer **23 μL** of eluted DNA from the cleanup after Step 3: Ligation Step 1 above to new 0.2mL 8-strip tubes or plate wells. **Avoid pipetting Reaction Cleanup beads into this reaction.**

3. Add **2 μ L** of respective unique **Liquid P5 MBC Adapter** for a total of **25 μ L**. Re-seal adapter plate using a new seal after all P5 MBC adapters have been added to respective samples.
 - a. Mix by vortexing and spin down.
 - b. Return tubes to ice.
4. Immediately proceed to Step 5: Ligation Step 2.

Step 5: Ligation Step 2

1. Thaw the **Ligation Step 2 Buffer** on ice. Vortex Buffer well and spin down. Either vortex or pipette mix enzymes then spin down.
2. On ice, make a **Ligation Step 2 Master Mix** working solution based on the desired number of reactions (including but not exceeding 20% overage) using the table below.

! Due to the viscosity of the Ligation Step 2 Buffer components, it is essential to slowly pipette mix the stock solution at least 10 times then vortex for 10 seconds BEFORE aliquoting the required volume for the working solution and again AFTER the addition of the Ligation Step 2 Enzyme.

Ligation Step 2 Master Mix	1X (μ L)	___X (μ L)
Ligation Step 2 Buffer (10029092 or 10029074)	24.6	
Ligation Step 2 Enzyme (10029091 or 10029073)	0.4	
<i>Total volume</i>	25	

- a. Mix by briefly vortexing and spin down.
 - b. Keep master mix on ice.
3. Transfer **25 μ L** of Ligation Step 2 Master Mix into each tube or well containing the **25 μ L** of each sample (DNA + Liquid MBC Adapter) from Step 4: MBC Adapter Incorporation above.
 - a. Mix well and spin down. **Due to the viscosity of these components, carefully pipette mixing 10 times in addition to vortexing is required to ensure complete mixing.**
 - b. Return tubes to ice.
4. Transfer reactions to a preheated thermal cycler and initiate an incubation using the following program and guidelines:
 - a. Heated lid off

Ligation Step 2 incubation conditions

Step	Temperature ($^{\circ}$ C)	Time (minutes)
1	22	5
2	4	Hold

- b. After the program has reached 4° C, briefly spin down reactions and place on ice.

— Safe stopping point: It is okay to stop and store the reactions at -30° C to -10° C.

Reaction Cleanup after Ligation Step 2

! Caution: This step uses Ligation Cleanup Beads (10029135 or 10029135) and Ligation Cleanup Buffer (10029144 or 10029136) instead of Reaction Cleanup beads and 70% ethanol. Make sure to use Ligation Cleanup Beads and Ligation Cleanup Buffer that come with the kit for this step.

Prepare Ligation Cleanup Beads:

1. Completely resuspend **Ligation Cleanup Beads** by vortexing.
2. For each reaction, pipette **50 μ L** of Ligation Cleanup Beads into new 0.2 mL 8-strip tubes.
3. Place tube(s) on the magnet for **1 minute or until the beads are pelleted**.
4. Without disturbing the bead pellet, use a pipette to remove and discard the supernatant. If the pellet becomes dislodged from the magnet and a portion is drawn into the pipette tip, return contents to the tube and repeat magnetic pelleting step.
5. Pipette **50 μ L of Ligation Cleanup Buffer** into each tube to resuspend beads.

Ligation Cleanup Procedure:

! Caution: When vortexing PCR tubes in the subsequent steps, maintain firm pressure on all lids as the contained detergent may allow lids to open.

1. Pipette the entire volume of Ligation Step 2 reaction into the tubes with Ligation Cleanup Beads and Buffer.
2. Mix samples by vortexing.
3. Incubate reactions at room temperature for **5 minutes**.
4. Mix samples by vortexing.
5. Incubate reactions at room temperature for **5 minutes**.
6. Briefly spin down tubes.

7. Place tubes on the magnet for **1 minute or until beads are fully pelleted** against the tube wall.
8. Carefully pipette off and discard supernatant (**100 µL**) without disturbing the beads.
9. Wash beads **two times** with **Ligation Cleanup Buffer**.
 - a. Resuspend beads in **180 µL** Ligation Cleanup Buffer by vortexing, briefly spinning down, and placing back on magnet for **1 minute**.
 - b. Once slurry has cleared, discard supernatant.
10. Wash beads **once** with **ultrapure water**:
 - a. Resuspend beads in **180 µL** of ultrapure water by vortexing, briefly spinning down and placing back on magnet.
 - b. Once slurry has cleared, discard supernatant.
 - c. Take care to ensure that all supernatant has been removed from tubes.
11. Elute DNA from Ligation Cleanup Beads:
 - a. Resuspend ligation cleanup beads in the amount of 5 mM NaOH specified in the panel specific **Product Insert (A)**.
***Note that for automated workflows it is acceptable to add an additional 1 µL 5 mM NaOH to the ligation bead resuspension volume shown above. This extra 1 µL should be left behind when removing the purified DNA in upcoming steps.**
 - b. Transfer reactions to a thermal cycler and initiate an incubation using the following program and guidelines:
 - c. Use a heated lid ($\geq 100^{\circ}\text{C}$).

Ligation Elution incubation conditions

Step	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time (minutes)
1	75	10
2	4	Hold

- d. After sample has reached 4°C , briefly spin down and transfer to the magnet.

Step 6: First PCR

1. Thaw the **First PCR Buffer 2.0** and **GSP1** on ice. Briefly vortex and spin down Buffer and primers. Either vortex or pipette mix enzymes then spin down.
2. On ice, make a **First PCR Master Mix** working solution based on the desired number of reactions (including but not exceeding 20% overage) using the table below.
***Note that the PCR Enzyme will also be utilized in Second PCR so do not discard unused enzyme after making First PCR Master Mix.**

First PCR Master Mix	1X (μL)	___X (μL)
First PCR Buffer 2.0 (10029094 or 10029076)	11.2	
PCR Enzyme (10029093 or 10029075)	0.8	
Total volume	12	

- a. Mix by briefly vortexing and spin down.
- b. Keep master mix on ice.
3. To new 0.2mL 8-strip tubes or plate wells add:
 - a. **12 µL** First PCR Master Mix
 - b. GSP1 - Volume specified in the panel specific **Product Insert (B)**
***Note that for automated workflows, the GSPs for the panel(s) in use should be added to their own master mix instead of directly to the sample.**
 - c. Entire volume of purified DNA from Step 5: Ligation 2 Cleanup.
4. Mix by briefly vortexing and spin down.
5. Return tubes to ice.
6. Transfer reactions to a preheated thermal cycler and immediately initiate the program specified in the panel specific **Product Insert (First PCR Reaction)**.
 - a. Use a heated lid ($\geq 100^{\circ}\text{C}$).
 - b. After the program has reached 4°C , briefly spin down reactions and place on ice. It is also acceptable to leave tubes in the thermal cycler at 4°C overnight.

Reaction Cleanup after First PCR

Refer to **Warnings and Precautions** section of this Instructions for Use for guidance on working with Reaction Cleanup beads.

1. Completely resuspend Reaction Cleanup beads by vortexing.
2. Add **0.8X** volume (**32 µL**) of Reaction Cleanup beads to each reaction.
3. Vortex well or pipette 10 times to mix and visually inspect the color of the sample to ensure a homogenous mixture.
4. Incubate for **5 minutes** at room temperature (20°C to 25°C).

5. Briefly spin down tubes.
6. Place tubes on the magnet for **4 minutes or until beads are fully pelleted** against the tube wall.
7. Without disturbing the bead pellet, use a pipette to remove and discard the supernatant. If the pellet becomes dislodged from the magnet and a portion is drawn into the pipette tip, return contents to tube and repeat magnet incubation step.
8. Wash beads **two times** with 70% ethanol while still on the magnet. For each wash:
 - a. Add **180 µL** 70% ethanol
 - b. Incubate for **30 seconds** at room temperature (20°C to 25°C)
 - c. Carefully remove ethanol and discard
9. After the final wash, use a pipette (≤20 µL capacity) to completely remove visible supernatant residue and allow tubes to dry for **3-5 minutes** at room temperature with open lids. **Take care not to over-dry beads** as this will significantly decrease overall recovery (yield) of nucleic acid.
10. Elute DNA by resuspending beads in the volume of 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 specified in the panel specific **Product Insert (C)**.
11. Place tubes back on the magnet for **2 minutes**.
12. Transfer the volume of purified eluate in the panel specific **Product Insert (D)** to a new 0.2mL PCR tube and proceed directly to Step 7: Second PCR.

Step 7: Second PCR

1. Thaw the **Second PCR Buffer 2.0**, **GSP2**, and **Liquid P7 Index Plate(s)** (10029147 or 10029150) on ice. Vortex buffer and GSP2 then spin down. Spin down P7 plate before unsealing. It is acceptable to pierce the foil seal with a pipette tip to access the liquid adapters.
2. On ice, make a **Second PCR Master Mix** working solution based on the desired number of reactions (including but not exceeding 20% overage) using the table below.

Second PCR Master Mix	1X (µL)	__X (µL)
Second PCR Buffer 2.0 (10029095 or 10029077)	11.2	
PCR Enzyme (10029093 or 10029075)	0.8	
<i>Total volume</i>	<i>12</i>	

- a. Mix by briefly vortexing and spin down.
 - b. Keep master mix on ice.
3. To new 0.2mL 8-strip tubes or plate wells add:
 - a. **12 µL** Second PCR Master Mix
 - b. **4 µL** respective Liquid P7 Index according to sample index planning. Re-seal P7 plate using a new seal after adding P7 index to respective wells.
 - c. GSP2 - Volume specified in panel specific **Product Insert (E)**.
***Note that for automated workflows, the GSPs for the panel(s) in use should be added to their own master mix instead of directly to the sample.**
 - d. Transfer volume of purified DNA from Step 6: First PCR specified in the panel specific **Product Insert (D)**.
***Important* As this step incorporates the P7 index tag for sample-level tracking, be sure to record which Liquid P7 Index is being used for each sample.**
4. Mix by briefly vortexing and spin down.
5. Return tubes to ice.
6. Transfer reactions to a preheated thermal cycler and immediately initiate the program specified in the panel specific **Product Insert (Second PCR Reaction)**.
 - a. Use a heated lid (≥100°C).
 - b. After the program has reached 4°C, briefly spin down reactions and place on ice. It is also acceptable to leave tubes in the thermal cycler at 4°C overnight.

Reaction Cleanup after Second PCR

Refer to **Warnings and Precautions** section of this Instructions for Use for guidance on working with Reaction Cleanup beads.

1. Completely resuspend Reaction Cleanup beads by vortexing.
2. Add **0.8X** volume (**32 µL**) of Reaction Cleanup beads to each Second PCR reaction.
3. Vortex well or pipette 10 times to mix and visually inspect the color of the sample to ensure a homogenous mixture.
4. Incubate for **5 minutes** at room temperature (20°C to 25°C).
5. Briefly spin down tubes.
6. Place tubes on the magnet for **4 minutes or until beads are fully pelleted** against the tube wall.

7. Without disturbing the bead pellet, use a pipette to remove and discard the supernatant. If the pellet becomes dislodged from the magnet and a portion is drawn into the pipette tip, return contents to tube and repeat magnet incubation step.
 8. Wash beads **two times** with 70% ethanol while still on the magnet. For each wash:
 - a. Add **180 µL** 70% ethanol.
 - b. Incubate for **30 seconds** at room temperature (20°C to 25°C).
 - c. Carefully remove ethanol and discard.
 9. After the final wash, use a pipette (≤20 µL capacity) to completely remove visible supernatant residue and allow tubes to dry for **3-5 minutes** at room temperature with open lids. **Take care not to over-dry beads** as this will significantly decrease overall recovery (yield) of nucleic acid.
 10. Elute DNA by resuspending beads in **20 µL** 10 mM Tris-HCl, pH 8.0.
 11. Place tubes back on the magnet for **2 minutes**.
 12. Transfer **18 µL** of the purified solution to a new 0.2mL PCR tube. Be sure to avoid transferring beads to the fresh tube.
 13. Stop or proceed directly to Step 8: Quantify Libraries.
-  **Safe stopping point:** It is okay to stop and store the reactions at -30°C to -10°C.

Step 8: Quantify Libraries

1. Quantify the concentration of each library by qPCR following the instructions provided with the KAPA Universal Library Quantification Kit.
-  **Note:** Archer libraries are very concentrated and may need to be serially diluted to 1:100,000 for quantification with KAPA via qPCR.
2. The Loading Calculator spreadsheet can be used for quantifying, normalizing, and sequencing calculations.
 3. The recommended size-adjustment correction factor for calculating the concentration of a library is dependent on the input type and quality. The estimated fragment size values below account for adapter size (157 bp) plus the average insert fragment length. Use an estimated fragment size of 357 bp.
 4. Use each library's quantity to guide dilution of an aliquot to enable combining all normalized libraries to create an equimolar pool (e.g, 10nM).
-  **Note:** Quantification with a fluorometric or electrophoresis-based method is not recommended.

Quality Control

This product was manufactured and released in accordance with the Integrated DNA Technologies, BV, ISO 13485 Quality Management System. The product has met Integrated DNA Technologies quality requirements.

Safety Information

When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and eye protection. For more information, please consult the specific safety data sheet (SDS) by searching on our website at <https://integrateddna-sds.thewerco.com/>.

Disposal

Dispose of reagent and packaging in accordance with local regulations.

Glossary of Symbols

A glossary of symbol definitions is available for reference at www.idtdna.com.

Symbol	Description
	English language
	In vitro diagnostic medical device
	Conformité Européene (CE) Mark
	Authorized representative in the European Community/European Union
	Manufacturer's catalogue number.
	Manufacturer's batch code.
	The date after which the product is not to be used.
	Indicates the manufacturer.
	The date when the product was manufactured.

	The total number of tests that can be performed with the product.
	The temperature limits to which the product can be safely exposed.
	User to consult the instructions for use.
	Reminder symbols call attention to minor details that may be easily overlooked and compromise the procedure resulting in decreased assay performance.
	Caution symbols denote critical steps in the procedure where risk of protocol failure or damage to the product itself could occur if not carefully observed.
	Stop symbols indicate where this procedure may be safely suspended and resumed at a later time without risk of compromised assay performance. Make note of these steps and plan your workflow accordingly.
	French Language
	Italian Language
	Spanish Language

Version History

Version Number	Version Date	Description of Change
01	04/2025	New document
01	11/2025	Converted to new document type (PRD-DOC-391 to RA-DOC-625). Condensed content, table formats, and margins for print version. Added to definitions table. Added foreign language translations (French, Spanish, and Italian).



Contact Information

 **Integrated DNA Technologies**

2425 55th St. Suite 100
Boulder, CO 80301

www.idtdna.com



Integrated DNA Technologies, BV

Interleuvenlaan 12 A
3001 Leuven, Belgium

Réactifs liquides VARIANTPlex™-HT Dx

Utilisation prévue

Pour usage de diagnostic *in vitro*.

Réservé à un usage professionnel.

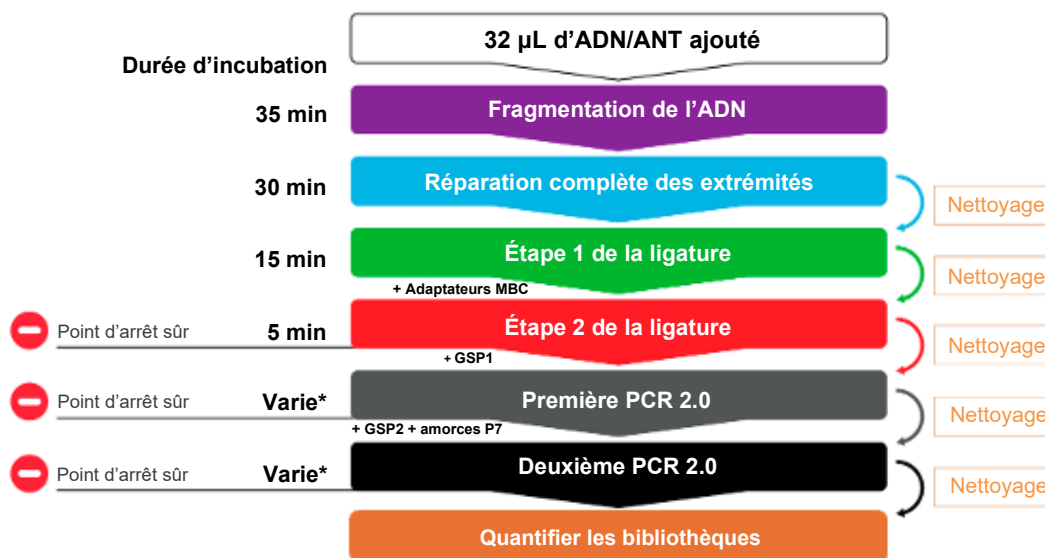
Le VARIANTPlex™-HT Dx est un jeu de réactifs et de consommables utilisés pour préparer les bibliothèques d'échantillons, à l'aide de méthodes manuelles ou automatisées, à partir d'acide nucléique (ADN ou ANT) extrait de tissus ou de cellules fraîchement congelés ou fixés au formol et inclus en paraffine. Des panels d'oligonucléotides fournis par l'utilisateur sont nécessaires pour la préparation de bibliothèques ciblant des régions génomiques d'intérêt spécifiques. Les bibliothèques d'échantillons générées incorporent des séquences P5 et P7 pour une utilisation en aval.

Résumé et principes de la procédure

La préparation de la bibliothèque par PCR multiplexe ancrée (Anchored Multiplex PCR, AMP) est une méthode rapide et évolutive pour générer des bibliothèques enrichies en cibles pour le séquençage nouvelle génération (Next-Generation Sequencing, NGS). La technologie AMP peut être utilisée pour des applications de séquençage ciblé de l'ADN afin de générer une bibliothèque de séquençage. Conçu pour une faible quantité d'acide nucléique, ce processus offre des performances robustes.

L'AMP utilise des amorces unidirectionnelles spécifiques au gène (Gene-Specific Primers, GSP) qui enrichissent pour les mutations connues et inconnues. Les adaptateurs qui contiennent à la fois des codes-barres moléculaires et des indices d'échantillons permettent l'analyse quantitative des données multiplexes, la déduplication de lecture et l'identification précise des mutations.

Aperçu du flux de travail



* Les durées de la première et de la deuxième PCR varient en fonction du panel GSP spécifique ainsi que des conditions individuelles de cyclage en laboratoire. Consulter la notice pour plus d'informations.

Recommandations

- Lire l'intégralité du protocole avant de commencer la préparation de votre bibliothèque.
- Noter les points d'arrêt sûrs tout au long du protocole où les échantillons peuvent être congelés en toute sécurité (-30 °C à -10 °C) pour planifier le flux de travail.
- Essuyer la station de travail et les pipettes avec des produits de nettoyage à base de nucléase et d'acide nucléique (p. ex., RNase AWAY, Thermo Fisher Scientific).
- Si des plaques de 96 puits sont utilisées, s'assurer qu'elles ne contiennent pas de nucléase, que le volume des puits est suffisant et que les joints de plaque sont suffisants pour éviter la perte d'humidité.

Pour usage de diagnostic *in vitro*

Numéro du document : RA-DOC-625

10029812

Avertissements et précautions

- Utiliser les bonnes pratiques de laboratoire pour éviter la contamination des échantillons par les produits de PCR.
- Utiliser des tubes PCR sans nucléase, des tubes de microcentrifugeuse et des embouts de pipette à barrière d'aérosol.
- Vérifier que le thermocycleur utilisé pour la préparation de la bibliothèque est en bon état de fonctionnement et actuellement étalonné conformément aux spécifications du fabricant. Lors de l'utilisation d'un thermocycleur avec une vitesse de rampe de 100 % > 6 °C/s, régler la vitesse de rampe pour qu'elle ne dépasse pas 6 °C/s pour la première PCR et la deuxième PCR.
- S'assurer que les billes de nettoyage de réaction (utilisées à plusieurs reprises tout au long du flux de travail) sont équilibrées à la température ambiante (20 °C à 25 °C) et complètement remises en suspension avant utilisation.
- Les composants de l'étape 2 de la ligation sont visqueux et doivent être complètement mélangés avant l'aliquotage.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Déclarer immédiatement tout incident grave lié à ce produit à IDT et à l'autorité compétente ou à toute autre autorité réglementaire locale de la région de l'utilisateur et du patient.

Limites

- Pour usage de diagnostic *in vitro*.
- À utiliser avec des masses d'entrée de 10 à 200 ng
- Les enzymes fournies sont sensibles à des changements de température fréquents et à des événements potentiels de congélation-décongélation.
- Les enzymes ne se congèlent pas lorsqu'elles sont conservées dans la plage de température de conservation recommandée, mais peuvent se congeler pendant l'expédition.
- Pour obtenir les meilleurs résultats, il est recommandé de conserver les enzymes fournies dans une boîte de rangement de paillasse à -20 °C et de les utiliser pour transporter les enzymes entre les espaces de travail et les congélateurs.
- Les composants enzymatiques restent stables pendant un maximum de 5 cycles de congélation-décongélation sans que leur fonctionnalité ne soit affectée.
- Les tampons sont congelés à la température de conservation recommandée et doivent être décongelés sur de la glace avant utilisation. Pour obtenir les meilleurs résultats, les tampons doivent être aliquotés aux tailles de lot appropriées pour un usage unique avec un surplus adéquat, de sorte que les aliquotes ne soient pas recongelées après la décongélation. L'acide nucléique (ADN) ajouté dans du tampon sans EDTA (pH 7–8) ou de l'eau ultrapure est le modèle de départ optimal pour la préparation de la bibliothèque AMP. Ne PAS utiliser de tampons contenant de l'EDTA.
- Contacter l'assistance technique (archer-tech@idtdna.com) pour obtenir des recommandations concernant le kit d'extraction disponible dans le commerce.
- Utiliser la masse d'entrée maximale autorisée (200 ng) dans la mesure du possible. Des quantités d'entrée plus élevées permettent une détection plus sensible des variants.

Préparation des réactifs

- Les volumes indiqués ci-dessous doivent être augmentés en cas de préparation de plus de 24 bibliothèques.
- Préparer au moins **10 mL** de Tris-HCl 10 mM frais, pH 8,0 à partir de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 et d'eau ultrapure.
 - Mélanger **100 µL** de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 avec **9 900 µL** d'eau ultrapure.
 - Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 peut être utilisé pendant une semaine maximum après le mélange.
- Préparer au moins **50 mL** d'éthanol frais à 70 % à partir d'éthanol à 100 % et d'eau ultrapure.
 - Ajouter **35 mL** d'éthanol à 100 % à **15 mL** d'eau ultrapure.
 - Bien fermer le bouchon pour réduire l'évaporation lorsqu'il n'est pas utilisé.
 - L'éthanol à 70 % peut être utilisé pendant une semaine maximum après le mélange.
- Préparer au moins **1 mL** de NaOH 5 mM frais à partir de NaOH concentré et d'eau ultrapure.
 - En cas de travail à partir de NaOH 1 M, ajouter **5 µL** de NaOH 1 M à **995 µL** d'eau ultrapure pour obtenir 5 mM de NaOH final.
 - En cas de travail à partir de 5 M, ajouter **10 µL** de NaOH 5 M à **990 µL** d'eau ultrapure pour obtenir 5 mM de NaOH. Bien mélanger et centrifuger brièvement. Prélever **100 µL** de NaOH 5 mM et mélanger avec **900 µL** d'eau ultrapure pour obtenir 5 mM de NaOH. Bien mélanger et centrifuger brièvement.

Composants du produit

Les composants du kit VARIANT[™]lex[™]-HT Dx sont énumérés comme suit :

Pour usage de diagnostic *in vitro*.
 Numéro du document : RA-DOC-625
 10029812

Réactifs liquides VARIANTPlex™-HT Dx – 96 réactions, REF 10029097
 Réactifs liquides VARIANTPlex™-HT Dx – 24 réactions, REF 10029100
 Réactifs de nettoyage Archer™ – 96 réactions, REF 10029134
 Réactifs de nettoyage Archer™ – 24 réactions, REF 10029142
 Kit d'adaptateur liquide Dx Archer™ kit A – 96 réactions, REF 10029148
 Kit d'adaptateur liquide Dx Archer™ kit B – 96 réactions, REF 10029151

Matériel fourni

Réactifs liquides VARIANTPlex™-HT Dx (96 réactions, 10029097 ; 24 réactions, 10029100)

Produit	Contenu	REF
Tampon de fragmentation d'ADN	77 ou 308 µL de tampon réactionnel pour le cisaillement de l'ADN enzymatique (-30 °C à -10 °C)	10029101, 10029098
Enzyme de fragmentation d'ADN	116 ou 416 µL d'enzyme pour le clivage de l'ADN (-30 °C à -10 °C)	10029102, 10029099
Tampon Réparation complète des extrémités	213 ou 851 µL de tampon réactionnel pour le polissage final (-30 °C à -10 °C)	10029070, 10029088
Enzyme A Réparation complète des extrémités	24 ou 96 µL de solution aqueuse contenant du glycérol et une enzyme (-30 °C à -10 °C)	10029068, 10029086
Enzyme B Réparation complète des extrémités	3,4 ou 13,5 µL de solution aqueuse contenant du glycérol et une enzyme (-30 °C à -10 °C)	10029069, 10029087
Tampon Étape 1 de la ligation	89 ou 356 µL de tampon réactionnel pour l'étape 1 de la ligation (-30 °C à -10 °C)	10029072, 10029090
Enzyme Étape 1 de la ligation	7,2 ou 29 µL de solution aqueuse contenant du glycérol et une enzyme (-30 °C à -10 °C)	10029071, 10029089
Tampon Étape 2 de la ligation	591 ou 1 190 µL de tampon réactionnel pour l'étape 2 de ligation (-30 °C à -10 °C)	10029074, 10029092
Enzyme Étape 2 de la ligation	9,6 ou 38,5 µL de solution aqueuse contenant du glycérol et une enzyme (-30 °C à -10 °C)	10029073, 10029091
Premier tampon PCR 2.0	269 ou 1 076 µL de tampon réactionnel pour la première PCR (-30 °C à -10 °C)	10029076, 10029094
Deuxième tampon PCR 2.0	269 ou 1 076 µL de tampon réactionnel pour la deuxième PCR (-30 °C à -10 °C)	10029077, 10029095
Enzyme PCR	38,4 ou 154 µL de solution aqueuse contenant du glycérol et une enzyme (-30 °C à -10 °C)	10029075, 10029093

Réactifs de nettoyage Archer™ (24 réactions, 10029142 ; 96 réactions, 10029134)

Description	Contenu et température de stockage	REF
Billes de nettoyage pour ligation	Tube(s) de 1 200 µL de suspension de billes magnétiques tamponnées pour la collecte des produits ligaturés (2 °C à 8 °C)	10029135
Tampon de nettoyage pour ligation	10,8 ou 43,2 mL de solution tamponnée pour les réactions de liaison au nettoyage et au lavage (2 °C à 8 °C)	10029144, 10029136
Billes de nettoyage des réactions	11,8 ou 35,2 mL de suspension de billes magnétiques tamponnées pour l'immobilisation des acides nucléiques (2 °C à 8 °C)	10029145, 10029137

Kit Dx adaptateur liquide Archer™ (Kit A 10029148 ; Kit B 10029151)

Description	Contenu et température de stockage	REF
Plaque d'adaptateur A P5 liquide (indice 1–96)	Plaque de 96 puits contenant 2 µL d'oligo-adaptateur MBC (-30 °C à -10 °C)	10029146
Plaque d'indexation A P7 liquide (indice 1–96)	Plaque de 96 puits contenant 4 µL de deuxième amorce d'indexation PCR (-30 °C à -10 °C)	10029147
Plaque adaptatrice P5 liquide B (indice 97–192)	Plaque de 96 puits contenant 2 µL d'oligo-adaptateur MBC (-30 °C à -10 °C)	10029149
Plaque d'indexation P7 liquide B (indice 97–192)	Plaque de 96 puits contenant 4 µL de deuxième amorce d'indexation PCR (-30 °C à -10 °C)	10029150

Matériel requis mais non fourni

- 1 M Tris-HCl, pH 8,0 (qualité biologie moléculaire)
- Eau ultrapure (qualité biologie moléculaire)
- Tris-HCl 200 mM, pH 7,0 (pour le séquençage)
- Éthanol à 100 % (qualité ACS) Divers
- Solution de NaOH concentrée (qualité ACS)
- RNase AWAY™ (Thermo Fisher Scientific-REF : 7003)
- Kit de quantification de bibliothèque universelle KAPA (KAPA Biosystems-REF : KK4824)
- Thermocycleur PCR standard
- Thermocycleur PCR en temps réel
- Tubes de qPCR
- Tubes PCR de 0,2 mL ou plaques à 96 puits
- Aimant latéral DynaMag™-96 (Thermo Fisher Scientific-REF : 12331D)
- Microcentrifugeuse
- Centrifugeuse de plaques
- Pipettes (P10, P20, P200 et P1000) (Pipetman ou équivalent)
- Embouts de pipette stériles, sans nucléase, à barrière anti-aérosol
- Mélangeur à vortex
- Bloc de refroidissement du tube PCR
- Gants
- Fluorimètre Qubit® (3.0 ou supérieur) (Thermo Fisher Scientific-REF : Q33216)
- Kit de test Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific-REF : Q32854)
- Boîte de refroidissement de pailleuse en tubes de 1,5 mL -20 °C Divers
- Amorces spécifiques au gène (compatibles avec la PCR multiplexe ancrée)

Résumé des caractéristiques de performance

Un rendement de bibliothèque de 4 nM ou plus est attendu lorsque les masses d'entrée varient de 10 à 200 ng. Le tableau ci-dessous résume les résultats de performance pour un rendement de bibliothèque de VARIANT[™]Plex[™]-HT Dx. Tous les résultats répondent aux critères d'acceptation.

Panel d'amorçage	Description de l'entrée (fabricant et référence)	Masse d'entrée (ng)	Réplicats	Résultat (critères de réussite > 90 % APO)
Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 3	Mimix Myeloid Cancer Panel (Horizon Discovery HD829)	10	3	Réussite
		50	3	
		200	3	
	Water (Sigma-Aldrich W4502-50ML)	0	5	Réussite
Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 4	Mimix™ Quantitative Multiplex, FFPE Reference Standard IVD (Horizon Discovery HD200-IVD)	10	3	Réussite
		50	3	
		200	3	
	Water (Sigma-Aldrich W4502-50ML)	0	5	Réussite

Procédure

Avant de commencer, consulter la section « Travailler avec des réactifs liquides » pour obtenir des informations supplémentaires concernant les meilleures pratiques pour les enzymes et les tampons. Pour faciliter la programmation, commencer par programmer le thermocycleur pour inclure les éléments suivants :

Programme d'incubation	Étape	Température (°C)	Durée (min)
Fragmentation d'ADN	1	4	1
	2	30	4
	3	65	30
	4	4	Maintenir
Synthèse de deuxième brin d'ADNc	1	16	60
	2	75	20
	3	4	Maintenir
Réparation complète des extrémités (couvercle chauffant retiré)	1	25	30
	2	4	Maintenir
Étape 1 de la ligation	1	37	15
	2	4	Maintenir
Étape 2 de la ligation (couvercle chauffant retiré)	1	22	5
	2	4	Maintenir
Élution de ligation	1	75	10
	2	4	Maintenir

Programmes de cyclage PCR	Étape	Température (°C)	Durée	Cycles
Première PCR	1	95	3 min	1
	2	95	30 s	Varie (voir la notice spécifique au panel)
	3	Varie (voir la notice spécifique au panel)	10 s	
	4		Varie (voir la notice du produit spécifique au panel) Vitesse de rampe de 100 %*	
	5	72	3 min	1
	6	4	Maintenir	1
Deuxième PCR	1	95	3 min	1
	2	95	30 s	Varie (voir la notice spécifique au panel)
	3	Varie (voir la notice spécifique au panel)	10 s	
	4		Varie (voir la notice du produit spécifique au panel) Vitesse de rampe de 100 %*	
	5	72	3 min	1
	6	4	Maintenir	1

*Consulter les directives relatives à la vitesse de rampe dans la section « Avertissements et précautions ».

Étape 1 : Fragmentation d'ADN

- Décongeler le **tampon de fragmentation d'ADN** sur de la glace. Agiter brièvement le tampon au vortex, puis centrifuger vers le bas et le remettre dans la glace. **Ne pas mélanger l'enzyme au vortex**, inverser doucement le tube 3 à 5 fois et tapoter pour mélanger, puis centrifuger.
- Ajuster les échantillons d'ADN purifié à un volume final de **32 µL** et transférer dans un nouveau tube de 0,2 mL à 8 barrettes ou des puits de plaque. Conserver les échantillons sur de la glace.

Composant	Mélange réactionnel
Eau ultrapure	32-X µL
Acide nucléique purifié	X µL
Volume total	32 µL

- Sur de la glace, préparer une solution de travail de **mélange maître pour fragmentation d'ADN** en fonction du nombre souhaité de réactions (y compris, mais sans dépasser un surplus de 20 %) en utilisant le tableau ci-dessous.

Mélange maître pour fragmentation d'ADN	1X (µL)	___X (µL)
Tampon de fragmentation d'ADN (10029101 ou 10029098)	3,2	
Enzyme de fragmentation d'ADN (10029102 ou 10029099) Ne PAS mélanger au vortex, inverser 3 à 5 fois et tapoter le tube avant de l'ajouter	4,8	
Volume total	8	

- Mélanger au vortex brièvement et centrifuger.
 - Conserver le mélange maître sur de la glace.
- Ajouter **8 µL** de mélange maître de fragmentation d'ADN à chaque échantillon de **32 µL**.
 - Mélanger au vortex brièvement et centrifuger.
 - Remettre les tubes sur de la glace.
 - Démarrer le programme de thermocycleur suivant et transférer les réactions au bloc uniquement lorsque la température atteint 4 °C. Mettre le programme en pause si nécessaire.
 - Utiliser un couvercle chauffant (≥ 100 °C).

Conditions d'incubation de la fragmentation d'ADN

Étape	Température (°C)	Durée (minutes)
1	4	1
2	30	4
3	65	30
4	4	Maintenir

- Une fois que le programme a atteint 4 °C, centrifuger brièvement les réactions et les placer sur de la glace.

Étape 2 : Réparation complète des extrémités

- Décongeler le **tampon de réparation complète des extrémités** sur de la glace. Mélanger brièvement le tampon au vortex et les enzymes de mélange au vortex ou à la pipette, puis centrifuger.
- Sur de la glace, préparer une solution de travail de **mélange maître de Réparation complète des extrémités** en fonction du nombre souhaité de réactions (y compris, mais sans dépasser 20 %) en utilisant le tableau ci-dessous.

Mélange maître de réparation complète des extrémités	1X (µL)	___X (µL)
Tampon Réparation complète des extrémités (10029070 ou 10029088)	8,86	
Enzyme A Réparation complète des extrémités (10029068 ou 10029086)	1	
Enzyme B Réparation complète des extrémités (10029069 ou 10029087)	0,14	
Volume total	10	

- Mélanger au vortex brièvement et centrifuger.
 - Conserver le mélange maître sur de la glace.
- Pour chaque échantillon d'ADN de **40 µL** de l'étape 1 : Fragmentation d'ADN, ajouter **10 µL** de mélange maître de réparation complète des extrémités.
 - Mélanger au vortex brièvement et centrifuger.
 - Remettre les tubes sur de la glace.
 - Transférer les réactions dans un thermocycleur préchauffé et commencer une incubation en utilisant le programme et les directives suivants :
 - Couvercle chauffé éteint. Si le couvercle est encore chaud, envisager d'utiliser un autre thermocycleur ou de laisser le couvercle ouvert.

Conditions d'incubation de la réparation complète des extrémités

Étape	Température (°C)	Durée (minutes)
1	25	30
2	4	Maintenir

- c. Placer les échantillons dans le thermocycleur et démarrer le programme.
- d. Une fois la série terminée, centrifuger brièvement les réactions et les placer sur de la glace.

Nettoyage des réactions après réparation complète des extrémités

Consulter la section Avertissements et précautions de ce mode d'emploi pour obtenir des conseils sur l'utilisation des billes de nettoyage des réactions.

1. Remettre complètement en suspension les billes de nettoyage des réactions en les passant au vortex.
2. Retirer les tubes de la glace et ajouter **2,5 fois** le volume (**125 µL**) de billes de nettoyage des réactions à chaque réaction de réparation complète des extrémités.
3. Bien mélanger au vortex ou pipeter 10 fois pour mélanger et inspecter visuellement la couleur de l'échantillon pour assurer un mélange homogène.
4. Incuber pendant **5 minutes** à température ambiante (20 °C à 25 °C).
5. Centrifuger brièvement les tubes.
6. Placer les tubes sur l'aimant pendant **4 minutes ou jusqu'à ce que les billes soient complètement culottées** contre la paroi du tube.
7. Sans perturber la pastille de billes, utiliser une pipette pour retirer et jeter le surnageant. Si le culot se déloge de l'aimant et qu'une partie est aspirée dans l'embout de pipette, replacer le contenu dans le tube et répéter l'étape d'incubation de l'aimant.
8. Laver les billes **deux fois** avec de l'éthanol à 70 % tout en restant sur l'aimant. Pour chaque lavage :
 - a. Ajouter **180 µL** d'éthanol à 70 %.
 - b. Incuber pendant **30 secondes** à température ambiante (20 °C à 25 °C).
 - c. Retirer l'éthanol avec précaution et le jeter.
9. Après le lavage final, utiliser une pipette (capacité ≤ 20 µL) pour éliminer complètement les résidus visibles de surnageant et laisser les tubes sécher pendant **3 à 5 minutes** à température ambiante avec les couvercles ouverts. **Veiller à ne pas trop sécher les billes**, car cela réduirait considérablement la récupération globale (rendement) de l'acide nucléique.
10. Éluer l'ADN en remettant en suspension les billes dans **16 µL** de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.
***Noter que pour les flux de travail automatisés, il est acceptable d'ajouter 1 µL de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 au volume de remise en suspension des billes indiqué ci-dessus. Ce 1 µL supplémentaire doit être laissé pour le retrait de l'ADN purifié lors des étapes suivantes.**
11. Replacer les tubes sur l'aimant pendant **2 minutes**.

Étape 3 : Étape 1 de la ligation

1. Décongeler le **tampon de l'étape 1 de la ligation** sur de la glace. Mélanger brièvement le tampon au vortex et les enzymes de mélange au vortex ou à la pipette, puis centrifuger.
2. Sur de la glace, préparer une solution de travail de **mélange maître de l'étape 1 de la ligation** en fonction du nombre souhaité de réactions (y compris, mais sans dépasser un surplus de 50 %) en utilisant le tableau ci-dessous.

Étape 1 de la ligation du mélange maître	1X (µL)	___X (µL)
Tampon Étape 1 de la ligation (10029090 ou 10029072)	3,7	
Enzyme Étape 1 de la ligation (10029089 ou 10029071)	0,3	
Volume total	4	

- a. Mélanger au vortex brièvement et centrifuger.
- b. Conserver le mélange maître sur de la glace.
3. Transférer **16 µL** d'ADN élué de l'étape 2 : Réparation complète des extrémités dans de nouveaux tubes ou puits de plaque à 8 barrettes de 0,2 mL. Il est acceptable de transférer une petite quantité de billes de nettoyage des réactions.
4. Ajouter **4 µL** de mélange maître de l'étape 1 de la ligation à chaque échantillon.
 - a. Mélanger au vortex brièvement et centrifuger.
 - b. Remettre les tubes sur de la glace.
5. Transférer les réactions dans un thermocycleur préchauffé et commencer une incubation en utilisant le programme et les directives suivants :
 - a. Utiliser un couvercle chauffant (≥ 100 °C).

Conditions d'incubation de l'étape 1 de la ligation

Étape	Température (°C)	Durée (minutes)
1	37	15
2	4	Maintenir

- b. Placer les échantillons dans le thermocycleur et démarrer le programme.
- c. Une fois que le programme a atteint 4 °C, retirer les tubes du bloc de température, centrifuger brièvement les réactions et les placer sur de la glace.

Nettoyage des réactions après l'étape 1 de la ligation

Consulter la section Avertissements et précautions de ce mode d'emploi pour obtenir des conseils sur l'utilisation des billes de nettoyage des réactions.

1. Remettre complètement en suspension les billes de nettoyage des réactions en les passant au vortex.
2. Retirer les tubes de la glace et ajouter **2,5 fois** le volume (**50 µL**) de billes de nettoyage des réactions à chaque réaction de l'étape 1 de la ligation.
3. Bien mélanger au vortex ou pipeter 10 fois pour mélanger et inspecter visuellement la couleur de l'échantillon pour assurer un mélange uniforme.
4. Incuber pendant **5 minutes** à température ambiante (20 °C à 25 °C).
5. Centrifuger brièvement les tubes.
6. Placer les tubes sur l'aimant pendant **4 minutes ou jusqu'à ce que les billes soient complètement culottées** contre la paroi du tube.
7. Sans perturber la pastille de billes, utiliser une pipette pour retirer et jeter le surnageant. Si le culot se déloge de l'aimant et qu'une partie est aspirée dans l'embout de pipette, replacer le contenu dans le tube et répéter l'étape d'incubation de l'aimant.
8. Laver les billes **deux fois** avec de l'éthanol à 70 % tout en restant sur l'aimant. Pour chaque lavage :
 - a. Ajouter **180 µL** d'éthanol à 70 %.
 - b. Incuber pendant **30 secondes** à température ambiante (20 °C à 25 °C).
 - c. Retirer l'éthanol avec précaution et le jeter.
9. Après le lavage final, utiliser une pipette (capacité ≤ 20 µL) pour éliminer complètement les résidus visibles de surnageant et laisser les tubes sécher pendant **3 à 5 minutes** à température ambiante avec les couvercles ouverts. Veiller à ne pas trop sécher les billes, car cela réduirait considérablement la récupération globale (rendement) de l'acide nucléique.
10. Éluer l'ADN en remettant en suspension les billes dans **25 µL** de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.
11. Replacer les tubes sur l'aimant pendant **2 minutes**.

Étape 4 : Intégration de l'adaptateur MBC

1. Décongeler la ou les **plaque(s) d'adaptateur P5 liquide** (10029146 ou 10029149). Centrifuger avant de déboucher la plaque. Il est acceptable de percer le film d'étanchéité avec un embout de pipette pour accéder aux adaptateurs liquides.
- ! ***Important*** Comme cette étape intègre l'étiquette d'index **P5** pour le suivi au niveau de l'échantillon, s'assurer d'enregistrer l'adaptateur de code-barres moléculaires (Molecular Barcodes, MBC) utilisé pour chaque échantillon.
2. Transférer **23 µL** d'ADN élué du nettoyage après l'étape 3 : Étape 1 de la ligation, ci-dessus dans de nouveaux tubes ou puits de plaque à 8 barrettes de 0,2 mL. **Éviter de pipeter les billes de nettoyage des réactions dans cette réaction.**
3. Ajouter **2 µL** de l'adaptateur **MBC P5 liquide** unique respectif pour un total de **25 µL**. Resceller la plaque adaptatrice en utilisant un nouveau joint une fois que tous les adaptateurs MBC P5 ont été ajoutés aux échantillons respectifs.
 - a. Mélanger au vortex et centrifuger.
 - b. Remettre les tubes sur de la glace.
4. Passer immédiatement à l'étape 5 : Étape 2 de la ligation.

Étape 5 : Étape 2 de la ligation

1. Décongeler le **tampon de l'étape 2 de la ligation** sur de la glace. Bien mélanger le tampon au vortex et centrifuger. Agiter au vortex ou mélanger par pipette puis centrifuger.
2. Sur de la glace, préparer une solution de travail de **mélange maître de l'étape 2 de la ligation** en fonction du nombre souhaité de réactions (y compris, mais sans dépasser un surplus de 20 %) en utilisant le tableau ci-dessous.

! En raison de la viscosité des composants du tampon de l'étape 2 de la ligation, il est essentiel de mélanger lentement la solution mère au moins 10 fois, puis de passer au vortex pendant 10 secondes AVANT d'aliqoter le volume requis pour la solution de travail et de nouveau APRÈS l'ajout de l'enzyme de l'étape 2 de ligation.

Étape 2 de la ligation du mélange maître	1X (µL)	___X (µL)
Tampon Étape 2 de la ligation (10029092 ou 10029074)	24,6	
Enzyme Étape 2 de la ligation (10029091 ou 10029073)	0,4	
Volume total	25	

- a. Mélanger au vortex brièvement et centrifuger.
- b. Conserver le mélange maître sur de la glace.
3. Transférer **25 µL** de mélange maître de l'étape 2 de la ligation dans chaque tube ou puits contenant les **25 µL** de chaque échantillon (ADN + adaptateur MBC liquide) de l'étape 4 : Intégration de l'adaptateur MBC ci-dessus.
 - a. Bien mélanger et centrifuger. **En raison de la viscosité de ces composants, pipeter délicatement le mélange 10 fois en plus du vortex pour assurer un mélange complet.**
 - b. Remettre les tubes sur de la glace.
4. Transférer les réactions dans un thermocycleur préchauffé et commencer une incubation en utilisant le programme et les directives suivants :
 - a. Couvercle chauffé éteint

Conditions d'incubation de l'étape 2 de la ligation

Étape	Température (°C)	Durée (minutes)
1	22	5
2	4	Maintenir

- b. Une fois que le programme a atteint 4 °C, centrifuger brièvement les réactions et les placer sur de la glace.

– Point d'arrêt sûr : Il est possible d'arrêter et de conserver les réactions entre -30 °C et -10 °C.

Nettoyage des réactions après l'étape 2 de la ligation

! **Attention :** Cette étape utilise les billes de nettoyage pour ligation (10029135 ou 10029135) et le tampon de nettoyage pour ligation (10029144 ou 10029136) au lieu des billes de nettoyage pour réaction et de l'éthanol à 70 %. Veiller à utiliser les billes de nettoyage pour ligation et le tampon de nettoyage pour ligation fournis avec le kit pour cette étape.

Préparer les billes de nettoyage de ligation :

1. Remettre complètement en suspension les **billes de nettoyage pour ligation** en les passant au vortex.
2. Pour chaque réaction, pipeter **50 µL** de billes de nettoyage pour ligation dans de nouveaux tubes à 8 barrettes de 0,2 mL.
3. Placer le ou les tube(s) sur l'aimant pendant **1 minute ou jusqu'à ce que les billes soient granulées**.
4. Sans perturber la pastille de billes, utiliser une pipette pour retirer et jeter le surnageant. Si le culot se déloge de l'aimant et qu'une partie est aspirée dans l'embout de pipette, replacer le contenu dans le tube et répéter l'étape de culotage magnétique.
5. Pipeter **50 µL de tampon de nettoyage de ligation** dans chaque tube pour remettre les billes en suspension.

Procédure de nettoyage de la ligation :

! **Attention :** Lors de l'agitation au vortex des tubes PCR lors des étapes suivantes, maintenir une pression ferme sur tous les couvercles car le détérgent contenu peut permettre aux couvercles de s'ouvrir.

1. Pipeter tout le volume de réaction de l'étape 2 de la ligation dans les tubes avec des billes de nettoyage de ligation et du tampon.
2. Mélanger les échantillons au vortex.
3. Incuber les réactions à température ambiante pendant **5 minutes**.
4. Mélanger les échantillons au vortex.
5. Incuber les réactions à température ambiante pendant **5 minutes**.
6. Centrifuger brièvement les tubes.
7. Placer les tubes sur l'aimant pendant **1 minute ou jusqu'à ce que les billes soient complètement culotées** contre la paroi du tube.
8. Pipeter avec précaution et jeter le surnageant (**100 µL**) sans perturber les billes.
9. Laver les billes **deux fois** avec du **tampon de nettoyage pour ligation**.
 - a. Remettre les billes en suspension dans **180 µL** de tampon de nettoyage pour ligation en les passant au vortex, en les faisant tourner brièvement vers le bas et en les replaçant sur l'aimant pendant **1 minute**.
 - b. Une fois la suspension éliminée, éliminer le surnageant.
10. Laver les billes **une fois à l'eau ultrapure** :

- a. Remettre les billes en suspension dans **180 µL** d'eau ultrapure en les passant au vortex, en les faisant tourner brièvement vers le bas et en les replaçant sur l'aimant.
- b. Une fois la suspension éliminée, éliminer le surnageant.
- c. Veiller à ce que tout le surnageant ait été retiré des tubes.
11. Élué l'ADN des billes de nettoyage pour ligature :
 - a. Remettre en suspension les billes de nettoyage de ligature dans la quantité de 5 mM de NaOH spécifiée dans la **notice spécifique au panel (A)**.
***Noter que pour les flux de travail automatisés, il est acceptable d'ajouter 1 µL supplémentaire de 5 mM de NaOH au volume de remise en suspension des billes de ligature indiqué ci-dessus. Ce 1 µL supplémentaire doit être laissé pour le retrait de l'ADN purifié lors des étapes suivantes.**
 - b. Transférer les réactions à un thermocycleur et commencer une incubation en utilisant le programme et les directives suivants :
 - c. Utiliser un couvercle chauffant ($\geq 100\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Conditions d'incubation de l'élution de ligature

Étape	Température ($^{\circ}\text{C}$)	Durée (minutes)
1	75	10
2	4	Maintenir

- d. Une fois que l'échantillon a atteint $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, centrifuger brièvement et transférer dans l'aimant.

Étape 6 : Première PCR

1. Décongeler le **premier tampon PCR 2.0** et le **GSP1** sur de la glace. Mélanger brièvement au vortex et centrifuger le tampon et les amorces. Agiter au vortex ou mélanger par pipette puis centrifuger.
2. Sur de la glace, préparer une solution de travail de **mélange maître de première PCR** en fonction du nombre souhaité de réactions (y compris, mais sans dépasser un excédent de 20 %) en utilisant le tableau ci-dessous.
***Noter que l'enzyme PCR sera également utilisée dans la deuxième PCR, donc ne pas jeter l'enzyme inutilisée après avoir fait le premier mélange maître de PCR.**

Premier mélange maître de PCR	1X (µL)	___X (µL)
Premier tampon PCR 2.0 (10029094 ou 10029076)	11,2	
Enzyme PCR (10029093 ou 10029075)	0,8	
Volume total	12	

- a. Mélanger au vortex brièvement et centrifuger.
- b. Conserver le mélange maître sur de la glace.
3. Dans les nouveaux tubes à 8 barrettes ou puits de plaque de 0,2 mL, ajouter :
 - a. **12 µL** de premier mélange maître de PCR
 - b. GSP1 : volume spécifié dans la **notice spécifique au panel (B)**
***Noter que pour les flux de travail automatisés, les GSP pour le ou les panel(s) utilisés doivent être ajoutés à leur propre mélange maître au lieu d'être ajoutés directement à l'échantillon.**
 - c. Volume total d'ADN purifié de l'étape 5 : Étape 2 de la ligature – Nettoyage.
4. Mélanger au vortex brièvement et centrifuger.
5. Remettre les tubes sur de la glace.
6. Transférer les réactions à un thermocycleur préchauffé et lancer immédiatement le programme spécifié dans la **notice spécifique au panel (première réaction PCR)**.
 - a. Utiliser un couvercle chauffant ($\geq 100\text{ }^{\circ}\text{C}$).
 - b. Une fois que le programme a atteint $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, centrifuger brièvement les réactions et les placer sur de la glace. Il est également acceptable de laisser les tubes dans le thermocycleur à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant la nuit.

Nettoyage des réactions après la première PCR

Consulter la section **Avertissements et précautions** de ce mode d'emploi pour obtenir des conseils sur l'utilisation des billes de nettoyage des réactions.

1. Remettre complètement en suspension les billes de nettoyage des réactions en les passant au vortex.
2. Ajouter **0,8 fois** le volume (**32 µL**) de billes de nettoyage des réactions à chaque réaction.
3. Bien mélanger au vortex ou pipeter 10 fois pour mélanger et inspecter visuellement la couleur de l'échantillon pour assurer un mélange homogène.
4. Incuber pendant **5 minutes** à température ambiante ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$).
5. Centrifuger brièvement les tubes.
6. Placer les tubes sur l'aimant pendant **4 minutes ou jusqu'à ce que les billes soient complètement culottées** contre la paroi du tube.

7. Sans perturber la pastille de billes, utiliser une pipette pour retirer et jeter le surnageant. Si le culot se déloge de l'aimant et qu'une partie est aspirée dans l'embout de pipette, replacer le contenu dans le tube et répéter l'étape d'incubation de l'aimant.
8. Laver les billes **deux fois** avec de l'éthanol à 70 % tout en restant sur l'aimant. Pour chaque lavage :
 - a. Ajouter **180 µL** d'éthanol à 70 %
 - b. Incuber pendant **30 secondes** à température ambiante (20 °C à 25 °C)
 - c. Retirer soigneusement l'éthanol et le jeter
9. Après le lavage final, utiliser une pipette (capacité ≤ 20 µL) pour éliminer complètement les résidus visibles de surnageant et laisser les tubes sécher pendant **3 à 5 minutes** à température ambiante avec les couvercles ouverts. **Veiller à ne pas trop sécher les billes**, car cela réduirait considérablement la récupération globale (rendement) de l'acide nucléique.
10. Élué l'ADN en remettant en suspension les billes dans le volume de 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 spécifié dans la **notice spécifique au panel (C)**.
11. Replacer les tubes sur l'aimant pendant **2 minutes**.
12. Transférer le volume d'éluat purifié dans la **notice spécifique au panel (D)** dans un nouveau tube PCR de 0,2 mL et passer directement à l'étape 7 : Deuxième PCR.

Étape 7 : Deuxième PCR

1. Décongeler le ou les **deuxièmes tampon(s) PCR 2.0, GSP2 et plaque(s) d'indice P7 liquide** (10029147 ou 10029150) sur de la glace. Mélanger au vortex le tampon et le GSP2, puis centrifuger. Centrifuger la plaque P7 avant de la déboucher. Il est acceptable de percer le film d'étanchéité avec un embout de pipette pour accéder aux adaptateurs liquides.
2. Sur de la glace, préparer une **deuxième solution de travail de mélange maître de PCR** en fonction du nombre souhaité de réactions (y compris, mais sans dépasser 20 %) en utilisant le tableau ci-dessous.

Deuxième mélange maître de PCR	1X (µL)	__X (µL)
Deuxième tampon PCR 2.0 (10029095 ou 10029077)	11,2	
Enzyme PCR (10029093 ou 10029075)	0,8	
<i>Volume total</i>	12	

 - a. Mélanger au vortex brièvement et centrifuger.
 - b. Conserver le mélange maître sur de la glace.
3. Dans les nouveaux tubes à 8 barrettes ou puits de plaque de 0,2 mL, ajouter :
 - a. **12 µL** de deuxième mélange maître de PCR
 - b. **4 µL** d'indice P7 liquide respectif selon la planification de l'indice d'échantillon. Resceller la plaque P7 en utilisant un nouveau joint après avoir ajouté l'indice P7 aux puits respectifs.
 - c. GSP2 - Volume spécifié dans la **notice spécifique au panel (E)**.
***Noter que pour les flux de travail automatisés, les GSP pour le ou les panel(s) utilisés doivent être ajoutés à leur propre mélange maître au lieu d'être ajoutés directement à l'échantillon.**
 - d. Transférer le volume d'ADN purifié de l'étape 6 : Première PCR spécifiée dans la **notice spécifique au panel (D)**.
***Important* Comme cette étape incorpore l'étiquette d'index P7 pour le suivi au niveau de l'échantillon, s'assurer d'enregistrer l'index P7 liquide utilisé pour chaque échantillon.**
4. Mélanger au vortex brièvement et centrifuger.
5. Remettre les tubes sur de la glace.
6. Transférer les réactions à un thermocycleur préchauffé et lancer immédiatement le programme spécifié dans la **notice spécifique au panel (deuxième réaction PCR)**.
 - a. Utiliser un couvercle chauffant (≥ 100 °C).
 - b. Une fois que le programme a atteint 4 °C, centrifuger brièvement les réactions et les placer sur de la glace. Il est également acceptable de laisser les tubes dans le thermocycleur à 4 °C pendant la nuit.

Nettoyage des réactions après la deuxième PCR

Consulter la section **Avertissements et précautions de ce mode d'emploi** pour obtenir des conseils sur l'utilisation des billes de nettoyage des réactions.

1. Remettre complètement en suspension les billes de nettoyage des réactions en les passant au vortex.
2. Ajouter **0,8 fois** le volume (**32 µL**) de billes de nettoyage des réactions à chaque deuxième réaction PCR.
3. Bien mélanger au vortex ou pipeter 10 fois pour mélanger et inspecter visuellement la couleur de l'échantillon pour assurer un mélange homogène.
4. Incuber pendant **5 minutes** à température ambiante (20 °C à 25 °C).

5. Centrifuger brièvement les tubes.
 6. Placer les tubes sur l'aimant pendant **4 minutes ou jusqu'à ce que les billes soient complètement culottées** contre la paroi du tube.
 7. Sans perturber la pastille de billes, utiliser une pipette pour retirer et jeter le surnageant. Si le culot se déloge de l'aimant et qu'une partie est aspirée dans l'embout de pipette, replacer le contenu dans le tube et répéter l'étape d'incubation de l'aimant.
 8. Laver les billes **deux fois** avec de l'éthanol à 70 % tout en restant sur l'aimant. Pour chaque lavage :
 - a. Ajouter **180 µL** d'éthanol à 70 %.
 - b. Incuber pendant **30 secondes** à température ambiante (20 °C à 25 °C).
 - c. Retirer l'éthanol avec précaution et le jeter.
 9. Après le lavage final, utiliser une pipette (capacité ≤ 20 µL) pour éliminer complètement les résidus visibles de surnageant et laisser les tubes sécher pendant **3 à 5 minutes** à température ambiante avec les couvercles ouverts. **Veiller à ne pas trop sécher les billes**, car cela réduirait considérablement la récupération globale (rendement) de l'acide nucléique.
 10. Élué l'ADN en remettant les billes en suspension dans **20 µL** de 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0.
 11. Replacer les tubes sur l'aimant pendant **2 minutes**.
 12. Transférer **18 µL** de la solution purifiée dans un nouveau tube PCR de 0,2 mL. Veiller à éviter de transférer les billes dans le tube frais.
 13. Arrêter ou passer directement à l'étape 8 : Quantifier les bibliothèques.
-  **Point d'arrêt sûr :** Il est possible d'arrêter et de conserver les réactions entre -30 °C et -10 °C.

Étape 8 : Quantifier les bibliothèques

1. Quantifier la concentration de chaque bibliothèque par qPCR en suivant les instructions fournies avec le kit de quantification de bibliothèque universel KAPA.
-  **Remarque :** Les bibliothèques Archer sont très concentrées et peuvent nécessiter une dilution en série à 1:100 000 pour la quantification avec KAPA par qPCR.
2. La feuille de calcul du calculateur de chargement peut être utilisée pour la quantification, la normalisation et les calculs de séquençage.
 3. Le facteur de correction recommandé pour l'ajustement de la taille pour calculer la concentration d'une bibliothèque dépend du type et de la qualité d'entrée. Les valeurs estimées de taille de fragment ci-dessous prennent en compte la taille de l'adaptateur (157 pb) plus la longueur moyenne du fragment d'insert. Utiliser une taille de fragment estimée à 357 pb.
 4. Utiliser la quantité de chaque bibliothèque pour guider la dilution d'une aliquote afin de pouvoir combiner toutes les bibliothèques normalisées pour créer un groupe équimolaire (p. ex., 10 nM).
-  **Remarque :** Il n'est pas recommandé de procéder à une quantification par fluoroscopie ou électrophorèse.

Contrôle qualité

Ce produit a été fabriqué et commercialisé dans le respect du système de gestion de la qualité d'Integrated DNA Technologies, BV, en conformité avec la norme ISO 13485. Le produit a satisfait aux exigences de qualité d'Integrated DNA Technologies.

Consignes de sécurité

Lors de la manipulation de produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire adaptée, des gants jetables et une protection oculaire. Pour plus d'informations, veuillez consulter la fiche de données de sécurité (FDS) spécifique disponible sur notre site Web à l'adresse <https://integrateddna-sds.thewerco.com/>.

Élimination

Éliminer le réactif et l'emballage en respectant les réglementations locales.

Glossaire des symboles

Un glossaire des définitions des symboles est disponible à titre de référence à l'adresse www.idtdna.com.

Symbole	Description
	Langue anglaise.
	Dispositif médical de diagnostic in vitro.
	Marque de conformité européenne (CE).
	Mandataire établi dans la Communauté européenne/l'Union européenne.

	Numéro de référence du fabricant.
	Code de lot du fabricant.
	Date après laquelle le produit ne doit plus être utilisé.
	Indique le fabricant.
	Date à laquelle le produit a été fabriqué.
	Nombre total de tests pouvant être effectués avec le produit.
	Limites de température auxquelles le produit peut être exposé en toute sécurité.
	L'utilisateur doit consulter le mode d'emploi.
	Les symboles de rappel attirent l'attention sur des détails mineurs qui peuvent facilement être négligés et compromettre la procédure, entraînant une diminution des performances du test.
	Les symboles de mise en garde indiquent des étapes critiques de la procédure où le risque d'échec du protocole ou d'endommagement du produit lui-même peut survenir si elles ne sont pas soigneusement observées.
	Les symboles d'arrêt indiquent où cette procédure peut être suspendue en toute sécurité et reprise ultérieurement sans risque de compromettre les performances du test. Noter ces étapes et planifier la charge de travail en conséquence.
	Langue française.
	Langue italienne.
	Langue espagnole.

Historique des versions

Numéro de version	Date de version	Description de la modification
01	04/2025	Nouveau document
01	11/2025	Converti en nouveau type de document (PRD-DOC-391 en RA-DOC-625). Contenu condensé, formats de tableau et marges pour la version imprimée. Ajouté au tableau des définitions. Ajout de traductions en langue étrangère (français, espagnol et italien).



Coordonnées

 **Integrated DNA Technologies**
 2425 55th St. Suite 100
 Boulder, CO 80301
www.idtdna.com

 **Integrated DNA Technologies, BV**
 Interleuvenlaan 12 A
 3001 Louvain, Belgique

Reagenti liquidi VARIANTPlex™-HT Dx

Destinazione d'uso

Per uso diagnostico *in vitro*.

Esclusivamente per uso professionale.

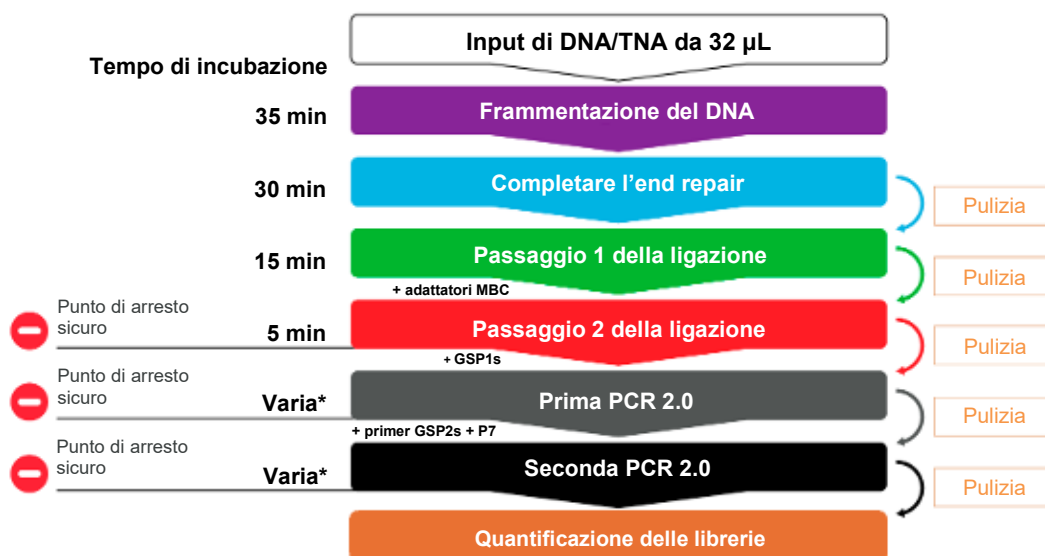
VARIANTPlex™-HT Dx è un set di reagenti e materiali di consumo utilizzato per preparare librerie di campioni, usando metodi manuali o automatizzati, a partire da acido nucleico (DNA o TNA) estratto da tessuto o cellule freschi congelati o fissati in formalina e inclusi in paraffina. I pannelli di oligonucleotidi forniti dall'utilizzatore sono necessari per la preparazione di librerie mirate a specifiche regioni genomiche d'interesse. Le librerie di campioni generate incorporano sequenze P5 e P7 per l'uso a valle.

Sintesi e principi della procedura

La preparazione della libreria che utilizza la PCR multiplex ancorata (AMP) è un metodo rapido e scalabile per generare librerie arricchite di target per l'NGS. La tecnologia AMP può essere utilizzata per applicazioni nel sequenziamento mirato del DNA per generare una libreria di sequenziamento. Questo processo è progettato per un basso input di acido nucleico e offre prestazioni affidabili.

L'AMP utilizza primer gene-specifici (GSP) unidirezionali che arricchiscono sia le mutazioni note sia quelle sconosciute. Gli adattatori che contengono sia codici a barre molecolari (MBC) sia indici dei campioni consentono l'analisi quantitativa dei dati multiplex, la deduplicazione della lettura e un'accurata chiamata delle mutazioni.

Panoramica del flusso di lavoro



Raccomandazioni

- **Prima di iniziare la preparazione della libreria, leggere tutto il protocollo.**
- Per pianificare il flusso di lavoro, prendere nota dei punti di arresto sicuri per tutto il protocollo in cui i campioni possono essere congelati in sicurezza (da -30 °C a -10 °C).
- Pulire la stazione di lavoro e le pipette con prodotti per la pulizia di nucleasi e acidi nucleici (ad es., RNase AWAY, Thermo Fisher Scientific).
- Se si utilizzano piastre da 96 pozzetti, assicurarsi che siano prive di nucleasi, che i pozzetti abbiano un volume sufficiente e che i sigilli delle piastre siano sufficienti a prevenire la perdita di umidità.

Avvertenze e precauzioni

- Adottare buone pratiche di laboratorio per evitare la contaminazione dei campioni da parte dei prodotti della PCR.

Per uso diagnostico *in vitro*

Numero documento: RA-DOC-625

10029812

- Utilizzare provette per PCR prive di nucleasi, provette per microcentrifuga e puntali per pipette con barriera per aerosol.
- Verificare che il termociclatore utilizzato per la preparazione delle librerie sia in buone condizioni di funzionamento e che sia attualmente calibrato secondo le specifiche del fabbricante. Quando si utilizza un termociclatore con una velocità di rampa del 100% >6 °C/sec, impostare la velocità di rampa su un valore non superiore a 6 °C/sec per la prima PCR e la seconda PCR.
- Prima dell'uso, assicurarsi che le microsfere per la pulizia della reazione (utilizzate ripetutamente durante il flusso di lavoro) siano equilibrate a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C) e completamente risospese.
- I componenti del passaggio 2 della ligazione sono viscosi e devono essere miscelati completamente prima dell'aliquotazione.
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Segnalare immediatamente eventuali incidenti gravi correlati a questo prodotto a IDT e all'autorità competente o ad altre autorità di controllo locali in cui risiedono l'utilizzatore e il paziente.

Limitazioni

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Da utilizzare con masse di input da 10 a 200 ng
- Gli enzimi forniti sono sensibili alle variazioni frequenti di temperatura e a potenziali eventi di congelamento-scongelo.
- Gli enzimi non si congelano se vengono conservati nell'intervallo di temperatura di conservazione consigliato, ma potrebbero congelarsi durante il trasporto.
- Per ottenere i migliori risultati, si consiglia di conservare gli enzimi forniti in un frigorifero da banco a -20 °C e di utilizzarlo per trasportare gli enzimi tra gli spazi di lavoro e i congelatori.
- I componenti enzimatici rimangono stabili per un massimo di 5 cicli di congelamento e scongelamento senza compromissione della funzionalità.
- I tamponi si congelano alla temperatura di conservazione consigliata e devono essere scongelati sul ghiaccio prima dell'uso. Per ottenere i migliori risultati, i tamponi devono essere aliquotati nelle dimensioni appropriate del lotto per uso singolo con un'eccedenza adeguata, in modo che le aliquote non vengano ricongelate dopo lo scongelamento. L'acido nucleico (DNA) di input in tampone privo di EDTA (pH 7-8) o acqua ultrapura è il modello di partenza ottimale per la preparazione della libreria AMP. NON utilizzare tamponi che contengono EDTA.
- Contattare l'assistenza tecnica (archer-tech@idtdna.com) per le raccomandazioni sul kit di estrazione disponibile in commercio.
- Ove possibile, utilizzare la massa di input massima consentita (200 ng). Le quantità di input più elevate consentono un rilevamento più sensibile delle varianti.

Preparazione dei reagenti

- I volumi mostrati di seguito devono essere aumentati se si stanno preparando più di 24 librerie.
- Preparare almeno **10 mL** di Tris-HCl fresco 10 mM, pH 8,0 da Tris-HCl 1 M, pH 8,0 e acqua ultrapura.
 - Miscelare **100 µL** di Tris-HCl 1 M, pH 8,0 con **9.900 µL** di acqua ultrapura.
 - Dopo la miscelazione, Tris-HCl da 10 mM, pH 8,0 può essere utilizzato per un massimo di una settimana.
- Preparare almeno **50 mL** di etanolo al 70% fresco da etanolo al 100% e acqua ultrapura.
 - Aggiungere **35 mL** di etanolo al 100% a **15 mL** di acqua ultrapura.
 - Quando non è in uso, chiudere bene il tappo per ridurre al minimo l'evaporazione.
 - L'etanolo al 70% è indicato per l'uso fino a una settimana dopo la miscelazione.
- Preparare almeno **1 mL** di soluzione madre fresca NaOH da 5 mM da NaOH concentrato e acqua ultrapura.
 - Se si lavora partendo da NaOH 1 M, aggiungere **5 µL** di NaOH 1 M a **995 µL** di acqua ultrapura per ottenere NaOH finale da 5 mM.
 - Se si lavora partendo da 5 M, aggiungere **10 µL** di NaOH da 5 M a **990 µL** di acqua ultrapura per ottenere NaOH da 5 mM. Miscelare bene e centrifugare brevemente. Prendere **100 µL** di NaOH da 50 mM e combinarli con **900 µL** di acqua ultrapura per ottenere NaOH da 5 mM. Miscelare bene e centrifugare brevemente.

Componenti del prodotto

I componenti del kit VARIANTPlex™-HT Dx sono elencati di seguito:
 Reagenti liquidi VARIANTPlex™-HT Dx - 96 reazioni, REF 10029097
 Reagenti liquidi VARIANTPlex™-HT Dx - 24 reazioni, REF 10029100

Reagenti di pulizia Archer™ - 96 reazioni, REF 10029134
 Reagenti di pulizia Archer™ - 24 reazioni, REF 10029142
 Set A del kit di adattatori liquidi Archer™ Dx - 96 reazioni, REF 10029148
 Set B del kit di adattatori liquidi Archer™ Dx - 96 reazioni, REF 10029151

Materiali forniti

Reagenti liquidi VARIANTPlex™-HT Dx (96 reazioni, 10029097; 24 reazioni, 10029100)

Prodotto	Contenuto	REF
Tampone per la frammentazione del DNA	77 o 308 µL di tampone di reazione per il taglio del DNA enzimatico (da -30 °C a -10 °C)	10029101, 10029098
Enzima per la frammentazione del DNA	116 o 416 µL di enzima per il clivaggio del DNA (da -30 °C a -10 °C)	10029102, 10029099
Tampone per l'end repair completa	213 o 851 µL di tampone di reazione per la levigatura finale (da -30 °C a -10 °C)	10029070, 10029088
Enzima A per l'end repair completa	24 o 96 µL di soluzione acquosa contenente glicerolo ed enzima (da -30 °C a -10 °C)	10029068, 10029086
Enzima B per l'end repair completa	3,4 o 13,5 µL di soluzione acquosa contenente glicerolo ed enzima (da -30 °C a -10 °C)	10029069, 10029087
Tampone per il passaggio 1 della ligazione	89 o 356 µL di tampone di reazione per il passaggio 1 della ligazione (da -30 °C a -10 °C)	10029072, 10029090
Enzima per il passaggio 1 della ligazione	7,2 o 29 µL di soluzione acquosa contenente glicerolo ed enzima (da -30 °C a -10 °C)	10029071, 10029089
Tampone per il passaggio 2 della ligazione	591 o 1.190 µL di tampone di reazione per il passaggio 2 della ligazione (da -30 °C a -10 °C)	10029074, 10029092
Enzima per il passaggio 2 della ligazione	9,6 o 38,5 µL di soluzione acquosa contenente glicerolo ed enzima (da -30 °C a -10 °C)	10029073, 10029091
Tampone 2.0 per la prima PCR	269 o 1.076 µL di tampone di reazione per la prima PCR (da -30 °C a -10 °C)	10029076, 10029094
Tampone 2.0 per la seconda PCR	269 o 1.076 µL di tampone di reazione per la seconda PCR (da -30 °C a -10 °C)	10029077, 10029095
Enzima per PCR	38,4 o 154 µL di soluzione acquosa contenente glicerolo ed enzima (da -30 °C a -10 °C)	10029075, 10029093

Reagenti di pulizia Archer™ (24 reazioni, 10029142; 96 reazioni, 10029134)

Descrizione	Contenuto e temperatura di conservazione	REF
Microsfere per la pulizia della ligazione	Provetta o provette da 1.200 µL di sospensione tamponata di microsfere magnetiche per la cattura di prodotti ligati (da 2 °C a 8 °C)	10029135
Tampone per la pulizia della ligazione	10,8 o 43,2 mL di soluzione tamponata per il lavaggio delle reazioni leganti di pulizia per la ligazione (da 2 °C a 8 °C)	10029144, 10029136
Microsfere per la pulizia della reazione	11,8 o 35,2 mL di sospensione tamponata di microsfere magnetiche per l'immobilizzazione degli acidi nucleici (da 2 °C a 8 °C)	10029145, 10029137

Kit di adattatori liquidi Archer™ Dx (Set A 10029148; Set B 10029151)

Descrizione	Contenuto e temperatura di conservazione	REF
<i>Piastra A per l'adattatore dei P5 liquidi (indice 1-96)</i>	<i>Piastra a 96 pozzetti contenente 2 µL di oligonucleotidi dell'adattatore MBC (da -30 °C a -10 °C)</i>	10029146
<i>Piastra A per l'indice dei P7 liquidi (indice 1-96)</i>	<i>Piastra a 96 pozzetti contenente 4 µL di primer di indicizzazione per la seconda PCR (da -30 °C a -10 °C)</i>	10029147
<i>Piastra B per l'adattatore dei P5 liquidi (indice 97-192)</i>	<i>Piastra a 96 pozzetti contenente 2 µL di oligonucleotidi dell'adattatore MBC (da -30 °C a -10 °C)</i>	10029149
<i>Piastra B per l'indice dei P7 liquidi (indice 97-192)</i>	<i>Piastra a 96 pozzetti contenente 4 µL di primer di indicizzazione per la seconda PCR (da -30 °C a -10 °C)</i>	10029150

Materiali necessari ma non forniti

- Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (grado di biologia molecolare)
- Acqua ultrapura (grado di biologia molecolare)
- Tris-HCl da 200 mM, pH 7,0 (per il sequenziamento)
- Tipi di etanolo al 100% (grado ACS)
- Soluzione concentrata di NaOH (grado ACS)
- RNase AWAY™ (Thermo Fisher Scientific-REF:7003)
- Kit di quantificazione universale per librerie KAPA (KAPA Biosystems-REF:KK4824)
- Termociclatore per PCR standard
- Termociclatore per PCR in tempo reale
- Provette per qPCR
- Provette per PCR da 0,2 mL o piastre da 96 pozzetti
- Magnete laterale DynaMag™-96 (Thermo Fisher Scientific-REF:12331D)
- Microcentrifuga
- Centrifuga per piastre
- Pipette (P10, P20, P200 e P1000) (Pipetman o equivalente)
- Puntali per pipette sterili, privi di nucleasi e dotati di barriera per aerosol
- Miscelatore vortex
- Blocco di raffreddamento delle provette per PCR
- Guanti
- Fluorometro Qubit® (3.0 o superiore) (Thermo Fisher Scientific-REF:Q33216)
- Kit del dosaggio dsDNA HS Qubit (Thermo Fisher Scientific-REF:Q32854)
- Frigorifero da banco per provette da 1,5 mL a -20 °C
- Primer gene-specifici (compatibili con la PCR multiplex ancorata)

Sintesi delle caratteristiche prestazionali

Quando le masse di input vanno da 10 a 200 ng, si prevede una resa della libreria pari o superiore a 4 nM. La tabella seguente riassume i risultati delle prestazioni per la resa della libreria di VARIANTPlex™-HT Dx. Tutti i risultati superano i criteri di accettazione.

Pannello del primer	Descrizione dell'input (fabbricante e codice prodotto)	Massa di input (ng)	Replicati	Risultato (criteri di superamento: >90% OPA)
<i>Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 3</i>	<i>Mimix Myeloid Cancer Panel (Horizon Discovery HD829)</i>	10	3	<i>Superato</i>
		50	3	
		200	3	
	<i>Water (Sigma-Aldrich W4502-50ML)</i>	0	5	<i>Superato</i>
<i>Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 4</i>	<i>Mimix™ Quantitative Multiplex, FFPE Reference Standard IVD (Horizon Discovery HD200-IVD)</i>	10	3	<i>Superato</i>
		50	3	
		200	3	
	<i>Water (Sigma-Aldrich W4502-50ML)</i>	0	5	<i>Superato</i>

Procedura

Prima di iniziare, consultare la sezione "Utilizzo dei reagenti liquidi" per ulteriori informazioni sulle migliori pratiche per enzimi e tamponi. Per agevolare l'inizio, programmare il termociclatore per includere quanto segue:

Programma di incubazione	Passaggio	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Frammentazione del DNA	1	4	1
	2	30	4
	3	65	30
	4	4	Attesa
Sintesi del secondo filamento di cDNA	1	16	60
	2	75	20
	3	4	Attesa
Completare l'end repair (senza coperchio riscaldato)	1	25	30
	2	4	Attesa
Passaggio 1 della ligazione	1	37	15
	2	4	Attesa
Passaggio 2 della ligazione (senza coperchio riscaldato)	1	22	5
	2	4	Attesa
Eluizione della ligazione	1	75	10
	2	4	Attesa

Programmi dei cicli di PCR	Passaggio	Temperatura (°C)	Tempo	Cicli
Prima PCR	1	95	3 min	1
	2	95	30 sec	Varia (consultare il foglietto illustrativo specifico del pannello)
	3	Varia (consultare il foglietto illustrativo specifico del pannello)	10 sec	
	4		Varia (consultare il foglietto illustrativo specifico del pannello) Velocità di rampa del 100%*	
	5	72	3 min	1
	6	4	Attesa	1
Seconda PCR	1	95	3 min	1
	2	95	30 sec	Varia (consultare il foglietto illustrativo specifico del pannello)
	3	Varia (consultare il foglietto illustrativo specifico del pannello)	10 sec	
	4		Varia (consultare il foglietto illustrativo specifico del pannello) Velocità di rampa del 100%*	
	5	72	3 min	1
	6	4	Attesa	1

*Consultare le linee guida relative alla velocità di rampa nella sezione "Avvertenze e precauzioni".

Passaggio 1: Frammentazione del DNA

- Scongela il **tampone per la frammentazione del DNA** sul ghiaccio. Vortexare brevemente il tampone, quindi centrifugarlo e collocarlo di nuovo sul ghiaccio. **Non vortexare l'enzima**, ma capovolgere delicatamente la provetta 3-5 volte e picchiettare per miscelare, quindi centrifugare.
- Regolare i campioni di DNA purificati su un volume finale di **32 µL** e trasferirli in una nuova provetta con 8 strisce da 0,2 mL o in pozzetti della piastra nuovi. Tenere i campioni sul ghiaccio.

Componente	Miscela di reazione
Acqua ultrapura	32 - X μ L
Acido nucleico purificato	X μ L
Volume totale	32 μ L

3. Sul ghiaccio, preparare una soluzione di lavoro **master mix per la frammentazione del DNA** in base al numero desiderato di reazioni (che comprende, ma non supera l'eccedenza del 20%) utilizzando la tabella seguente.

Master mix per la frammentazione del DNA	1X (μ L)	___X (μ L)
Tampone per la frammentazione del DNA (10029101 o 10029098)	3,2	
Enzima per la frammentazione del DNA (10029102 o 10029099) NON vortexare, capovolgere 3-5 volte e picchiare la provetta prima di aggiungerla	4,8	
Volume totale	8	

- Miscelare vortexando brevemente e centrifugare.
 - Tenere la master mix sul ghiaccio.
4. A ogni campione di input da **32 μ L**, aggiungere **8 μ L** di master mix per la frammentazione del DNA.
- Miscelare vortexando brevemente e centrifugare.
 - Ricollocare le provette sul ghiaccio.
5. Avviare il seguente programma del termociclatore e trasferire le reazioni sul blocco solo quando la temperatura raggiunge i 4 °C. Se necessario, mettere in pausa il programma.
- Utilizzare un coperchio riscaldato (≥ 100 °C).

Condizioni di incubazione per la frammentazione del DNA

Passaggio	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)
1	4	1
2	30	4
3	65	30
4	4	Attesa

- Una volta che il programma ha raggiunto i 4 °C, centrifugare brevemente le reazioni e collocarle sul ghiaccio.

Passaggio 2: Completare l'end repair

- Scongelerare il **tampone per l'end repair completa** sul ghiaccio. Vortexare brevemente il tampone e vortexare o pipettare gli enzimi di miscelazione, quindi centrifugare.
- Sul ghiaccio, preparare una soluzione di lavoro **master mix per l'end repair completa** in base al numero desiderato di reazioni (che comprende, ma non supera l'eccedenza del 20%) utilizzando la tabella seguente.

Master mix per l'end repair completa	1X (μ L)	___X (μ L)
Tampone per l'end repair completa (10029070 o 10029088)	8,86	
Enzima A per l'end repair completa (10029068 o 10029086)	1	
Enzima B per l'end repair completa (10029069 o 10029087)	0,14	
Volume totale	10	

- Miscelare vortexando brevemente e centrifugare.
 - Tenere la master mix sul ghiaccio.
3. Per ogni campione di DNA da **40 μ L** dal passaggio 1: Frammentazione del DNA, aggiungere **10 μ L** di master mix per l'end repair completa.
- Miscelare vortexando brevemente e centrifugare.
 - Ricollocare le provette sul ghiaccio.
4. Trasferire le reazioni in un termociclatore preriscaldato e avviare un'incubazione utilizzando il programma e le linee guida seguenti:
- Senza coperchio riscaldato. Se il coperchio è ancora caldo, prendere in considerazione l'uso di un termociclatore diverso o di lasciare il coperchio aperto.

Condizioni di incubazione per l'end repair completa

Passaggio	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)
1	25	30
2	4	Attesa

- c. Posizionare i campioni nel termociclatore e avviare il programma.
- d. Al termine dell'analisi, centrifugare brevemente le reazioni e collocarle sul ghiaccio.

Pulizia della reazione al termine dell'end repair completa

Fare riferimento alla sezione Avvertenze e precauzioni delle presenti Istruzioni per l'uso per indicazioni sull'utilizzo delle microsfere per la pulizia della reazione.

1. Risospendere completamente le microsfere per la pulizia della reazione vortexando.
2. Rimuovere le provette dal ghiaccio e aggiungere **2,5X** di volume (**125 µL**) di microsfere per la pulizia della reazione a ogni reazione per l'end repair completa.
3. Vortexare bene o pipettare 10 volte per miscelare e ispezionare visivamente il colore del campione per assicurarsi che la miscela sia omogenea.
4. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C).
5. Centrifugare brevemente le provette.
6. Collocare le provette sul magnete per **4 minuti o finché le microsfere non diventano completamente pellet** contro la parete della provetta.
7. Senza disturbare il pellet di microsfere, usare una pipetta per rimuovere e smaltire il surnatante. Se il pellet si stacca dal magnete e una parte viene aspirata nel puntale della pipetta, rimettere il contenuto nella provetta e ripetere la fase di incubazione del magnete.
8. Lavare le microsfere **due volte** con etanolo al 70% mentre si trovano ancora sul magnete. Per ogni lavaggio:
 - a. Aggiungere **180 µL** di etanolo al 70%.
 - b. Incubare per **30 secondi** a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C).
 - c. Rimuovere con cautela l'etanolo e gettarlo.
9. Dopo il lavaggio finale, utilizzare una pipetta (capacità ≤20 µL) per rimuovere completamente i residui visibili del surnatante e lasciar asciugare le provette per **3-5 minuti** a temperatura ambiente con i coperchi aperti. **Fare attenzione a non asciugare eccessivamente le microsfere**, in quanto ciò riduce significativamente il recupero complessivo (resa) dell'acido nucleico.
10. Eluire il DNA risospendendo le microsfere in **16 µL** di Tris-HCl da 10 mM, pH 8,0.

***Si noti che per i flussi di lavoro automatizzati è accettabile aggiungere 1 µL di Tris-HCl da 10 mM, pH 8,0 al volume di risospensione delle microsfere mostrato in precedenza. Questo 1 µL aggiuntivo deve essere lasciato in sede quando si rimuove il DNA purificato nei passaggi successivi.**
11. Collocare di nuovo le provette sul magnete per **2 minuti**.

Passaggio 3: Passaggio 1 della ligazione

1. Scongela il **tampone per il passaggio 1 della ligazione** sul ghiaccio. Vortexare brevemente il tampone e vortexare o pipettare gli enzimi di miscelazione, quindi centrifugare.
2. Sul ghiaccio, preparare una soluzione di lavoro **master mix per il passaggio 1 della ligazione** in base al numero desiderato di reazioni (che comprende, ma non supera l'eccedenza del 50%) utilizzando la tabella seguente.

Master mix per il passaggio 1 della ligazione	1X (µL)	___X (µL)
Tampone per il passaggio 1 della ligazione (10029090 o 10029072)	3,7	
Enzima per il passaggio 1 della ligazione (10029089 o 10029071)	0,3	
Volume totale	4	

- a. Miscelare vortexando brevemente e centrifugare.
- b. Tenere la master mix sul ghiaccio.
3. Trasferire **16 µL** di DNA eluito dal passaggio 2: Completare l'end repair in nuove provette con 8 strisce da 0,2 mL o pozzetti della piastra nuovi. È accettabile trasferire una piccola quantità di microsfere per la pulizia della reazione.
4. Aggiungere **4 µL** di master mix per il passaggio 1 della ligazione a ogni campione.
 - a. Miscelare vortexando brevemente e centrifugare.
 - b. Ricollocare le provette sul ghiaccio.
5. Trasferire le reazioni in un termociclatore preriscaldato e avviare un'incubazione utilizzando il programma e le linee guida seguenti:
 - a. Utilizzare un coperchio riscaldato (≥100 °C).

Condizioni di incubazione del passaggio 1 della ligazione

Passaggio	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)
1	37	15
2	4	Attesa

- b. Posizionare i campioni nel termociclatore e avviare il programma.
- c. Una volta che il programma ha raggiunto i 4 °C, rimuovere le provette dal blocco della temperatura, centrifugare brevemente le reazioni e collocarle sul ghiaccio.

Pulizia della reazione dopo il passaggio 1 della ligazione

Fare riferimento alla sezione Avvertenze e precauzioni delle presenti Istruzioni per l'uso per indicazioni sull'utilizzo delle microsferi per la pulizia della reazione.

1. Risospendere completamente le microsferi per la pulizia della reazione vortexando.
2. Rimuovere le provette dal ghiaccio e aggiungere **2,5X** di volume (**50 µL**) di microsferi per la pulizia della reazione a ogni reazione del passaggio 1 della ligazione.
3. Vortexare bene o pipettare 10 volte per miscelare e ispezionare visivamente il colore del campione per garantire una miscelazione omogenea.
4. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C).
5. Centrifugare brevemente le provette.
6. Collocare le provette sul magnete per **4 minuti o finché le microsferi non diventano completamente pellet** contro la parete della provetta.
7. Senza disturbare il pellet di microsferi, usare una pipetta per rimuovere e smaltire il surnatante. Se il pellet si stacca dal magnete e una parte viene aspirata nel puntale della pipetta, rimettere il contenuto nella provetta e ripetere la fase di incubazione del magnete.
8. Lavare le microsferi **due volte** con etanolo al 70% mentre si trovano ancora sul magnete. Per ogni lavaggio:
 - a. Aggiungere **180 µL** di etanolo al 70%.
 - b. Incubare per **30 secondi** a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C).
 - c. Rimuovere con cautela l'etanolo e gettarlo.
9. Dopo il lavaggio finale, utilizzare una pipetta (capacità ≤20 µL) per rimuovere completamente i residui visibili del surnatante e lasciar asciugare le provette per **3-5 minuti** a temperatura ambiente con i coperchi aperti. Fare attenzione a non asciugare eccessivamente le microsferi, in quanto ciò riduce significativamente il recupero complessivo (resa) dell'acido nucleico.
10. Eluire il DNA risospendendo le microsferi in **25 µL** di Tris-HCl da 10 mM, pH 8,0.
11. Collocare di nuovo le provette sul magnete per **2 minuti**.

Passaggio 4: Integrazione dell'adattatore MBC

1. Scongela la piastra (o le piastre) per l'adattatore dei **P5 liquidi** (10029146 o 10029149). Centrifugare la piastra prima di rimuovere il suo sigillo. Per accedere agli adattatori dei liquidi, è accettabile perforare il sigillo in alluminio con il puntale di una pipetta.
- ! ***Importante*** Poiché questo passaggio incorpora il tag dell'indice **P5** per il tracciamento a livello del campione, assicurarsi di registrare quale adattatore MBC viene utilizzato per ogni campione.
2. Trasferire **23 µL** di DNA eluito dalla pulizia dopo il passaggio 3: Passaggio 1 della ligazione di cui sopra alle nuove provette con 8 strisce da 0,2 mL o ai pozzetti della piastra nuovi. **Evitare di pipettare le microsferi per la pulizia della reazione in questa reazione.**
3. Aggiungere **2 µL** del rispettivo **adattatore MBC per liquidi P5** univoco per un totale di **25 µL**. Risigillare la piastra dell'adattatore utilizzando un nuovo sigillo dopo aver aggiunto tutti gli adattatori MBC P5 ai rispettivi campioni.
 - a. Miscelare vortexando e centrifugare.
 - b. Ricollocare le provette sul ghiaccio.
4. Procedere immediatamente con il passaggio 5: Passaggio 2 della ligazione.

Passaggio 5: Passaggio 2 della ligazione

1. Scongela il **tampone per il passaggio 2 della ligazione** sul ghiaccio. Vortexare bene il tampone e centrifugare. Miscelare gli enzimi vortexando o usando una pipetta, quindi centrifugare.
2. Sul ghiaccio, preparare una soluzione di lavoro **master mix per il passaggio 2 della ligazione** in base al numero desiderato di reazioni (che comprende, ma non supera l'eccedenza del 20%) utilizzando la tabella seguente.

! A causa della viscosità dei componenti del tampone per il passaggio 2 della ligazione, è essenziale pipettare lentamente la soluzione madre per almeno 10 volte, quindi vortexare per 10 secondi PRIMA di aliquotare il volume necessario per la soluzione di lavoro e di nuovo DOPO l'aggiunta dell'enzima per il passaggio 2 della ligazione.

Master mix per il passaggio 2 della ligazione	1X (µL)	__X (µL)
Tampone per il passaggio 2 della ligazione (10029092 o 10029074)	24,6	
Enzima per il passaggio 2 della ligazione (10029091 o 10029073)	0,4	
Volume totale	25	

- Miscelare vortexando brevemente e centrifugare.
 - Tenere la master mix sul ghiaccio.
3. Trasferire **25 µL** di master mix per il passaggio 2 della ligazione in ogni provetta o pozzetto contenente i **25 µL** di ogni campione (DNA + adattatore MBC per liquidi) dal passaggio 4: Integrazione dell'adattatore MBC di cui sopra.
- Miscelare bene e centrifugare. **A causa della viscosità di questi componenti, per garantire la miscelazione completa, è necessario miscelare con cura per 10 volte usando le pipette, oltre a vortexare.**
 - Ricollocare le provette sul ghiaccio.
4. Trasferire le reazioni in un termociclatore preriscaldato e avviare un'incubazione utilizzando il programma e le linee guida seguenti:
- Senza coperchio riscaldato

Condizioni di incubazione del passaggio 2 della ligazione

Passaggio	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)
1	22	5
2	4	Attesa

- Una volta che il programma ha raggiunto i 4 °C, centrifugare brevemente le reazioni e collocarle sul ghiaccio.

– Punto di arresto sicuro: è possibile interrompere e conservare le reazioni a temperature comprese tra -30 °C e -10 °C.

Pulizia della reazione dopo il passaggio 2 della ligazione

! Attenzione: questo passaggio utilizza le sfere per la pulizia della ligazione (10029135 o 10029135) e il tampone per la pulizia della ligazione (10029144 o 10029136) al posto delle microsfere per la pulizia della reazione e dell'etanolo al 70%. Assicurarsi di utilizzare le sfere per la pulizia della ligazione e il tampone per la pulizia della ligazione forniti con il kit per questo passaggio.

Preparazione delle microsfere per la pulizia della ligazione:

- Risospendere completamente le **microsfere per la pulizia della ligazione** vortexando.
- Per ogni reazione, pipettare **50 µL** di microsfere per la pulizia della ligazione in nuove provette con 8 strisce da 0,2 mL.
- Collocare la provetta o le provette sul magnete per **1 minuto o finché le microsfere non diventano pellet**.
- Senza disturbare il pellet di microsfere, usare una pipetta per rimuovere e smaltire il surnatante. Se il pellet si stacca dal magnete e una parte viene aspirata nel puntale della pipetta, rimettere il contenuto nella provetta e ripetere il passaggio di pelletizzazione magnetica.
- Pipettare **50 µL di tampone per la pulizia della ligazione** in ogni provetta per risospendere le microsfere.

Procedura di pulizia della ligazione:

! Attenzione: quando vortexano le provette per PCR nei passaggi successivi, mantenere una pressione decisa su tutti i coperchi, in quanto il detergente contenuto potrebbe farli aprire.

- Pipettare l'intero volume della reazione del passaggio 2 della ligazione nelle provette con le microsfere e il tampone per la pulizia della ligazione.
- Miscelare i campioni vortexando.
- Incubare le reazioni a temperatura ambiente per **5 minuti**.
- Miscelare i campioni vortexando.
- Incubare le reazioni a temperatura ambiente per **5 minuti**.
- Centrifugare brevemente le provette.
- Collocare le provette sul magnete per **1 minuto o finché le microsfere non sono completamente pellettate** contro la parete della provetta.
- Rimuovere con la pipetta e smaltire il surnatante (**100 µL**) senza disturbare le microsfere.
- Lavare le microsfere **due volte** con il **tampone per la pulizia della ligazione**.

- a. Risospendere le microsfere in **180 µL** di tampone per la pulizia della ligazione vortexando, centrifugando brevemente e collocandole di nuovo sul magnete per **1 minuto**.
- b. Una volta che la sospensione diventa trasparente, eliminare il surnatante.
10. Lavare le microsfere **una volta** con **acqua ultrapura**:
 - a. Risospendere le microsfere in **180 µL** di acqua ultrapura vortexando, centrifugando brevemente e collocandole di nuovo sul magnete.
 - b. Una volta che la sospensione diventa trasparente, eliminare il surnatante.
 - c. Assicurarsi che tutto il surnatante sia stato rimosso dalle provette.
11. Eluire il DNA dalle microsfere per la pulizia della ligazione:
 - a. Risospendere le microsfere per la pulizia della ligazione nella quantità di NaOH da 5 mM specificata nel **foglietto illustrativo (A)** specifico del pannello.
***Si noti che per i flussi di lavoro automatizzati è accettabile aggiungere altri 1 µL di NaOH da 5 mM al volume di risospensione delle microsfere di ligazione mostrato in precedenza. Questo 1 µL aggiuntivo deve essere lasciato in sede quando si rimuove il DNA purificato nei passaggi successivi.**
 - b. Trasferire le reazioni in un termociclatore e avviare un'incubazione utilizzando il programma e le linee guida seguenti:
 - c. Utilizzare un coperchio riscaldato (≥ 100 °C).

Condizioni di incubazione dell'eluizione della ligazione

Passaggio	Temperatura (°C)	Tempo (minuti)
1	75	10
2	4	Attesa

- d. Dopo che il campione ha raggiunto i 4 °C, centrifugare brevemente e trasferire sul magnete.

Passaggio 6: Prima PCR

1. Scongela il **tampone 2.0 per la prima PCR** e il **GSP1** sul ghiaccio. Vortexare e centrifugare brevemente il tampone e i primer. Miscelare gli enzimi vortexando o usando una pipetta, quindi centrifugare.
2. Sul ghiaccio, preparare una soluzione di lavoro **master mix per la prima PCR** in base al numero desiderato di reazioni (che comprende, ma non supera l'eccedenza del 20%) utilizzando la tabella seguente.

***Si noti che l'enzima per PCR verrà utilizzato anche nella seconda PCR, quindi non gettare l'enzima inutilizzato dopo aver preparato la master mix per la prima PCR.**

Master mix per la prima PCR	1X (µL)	__X (µL)
Tampone 2.0 per la prima PCR (10029094 o 10029076)	11,2	
Enzima per PCR (10029093 o 10029075)	0,8	
Volume totale	12	

- a. Miscelare vortexando brevemente e centrifugare.
- b. Tenere la master mix sul ghiaccio.
3. Alle nuove provette da 0,2 mL con 8 strisce o ai nuovi pozzetti della piastra, aggiungere:
 - a. **12 µL** di master mix per la prima PCR
 - b. GSP1 - Volume specificato nel **foglietto illustrativo (B)** specifico del pannello
***Si noti che per i flussi di lavoro automatizzati, i GSP per il pannello o i pannelli in uso devono essere aggiunti alla propria master mix anziché direttamente al campione.**
 - c. Intero volume di DNA purificato dal passaggio 5: Passaggio 2 della ligazione.
4. Miscelare vortexando brevemente e centrifugare.
5. Ricollocare le provette sul ghiaccio.
6. Trasferire le reazioni su un termociclatore preriscaldato e avviare immediatamente il programma specificato nel **foglietto illustrativo (prima reazione PCR)** specifico del pannello.
 - a. Utilizzare un coperchio riscaldato (≥ 100 °C).
 - b. Una volta che il programma ha raggiunto i 4 °C, centrifugare brevemente le reazioni e collocarle sul ghiaccio. È inoltre accettabile lasciare le provette nel termociclatore a 4 °C durante la notte.

Pulizia della reazione dopo la prima PCR

Fare riferimento alla sezione Avvertenze e precauzioni delle presenti Istruzioni per l'uso per indicazioni sull'utilizzo delle microsfere per la pulizia della reazione.

1. Risospendere completamente le microsfere per la pulizia della reazione vortexando.
2. Aggiungere **0,8X** di volume (**32 µL**) di microsfere per la pulizia della reazione a ogni reazione.
3. Vortexare bene o pipettare 10 volte per miscelare e ispezionare visivamente il colore del campione per assicurarsi che la miscela sia omogenea.

4. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C).
5. Centrifugare brevemente le provette.
6. Collocare le provette sul magnete per **4 minuti o finché le microsfere non diventano completamente pellet** contro la parete della provetta.
7. Senza disturbare il pellet di microsfere, usare una pipetta per rimuovere e smaltire il surnatante. Se il pellet si stacca dal magnete e una parte viene aspirata nel puntale della pipetta, rimettere il contenuto nella provetta e ripetere la fase di incubazione del magnete.
8. Lavare le microsfere **due volte** con etanolo al 70% mentre si trovano ancora sul magnete. Per ogni lavaggio:
 - a. Aggiungere **180 µL** di etanolo al 70%
 - b. Incubare per **30 secondi** a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C)
 - c. Rimuovere con cautela l'etanolo e gettarlo
9. Dopo il lavaggio finale, utilizzare una pipetta (capacità ≤20 µL) per rimuovere completamente i residui visibili del surnatante e lasciar asciugare le provette per **3-5 minuti** a temperatura ambiente con i coperchi aperti. **Fare attenzione a non asciugare eccessivamente le microsfere**, in quanto ciò riduce significativamente il recupero complessivo (resa) dell'acido nucleico.
10. Eluire il DNA risospendendo le microsfere nel volume di Tris-HCl da 10 mM, pH 8,0 specificato nel **foglietto illustrativo (C)** specifico del pannello.
11. Collocare di nuovo le provette sul magnete per **2 minuti**.
12. Trasferire il volume di eluato purificato nel **foglietto illustrativo (D)** specifico del pannello in una nuova provetta per PCR da 0,2 mL e procedere direttamente con il passaggio 7: Seconda PCR.

Passaggio 7: Seconda PCR

1. Scongela sul ghiaccio il **tampone 2.0 per la seconda PCR, il GSP2 e la piastra o le piastre dell'indice per liquidi P7** (10029147 o 10029150). Vortexare il tampone e il GSP2, quindi centrifugare. Centrifugare la piastra P7 prima di rimuovere il suo sigillo. Per accedere agli adattatori dei liquidi, è accettabile perforare il sigillo in alluminio con il puntale di una pipetta.
2. Sul ghiaccio, preparare una soluzione di lavoro **master mix per la seconda PCR** in base al numero desiderato di reazioni (che comprende, ma non supera l'eccedenza del 20%) utilizzando la tabella seguente.

Master mix per la seconda PCR	1X (µL)	__X (µL)
Tampone 2.0 per la seconda PCR (10029095 o 10029077)	11,2	
Enzima per PCR (10029093 o 10029075)	0,8	
Volume totale	12	

- a. Miscelare vortexando brevemente e centrifugare.
- b. Tenere la master mix sul ghiaccio.
3. Alle nuove provette da 0,2 mL con 8 strisce o ai nuovi pozzetti della piastra, aggiungere:
 - a. **12 µL** di master mix per la seconda PCR
 - b. **4 µL** del rispettivo indice per liquidi P7 secondo la pianificazione dell'indice del campione. Risigillare la piastra P7 usando un nuovo sigillo dopo aver aggiunto l'indice P7 ai rispettivi pozzetti.
 - c. GSP2 - Volume specificato nel **foglietto illustrativo (E)** specifico del pannello.
***Si noti che per i flussi di lavoro automatizzati, i GSP per il pannello o i pannelli in uso devono essere aggiunti alla propria master mix anziché direttamente al campione.**
 - d. Trasferire il volume del DNA purificato dal passaggio 6: Prima PCR specificata nel **foglietto illustrativo (D)** specifico del pannello.
***Importante* Poiché questo passaggio incorpora il tag dell'indice P7 per il tracciamento a livello del campione, assicurarsi di registrare quale indice dei liquidi P7 viene utilizzato per ogni campione.**
4. Miscelare vortexando brevemente e centrifugare.
5. Ricollocare le provette sul ghiaccio.
6. Trasferire le reazioni su un termociclatore preriscaldato e avviare immediatamente il programma specificato nel **foglietto illustrativo (seconda reazione PCR)** specifico del pannello.
 - a. Utilizzare un coperchio riscaldato (≥100 °C).
 - b. Una volta che il programma ha raggiunto i 4 °C, centrifugare brevemente le reazioni e collocarle sul ghiaccio. È inoltre accettabile lasciare le provette nel termociclatore a 4 °C durante la notte.

Pulizia della reazione dopo la seconda PCR

Fare riferimento alla sezione Avvertenze e precauzioni delle presenti Istruzioni per l'uso per indicazioni sull'utilizzo delle microsfere per la pulizia della reazione.

1. Risospendere completamente le microsfere per la pulizia della reazione vortexando.

Per uso diagnostico *in vitro*

Numero documento: RA-DOC-625

10029812

2. Aggiungere **0,8X** di volume (**32 µL**) di microsfere per la pulizia della reazione a ogni reazione della seconda PCR.
 3. Vortexare bene o pipettare 10 volte per miscelare e ispezionare visivamente il colore del campione per assicurarsi che la miscela sia omogenea.
 4. Incubare per **5 minuti** a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C).
 5. Centrifugare brevemente le provette.
 6. Collocare le provette sul magnete per **4 minuti o finché le microsfere non diventano completamente pellet** contro la parete della provetta.
 7. Senza disturbare il pellet di microsfere, usare una pipetta per rimuovere e smaltire il surnatante. Se il pellet si stacca dal magnete e una parte viene aspirata nel puntale della pipetta, rimettere il contenuto nella provetta e ripetere la fase di incubazione del magnete.
 8. Lavare le microsfere **due volte** con etanolo al 70% mentre si trovano ancora sul magnete. Per ogni lavaggio:
 - a. Aggiungere **180 µL** di etanolo al 70%.
 - b. Incubare per **30 secondi** a temperatura ambiente (da 20 °C a 25 °C).
 - c. Rimuovere con cautela l'etanolo e gettarlo.
 9. Dopo il lavaggio finale, utilizzare una pipetta (capacità ≤20 µL) per rimuovere completamente i residui visibili del surnatante e lasciar asciugare le provette per **3-5 minuti** a temperatura ambiente con i coperchi aperti. **Fare attenzione a non asciugare eccessivamente le microsfere**, in quanto ciò riduce significativamente il recupero complessivo (resa) dell'acido nucleico.
 10. Eluire il DNA risospendendo le microsfere in **20 µL** di Tris-HCl da 10 mM, pH 8,0.
 11. Collocare di nuovo le provette sul magnete per **2 minuti**.
 12. Trasferire **18 µL** di soluzione purificata in una nuova provetta per PCR da 0,2 mL. Evitare di trasferire le microsfere nella nuova provetta.
 13. Fermarsi o procedere direttamente con il passaggio 8: Quantificazione delle librerie.
-  **Punto di arresto sicuro:** è possibile interrompere e conservare le reazioni a temperature comprese tra -30 °C e -10 °C.

Passaggio 8: Quantificazione delle librerie

1. Quantificare la concentrazione di ogni libreria mediante qPCR seguendo le istruzioni fornite con il kit di quantificazione universale per librerie KAPA.
-  **Nota:** le librerie Archer sono molto concentrate e potrebbe essere necessario diluirle in serie a 1:100.000 per la quantificazione con KAPA tramite qPCR.
2. Il foglio di calcolo del calcolatore del caricamento può essere utilizzato per quantificare, normalizzare e sequenziare i calcoli.
 3. Il fattore di correzione consigliato della regolazione delle dimensioni per il calcolo della concentrazione di una libreria dipende dal tipo e dalla qualità di input. I valori stimati delle dimensioni dei frammenti indicati di seguito tengono conto della dimensione dell'adattatore (157 bp) più la lunghezza media del frammento dell'inserito. Usare un frammento delle dimensioni stimate di 357 bp.
 4. Utilizzare la quantità di ogni libreria per guidare la diluizione di un'aliquota per consentire la combinazione di tutte le librerie normalizzate per creare un pool equimolare (ad es., 10 nM).
-  **Nota:** Si sconsiglia la quantificazione con un metodo fluorometrico o basato sull'elettroforesi.

Controllo di qualità

Questo prodotto è stato fabbricato e rilasciato in conformità con il sistema di gestione della qualità ISO 13485 di Integrated DNA Technologies, BV. Il prodotto ha soddisfatto i requisiti di qualità di Integrated DNA Technologies.

Informazioni sulla sicurezza

Quando si utilizzano sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e protezione per gli occhi adatti. Per ulteriori informazioni, consultare la Scheda dati di sicurezza (SDS) specifica cercando nel nostro sito web all'indirizzo <https://integrateddna-sds.thewerco.com/>.

Smaltimento

Smaltire il reagente e il confezionamento in conformità delle normative locali.

Glossario dei simboli

Un glossario delle definizioni dei simboli è disponibile come riferimento nel sito www.idtdna.com.

Simbolo	Descrizione
	Inglese
	Dispositivo medico diagnostico in vitro
	Marchio di conformità europea (CE)
	Mandatario nella Comunità europea/nell'Unione europea
	Numero di catalogo del fabbricante.
	Codice del lotto del fabbricante.
	La data dopo la quale il prodotto non deve essere utilizzato.
	Indica il fabbricante.
	La data in cui il prodotto è stato fabbricato.
	Il numero totale di test che possono essere eseguiti con il prodotto.
	I limiti di temperatura ai quali il prodotto può essere esposto in modo sicuro.
	L'utilizzatore deve consultare le istruzioni per l'uso.
	I simboli di promemoria richiamano l'attenzione su piccoli dettagli che possono essere facilmente ignorati, compromettendo la procedura, con conseguente riduzione delle prestazioni del dosaggio.
	I simboli di attenzione indicano passaggi critici della procedura che, se non vengono osservati con attenzione, potrebbero portare al rischio di errore del protocollo o di danni al prodotto stesso.
	I simboli di arresto indicano quando è possibile sospendere e riprendere in sicurezza questa procedura in un secondo momento, senza il rischio di compromettere le prestazioni del dosaggio. Prendere nota di questi passaggi e pianificare il flusso di lavoro di conseguenza.
	Francese
	Italiano
	Spagnolo

Cronologia delle versioni

Numero della versione	Data della versione	Descrizione della modifica
01	04/2025	Nuovo documento
01	11/2025	Conversione in un nuovo tipo di documento (da PRD-DOC-391 a RA-DOC-625). Riduzione del contenuto, dei formati delle tabelle e dei margini per la versione cartacea. Aggiunte alle tabelle delle definizioni. Sono state aggiunte le traduzioni in lingua straniera (francese, spagnolo e italiano).



Informazioni di contatto

Integrated DNA Technologies

2425 55th St. Suite 100
Boulder, CO 80301
www.idtdna.com

Integrated DNA Technologies, BV
Interleuvenlaan 12 A
3001 Leuven, Belgio

Reactivos líquidos VARIANTPlex™-HT Dx

Uso previsto

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Solo para uso profesional.

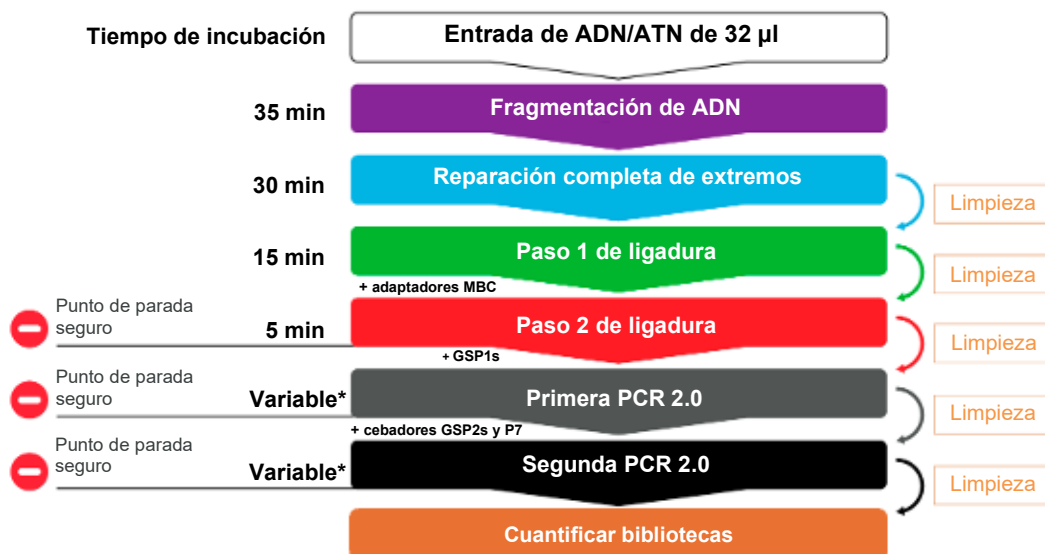
VARIANTPlex™-HT Dx es un conjunto de reactivos y consumibles utilizado para preparar bibliotecas de muestras, utilizando métodos manuales y automatizados, a partir de ácidos nucleicos (ARN o TNA) extraídos de tejido o células recién congelados o fijados en formol e incluidos en parafina. Se requieren paneles de oligonucleótidos suministrados por el usuario para la preparación de bibliotecas dirigidas a regiones genómicas específicas de interés. Las bibliotecas de muestras generadas incorporan secuencias P5 y P7 para uso posterior.

Resumen y principios del procedimiento

La preparación de la genoteca mediante PCR multiplex anclada (AMP) es un método rápido y escalable para generar bibliotecas enriquecidas con dianas para NGS. La tecnología AMP puede utilizarse para aplicaciones en la secuenciación de ADN dirigida para generar una biblioteca de secuenciación. Este proceso, diseñado para la introducción de ácidos nucleicos bajos, ofrece un rendimiento sólido.

La AMP utiliza cebadores específicos de gen (GSP) unidireccionales que enriquecen tanto las mutaciones conocidas como las desconocidas. Los adaptadores que contienen códigos de barras moleculares e índices de muestras permiten el análisis cuantitativo de datos multiplex, la deduplicación de lecturas y la identificación precisa de mutaciones.

Descripción general del flujo de trabajo



* Los tiempos de la primera y segunda PCR varían en función del panel de GSP específico, así como de las condiciones de ciclado del laboratorio individual. Consulte el prospecto para obtener más información.

Recomendaciones

- Lea todo el protocolo antes de iniciar la preparación de la biblioteca.
- Tome nota de los puntos de parada seguros a lo largo del protocolo en los que las muestras pueden congelarse de forma segura (de -30 °C a -10 °C) para planificar su flujo de trabajo.
- Limpie la estación de trabajo y las pipetas con productos de limpieza de nucleasas y ácidos nucleicos (p. ej., RNase AWAY, Thermo Fisher Scientific).
- Si se utilizan placas de 96 pocillos, asegúrese de que no tienen nucleasas, de que los pocillos tienen un volumen suficiente y de que los precintos de la placa son suficientes para evitar la pérdida de humedad.

Advertencias y precauciones

- Utilice las buenas prácticas de laboratorio para evitar la contaminación de las muestras por productos de PCR.
- Utilice tubos de PCR sin nucleasas, tubos de microcentrífuga y puntas de pipeta con barrera para aerosoles.
- Verifique que el termociclador utilizado para la preparación de bibliotecas esté en buen estado de funcionamiento y calibrado actualmente de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Cuando utilice un termociclador con una velocidad de incremento del 100 % $>6^{\circ}\text{C/s}$, ajuste la velocidad de incremento para que no supere los 6°C/s para la primera PCR y la segunda PCR.
- Asegúrese de que las microesferas de limpieza de reacción (utilizadas repetidamente durante todo el flujo de trabajo) se equilibren a temperatura ambiente (de 20°C a 25°C) y se resuspendan por completo antes de su uso.
- Los componentes del paso 2 de la ligadura son viscosos y deben mezclarse por completo antes de dividirlos en alícuotas.
- No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Notifique inmediatamente cualquier incidente grave relacionado con este producto a IDT y a la autoridad competente u otra autoridad reguladora local en la que residan el usuario y el paciente.

Limitaciones

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Para uso con masas de entrada de 10 a 200 ng
- Las enzimas suministradas son sensibles a los cambios frecuentes de temperatura y a los posibles acontecimientos de congelación-descongelación.
- Las enzimas no se congelarán si se conservan en el intervalo de temperatura de almacenamiento recomendado, pero pueden congelarse durante el envío.
- Para obtener resultados óptimos, se recomienda almacenar las enzimas suministradas en una caja refrigeradora de laboratorio a -20°C y utilizarlas para transportar enzimas entre los espacios de trabajo y los congeladores.
- Los componentes enzimáticos permanecerán estables durante un máximo de 5 ciclos de congelación-descongelación sin afectar a su funcionamiento.
- Los tampones se congelarán a la temperatura de almacenamiento recomendada y deberán descongelarse en hielo antes de su uso. Para obtener resultados óptimos, los tampones deben dividirse en alícuotas a los tamaños de lote adecuados para un solo uso con un excedente adecuado, de forma que las alícuotas no se vuelvan a congelar después de descongelarlas. Introducir el ácido nucleico (ADN) en tampón sin EDTA (pH 7-8) o agua ultrapura es la plantilla de partida óptima para la preparación de la biblioteca de amplificación. NO utilice tampones que contengan EDTA.
- Póngase en contacto con el servicio técnico (archer-tech@idtdna.com) para obtener recomendaciones sobre el kit de extracción disponible comercialmente.
- Utilice la masa de entrada máxima permitida (200 ng) siempre que sea posible. Las cantidades de entrada más altas permiten una detección de variantes más sensible.

Preparación de los reactivos

- Los volúmenes mostrados a continuación deben aumentarse si está preparando más de 24 bibliotecas.
- Prepare al menos **10 ml** de Tris-HCl 10 mM nuevo, pH 8,0 a partir de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 y agua ultrapura.
 - Mezcle **100 μl** de Tris-HCl 1 M, pH 8,0 con **9900 μl** de agua ultrapura.
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 puede utilizarse durante un máximo de una semana después de la mezcla.
- Prepare al menos **50 ml** de etanol al 70 % nuevo a partir de etanol al 100 % y agua ultrapura.
 - Añada **35 ml** de etanol al 100 % a **15 ml** de agua ultrapura.
 - Cierre bien la tapa para reducir al mínimo la evaporación cuando no la esté utilizando.
 - El etanol al 70 % puede utilizarse durante un máximo de una semana después de la mezcla.
- Prepare al menos **1 ml** de solución de trabajo nueva de NaOH 5 mM a partir de NaOH concentrado y agua ultrapura.
 - Si trabaja con NaOH 1 M, añada **5 μl** de NaOH 1 M a **995 μl** de agua ultrapura para obtener NaOH 5 mM final.
 - Si trabaja desde 5 M, añada **10 μl** de NaOH 5 M a **990 μl** de agua ultrapura para obtener NaOH 50 mM. Mezcle bien y centrifugue brevemente. Tome **100 μl** de NaOH 50 mM y mézclelo con **900 μl** de agua ultrapura para obtener NaOH 5 mM. Mezcle bien y centrifugue brevemente.

Componentes del producto

Los componentes del kit VARIANTPlex™-HT Dx se indican a continuación:

Reactivos líquidos VARIANTPlex™-HT Dx: 96 reacciones, REF 10029097

Reactivos líquidos VARIANTPlex™-HT Dx: 24 reacciones, REF 10029100

Para uso diagnóstico *in vitro*

Número de documento: RA-DOC-625

10029812

Reactivos de limpieza Archer™: 96 reacciones, REF 10029134
 Reactivos de limpieza Archer™: 24 reacciones, REF 10029142
 Kit de adaptadores líquidos Archer™ Dx, Conjunto A – 96 reacciones, REF 10029148
 Kit de adaptadores líquidos Archer™ Dx, Conjunto B – 96 reacciones, REF 10029151

Materiales suministrados

Reactivos líquidos VARIANTPlex™-HT Dx (96 reacciones, 10029097; 24 reacciones, 10029100)

Producto	Contenido	REF
Tampón de fragmentación de ADN	77 o 308 µl de tampón de reacción para fragmentación enzimática de ADN (de –30 °C a –10 °C)	10029101, 10029098
Enzima de fragmentación de ADN	116 o 416 µl de enzima para la escisión del ADN (de –30 °C a –10 °C)	10029102, 10029099
Tampón de reparación completa de extremos	213 u 851 µl de tampón de reacción para el pulido final (de –30 °C a –10 °C)	10029070, 10029088
Enzima A de reparación completa de extremos	24 o 96 µl de solución acuosa que contiene glicerol y enzima (de –30 °C a –10 °C)	10029068, 10029086
Enzima B de reparación completa de extremos	3,4 o 13,5 µl de solución acuosa que contiene glicerol y enzima (de –30 °C a –10 °C)	10029069, 10029087
Tampón del paso 1 de ligadura	89 o 356 µl de tampón de reacción para el paso 1 de ligadura (de –30 °C a –10 °C)	10029072, 10029090
Enzima del paso 1 de ligadura	7,2 o 29 µl de solución acuosa que contiene glicerol y enzima (de –30 °C a –10 °C)	10029071, 10029089
Tampón del paso 2 de ligadura	591 o 1190 µl de tampón de reacción para el paso de ligadura 2 (de –30 °C a –10 °C)	10029074, 10029092
Enzima del paso 2 de ligadura	9,6 o 38,5 µl de solución acuosa que contiene glicerol y enzima (de –30 °C a –10 °C)	10029073, 10029091
Primer tampón para PCR 2.0	269 o 1076 µl de tampón de reacción para la primera PCR (de –30 °C a –10 °C)	10029076, 10029094
Segundo tampón para PCR 2.0	269 o 1076 µl de tampón de reacción para la segunda PCR (de –30 °C a –10 °C)	10029077, 10029095
Enzima de PCR	38,4 o 154 µl de solución acuosa que contiene glicerol y enzima (de –30 °C a –10 °C)	10029075, 10029093

Reactivos de limpieza Archer™ (24 reacciones, 10029142; 96 reacciones, 10029134)

Descripción	Contenido y temperatura de almacenamiento	REF
Microesferas de limpieza de ligaduras	Tubo(s) de 1200 µl de lechada de microesferas magnéticas tamponadas para la captura de productos ligados (de 2 °C a 8 °C)	10029135
Tampón de limpieza de ligaduras	10,8 o 43,2 ml de solución tamponada para el lavado reacciones de unión de limpieza de ligadura (de 2 °C a 8 °C)	10029144, 10029136
Microesferas de limpieza de reacción	11,8 o 35,2 ml de suspensión de microesferas magnéticas tamponadas para la inmovilización de ácidos nucleicos (de 2 °C a 8 °C)	10029145, 10029137

Kit de adaptadores líquidos Archer™ Dx (conjunto A 10029148; conjunto B 10029151)

Descripción	Contenido y temperatura de almacenamiento	REF
Placa de adaptadores líquidos P5 A (Índice 1-96)	Placa de 96 pocillos que contiene 2 µl de oligonucleótido adaptador MBC (de -30 °C a -10 °C)	10029146
Placa A de índices líquidos P7 (Índice 1-96)	Placa de 96 pocillos que contiene 4 µl de cebador de indexado para segunda PCR (de -30 °C a -10 °C)	10029147
Placa de adaptadores líquidos P5 B (Índice 97-192)	Placa de 96 pocillos que contiene 2 µl de oligonucleótido adaptador MBC (de -30 °C a -10 °C)	10029149
Placa B de índices líquidos P7 (Índice 97-192)	Placa de 96 pocillos que contiene 4 µl de cebador de indexado para segunda PCR (de -30 °C a -10 °C)	10029150

Materiales necesarios pero no suministrados

- Tris-HCl 1 M, pH 8,0 (calidad para biología molecular)
- Agua ultrapura (calidad para biología molecular)
- Tris-HCl 200 mM, pH 7,0 (para secuenciación)
- Etanol al 100 % (calidad ACS) Varios
- Solución de NaOH concentrado (calidad ACS)
- RNase AWAY™ (Thermo Fisher Scientific-REF:7003)
- Kit de cuantificación de la biblioteca universal KAPA (KAPA Biosystems-REF:KK4824)
- Termociclador de PCR estándar
- Termociclador de PCR en tiempo real
- Tubos de qPCR
- Tubos de PCR de 0,2 ml o placas de 96 pocillos
- Imán lateral DynaMag™-96 (Thermo Fisher Scientific-REF:12331D)
- Microcentrífuga
- Centrífuga de placas
- Pipetas (P10, P20, P200 y P1000) (Pipetman o equivalente)
- Puntas de pipeta estériles y sin nucleasas con barrera para aerosol
- Agitador vórtex
- Bloque de enfriamiento del tubos de PCR
- Guantes
- Fluorómetro Qubit® (3.0 o superior) (Thermo Fisher Scientific-REF:Q33216)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific-REF:Q32854)
- Caja de enfriador de laboratorio, -20 °C 1,5 ml Varios
- Cebadores específicos de gen (compatibles con PCR multiplex anclada)

Resumen de las características de rendimiento

Se espera un rendimiento de biblioteca de 4 nM o superior cuando las masas de entrada son de entre 10 y 200 ng. La tabla siguiente resume los resultados de rendimiento de biblioteca del VARIANTPlex™-HT Dx. Todos los resultados cumplen los criterios de aceptación.

Panel de cebadores	Descripción de entrada (fabricante y referencia)	Masa de entrada (ng)	Réplicas	Resultado (Criterio de aprobación >90 % de OPA)
Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 3	Mimix Myeloid Cancer Panel (Horizon Discovery HD829)	10	3	Aprobado
		50	3	
		200	3	
	Water (Sigma-Aldrich W4502-50ML)	0	5	Aprobado
Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 4	Mimix™ Quantitative Multiplex, estándar de referencia IVD FFPE (Horizon Discovery HD200-IVD)	10	3	Aprobado
		50	3	
		200	3	
	Water (Sigma-Aldrich W4502-50ML)	0	5	Aprobado

Procedimiento

Antes de empezar, consulte la sección «Trabajar con reactivos líquidos» para obtener más información sobre las mejores prácticas para enzimas y tampones. Para facilitar el proceso, primero programe el termociclador para que incluya lo siguiente:

Programa de incubación	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Fragmentación de ADN	1	4	1
	2	30	4
	3	65	30
	4	4	Mantener
Síntesis de segunda cadena de ADNc	1	16	60
	2	75	20
	3	4	Mantener
Reparación completa de extremos (tapa calentada quitada)	1	25	30
	2	4	Mantener
Paso 1 de ligadura	1	37	15
	2	4	Mantener
Paso 2 de ligadura (tapa calentada quitada)	1	22	5
	2	4	Mantener
Elución de ligadura	1	75	10
	2	4	Mantener

Programas de ciclo de PCR	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Primera PCR	1	95	3 min	1
	2	95	30 s	Variable: (consulte el prospecto específico del panel)
	3	Variable: (consulte el prospecto específico del panel)	10 s	
	4		Variable: (consulte el prospecto específico del panel) Velocidad de incremento del 100 %*	
	5	72	3 min	1
	6	4	Mantener	1
Segunda PCR	1	95	3 min	1
	2	95	30 s	Variable: (consulte el prospecto específico del panel)
	3	Variable: (consulte el prospecto específico del panel)	10 s	
	4		Variable: (consulte el prospecto específico del panel) Velocidad de incremento del 100 %*	
	5	72	3 min	1
	6	4	Mantener	1

*Consulte las directrices de la velocidad de incremento en el apartado «Advertencias y precauciones».

Paso 1: Fragmentación de ADN

- Descongele el **tampón de fragmentación de ADN** en hielo. Agite brevemente el tampón en un vórtex, luego gire hacia abajo y vuelva a ponerlo en hielo. **No agite la enzima en un vórtex**; en su lugar, invierta suavemente el tubo 3-5 veces, dé golpecitos para mezclar y, a continuación, centrifugue.
- Ajuste las muestras de ADN purificado a un volumen final de **32 µl** y transfíralas a un nuevo tubo de 8 tiras de 0,2 ml o a los pocillos de una placa. Mantenga las muestras en hielo.

Componente	Mezcla de reacción
Agua ultrapura	32 - X µl
Ácido nucleico purificado	X µl
<i>Volumen total</i>	32 µl

3. En hielo, prepare una solución de trabajo de **mezcla maestra para fragmentación de ADN** en función del número deseado de reacciones (incluido un excedente del 20 %, sin sobrepasarlo) utilizando la tabla siguiente.

Mezcla maestra de fragmentación de ADN	1X (µl)	___X (µl)
Tampón de fragmentación de ADN (10029101 o 10029098)	3,2	
Enzima de fragmentación de ADN (10029102 o 10029099) NO agite en vórtex, invierta 3-5 veces y dé golpecitos al tubo antes de añadirlo	4,8	
<i>Volumen total</i>	8	

- Mezcle en un agitador vórtex brevemente y centrifugue.
 - Mantenga la mezcla maestra en hielo.
4. Añada **8 µl** de mezcla maestra para fragmentación de ADN a cada muestra de entrada de **32 µl**.
- Mezcle en un agitador vórtex brevemente y centrifugue.
 - Vuelva a colocar los tubos en hielo.
5. Inicie el siguiente programa de termociclador y transfiera las reacciones al bloque únicamente una vez que la temperatura alcance los 4 °C. Detenga el programa si es necesario.
- Utilice una tapa calentada (≥100 °C).

Condiciones de incubación de la fragmentación del ADN

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	4	1
2	30	4
3	65	30
4	4	Mantener

- Una vez que el programa haya alcanzado los 4 °C, centrifugue brevemente las reacciones y colóquelas en hielo.

Paso 2: Reparación completa de extremos

- Descongele el **tampón de reparación completa de extremos** en hielo. Agite brevemente el tampón en un vórtex y luego mezcle las enzimas ya sea en un vórtex o pipeteando y, a continuación, centrifugue.
- En hielo, prepare una solución de trabajo de **mezcla maestra de reparación completa de extremos** en función del número deseado de reacciones (incluido un excedente del 20 %, sin sobrepasarlo) utilizando la tabla siguiente.

Mezcla maestra de reparación completa de extremos	1X (µl)	___X (µl)
Tampón de reparación completa de extremos (10029070 o 10029088)	8,86	
Enzima A de reparación completa de extremos (10029068 o 10029086)	1	
Enzima B de reparación completa de extremos (10029069 o 10029087)	0,14	
<i>Volumen total</i>	10	

- Mezcle en un agitador vórtex brevemente y centrifugue.
 - Mantenga la mezcla maestra en hielo.
3. A cada **40 µl** de muestra de ADN del paso 1: Fragmentación de ADN, añada **10 µl** de mezcla maestra para reparación completa de extremos.
- Mezcle en un agitador vórtex brevemente y centrifugue.
 - Vuelva a colocar los tubos en hielo.
4. Transfiera las reacciones a un termociclador precalentado e inicie una incubación utilizando el programa y las directrices siguientes:
- Tapa calentada quitada. Si la tapa sigue caliente, considere la posibilidad de utilizar un termociclador diferente o dejar la tapa abierta.

Condiciones de incubación de reparación completa de extremos

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	25	30
2	4	Mantener

- Coloque las muestras en el termociclador e inicie el programa.
- Una vez finalizado el ciclo, centrifugue brevemente las reacciones y colóquelas en hielo.

Limpieza de la reacción tras finalizar la reparación

Consulte el apartado Advertencias y precauciones de estas instrucciones de uso para obtener orientación sobre el trabajo con las microesferas de limpieza de reacción.

- Resuspenda completamente las microesferas de limpieza de reacción agitándolas en un vórtex.
- Retire los tubos del hielo y añada un volumen de **2,5X (125 µl)** de microesferas de limpieza de reacción a cada reacción de reparación completa de extremos.
- Agite en vórtex o pipetee 10 veces para mezclar e inspeccionar visualmente el color de la muestra con el fin de garantizar una mezcla homogénea.
- Incube durante **5 minutos** a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C).
- Centrifugue brevemente los tubos.
- Coloque los tubos en el imán durante **4 minutos o hasta que las microesferas se sedimenten completamente** contra la pared del tubo.
- Sin alterar el depósito de microesferas, utilice una pipeta para retirar y desechar el sobrenadante. Si el gránulo se desprende del imán y se extrae una parte de él al interior de la punta de la pipeta, vuelva a introducir el contenido en el tubo y repita el paso de incubación del imán.
- Lave las microesferas **dos veces** con etanol al 70 % mientras aún están en el imán. Para cada lavado:
 - Añada **180 µl** de etanol al 70 %.
 - Incube durante **30 segundos** a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C).
 - Retire con cuidado el etanol y deséchelo.
- Después del lavado final, utilice una pipeta (≤ 20 µl de capacidad) para eliminar por completo los residuos de sobrenadante visibles y deje que los tubos se sequen durante **3-5 minutos** a temperatura ambiente con las tapas abiertas. **Tenga cuidado de no secar en exceso las microesferas**, ya que esto disminuirá significativamente la recuperación (rendimiento) general de ácido nucleico.
- Eluya el ADN resuspendiendo las microesferas en **16 µl** de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.
***Tenga en cuenta que, para los flujos de trabajo automatizados, puede añadirse 1 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 al volumen de resuspensión de microesferas mostrado anteriormente. Este 1 µl adicional debe dejarse al extraer el ADN purificado en los próximos pasos.**
- Vuelva a colocar los tubos en el imán durante **2 minutos**.

Paso 3: Paso 1 de ligadura

- Descongele el **tampón del paso 1 de ligadura** en hielo. Agite brevemente el tampón en un vórtex y luego mezcle las enzimas ya sea en un vórtex o pipeteando y, a continuación, centrifugue.
- En hielo, prepare una solución de trabajo de **mezcla maestra para el paso 1 de ligadura** en función del número deseado de reacciones (incluido un excedente del 50 %, sin sobrepasarlo) utilizando la tabla siguiente.

Mezcla maestra para el paso 1 de ligadura	1X (µl)	___X (µl)
Tampón del paso 1 de ligadura (10029090 o 10029072)	3,7	
Enzima del paso 1 de ligadura (10029089 o 10029071)	0,3	
Volumen total	4	

- Mezcle en un agitador vórtex brevemente y centrifugue.
- Mantenga la mezcla maestra en hielo.
- Transfiera **16 µl** de ADN eluido del paso 2: Reparación completa de extremos en nuevos pocillos de placas o tubos de 8 tiras de 0,2 ml. Puede transferirse una pequeña cantidad de microesferas de limpieza de reacción.
- Añada **4 µl** de mezcla maestra para el paso 1 de ligadura a cada muestra.
 - Mezcle en un agitador vórtex brevemente y centrifugue.
 - Vuelva a colocar los tubos en hielo.
- Transfiera las reacciones a un termociclador precalentado e inicie una incubación utilizando el programa y las directrices siguientes:
 - Utilice una tapa calentada (≥ 100 °C).

Condiciones de incubación del paso 1 de ligadura

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	37	15
2	4	Mantener

- Coloque las muestras en el termociclador e inicie el programa.
- Una vez que el programa haya alcanzado los 4 °C, retire los tubos del bloque de temperatura, centrifugue brevemente las reacciones y colóquelas en hielo.

Limpieza de la reacción después del paso 1 de ligadura

Consulte el apartado Advertencias y precauciones de estas instrucciones de uso para obtener orientación sobre el trabajo con las microesferas de limpieza de reacción.

- Resuspenda completamente las microesferas de limpieza de reacción agitándolas en un vórtex.
- Retire los tubos del hielo y añada un volumen de **2,5X (50 µl)** de microesferas de limpieza de reacción a cada reacción del paso 1 de ligadura.
- Agite bien en vórtex o pipetee 10 veces para mezclar e inspeccionar visualmente el color de la muestra para garantizar una mezcla uniforme.
- Incube durante **5 minutos** a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C).
- Centrifugue brevemente los tubos.
- Coloque los tubos en el imán durante **4 minutos o hasta que las microesferas se sedimenten completamente** contra la pared del tubo.
- Sin alterar el depósito de microesferas, utilice una pipeta para retirar y desechar el sobrenadante. Si el gránulo se desprende del imán y se extrae una parte de él al interior de la punta de la pipeta, vuelva a introducir el contenido en el tubo y repita el paso de incubación del imán.
- Lave las microesferas **dos veces** con etanol al 70 % mientras aún están en el imán. Para cada lavado:
 - Añada **180 µl** de etanol al 70 %.
 - Incube durante **30 segundos** a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C).
 - Retire con cuidado el etanol y deséchelo.
- Después del lavado final, utilice una pipeta (≤20 µl de capacidad) para eliminar por completo los residuos de sobrenadante visibles y deje que los tubos se sequen durante **3-5 minutos** a temperatura ambiente con las tapas abiertas. Tenga cuidado de no secar en exceso las microesferas, ya que esto disminuirá significativamente la recuperación (rendimiento) general de ácido nucleico.
- Eluya el ADN resuspendiendo las microesferas en **25 µl** de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.
- Vuelva a colocar los tubos en el imán durante **2 minutos**.

Paso 4: Incorporación del adaptador MBC

- Descongele la **placa de adaptadores líquidos P5** (10029146 o 10029149). Centrifugue antes de destapar la placa. Puede perforarse el precinto de aluminio con una punta de pipeta para acceder a los adaptadores líquidos.

! Importante*: dado que este paso incorpora la etiqueta de índice P5 para el seguimiento a nivel de muestra, asegúrese de registrar qué adaptador MBC se está utilizando para cada muestra.
- Transfiera **23 µl** de ADN eluido de la limpieza después del paso 3: Paso 1 de ligadura anterior a nuevos tubos de 8 tiras de 0,2 ml o pocillos de placas. **Evite pipetear microesferas de limpieza de reacción en esta reacción.**
- Añada **2 µl** del **adaptador líquido MBC P5** exclusivo correspondiente para un total de **25 µl**. Vuelva a sellar la placa adaptadora utilizando un nuevo sello, después de haber añadido todos los adaptadores MBC P5 a las muestras correspondientes.
 - Mezcle agitando en vórtex y centrifugue.
 - Vuelva a colocar los tubos en hielo.
- Continúe inmediatamente con el paso 5: Paso 2 de ligadura.

Paso 5: Paso 2 de ligadura

- Descongele el **tampón del paso 2 de ligadura** en hielo. Agite bien el tampón en un vórtex y centrifugue. Mezcle las enzimas ya sea en un vórtex o pipeteando; a continuación, centrifugue
- En hielo, prepare una solución de trabajo de **mezcla maestra para el paso 2 de ligadura** en función del número deseado de reacciones (incluido un excedente del 20 %, sin sobrepasarlo) utilizando la tabla siguiente.

! Debido a la viscosidad de los componentes del tampón del paso 2 de ligadura, es esencial pipetear lentamente la solución madre al menos 10 veces y luego agitar en un vórtex durante 10 segundos ANTES de dividir en

alícuotas el volumen necesario para la solución de trabajo y de nuevo DESPUÉS de añadir la enzima del paso 2 de ligadura.

Mezcla maestra para el paso 2 de ligadura	1X (μl)	___X (μl)
Tampón del paso 2 de ligadura (10029092 o 10029074)	24,6	
Enzima del paso 2 de ligadura (10029091 o 10029073)	0,4	
<i>Volumen total</i>	25	

- Mezcle en un agitador vórtex brevemente y centrifugue.
 - Mantenga la mezcla maestra en hielo.
- Transfiera **25 μl** de mezcla maestra para el paso 2 de ligadura a cada tubo o pocillo que contenga los **25 μl** de cada muestra (ADN + adaptador líquido MBC) del paso 4: Incorporación del adaptador MBC anterior.
 - Mezcle bien y centrifugue. **Debido a la viscosidad de estos componentes, es necesario mezclar con cuidado con pipetas 10 veces, además de agitar en vórtex, para asegurar una mezcla completa.**
 - Vuelva a colocar los tubos en hielo.
 - Transfiera las reacciones a un termociclador precalentado e inicie una incubación utilizando el programa y las directrices siguientes:
 - Tapa calentada quitada

Condiciones de incubación del paso 2 de ligadura

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	22	5
2	4	Mantener

- Una vez que el programa haya alcanzado los 4 °C, centrifugue brevemente las reacciones y colóquelas en hielo.

– Punto de parada seguro: No hay problema en detener y conservar las reacciones entre –30 °C y –10 °C.

Limpieza de la reacción después del paso 2 de ligadura

! Precaución: Este paso utiliza las microesferas de limpieza de ligaduras (10029135 o 10029135) y el tampón de limpieza de ligaduras (10029144 o 10029136) en lugar de las microesferas de limpieza de reacción y etanol al 70 %. Asegúrese de utilizar las microesferas de limpieza de ligaduras y el tampón de limpieza de ligaduras que se incluyen con el kit para este paso.

Prepare las microesferas de limpieza de ligaduras:

- Resuspenda completamente las **microesferas de limpieza de ligaduras** agitándolas en un vórtex.
- Para cada reacción, pipetee **50 μl** de microesferas de limpieza de ligaduras en nuevos tubos de 8 tiras de 0,2 ml.
- Coloque tubo(s) en el imán durante **1 minuto o hasta que se sedimenten las microesferas**.
- Sin alterar el depósito de microesferas, utilice una pipeta para retirar y desechar el sobrenadante. Si el gránulo se desprende del imán y se extrae una parte de él al interior de la punta de la pipeta, vuelva a introducir el contenido en el tubo y repita el paso de sedimentación magnética.
- Pipetee **50 μl de tampón de limpieza de ligaduras** en cada tubo para resuspender las microesferas.

Procedimiento de limpieza de ligaduras:

! Precaución: Cuando agite los tubos de PCR en vórtex en los pasos siguientes, mantenga una presión firme sobre todas las tapas, ya que el detergente contenido puede hacer que se abran las tapas.

- Pipetee todo el volumen de reacción del paso 2 de la ligadura en los tubos con las microesferas de limpieza de ligaduras y el tampón.
- Mezcle las muestras en un vórtex.
- Incube las reacciones a temperatura ambiente durante **5 minutos**.
- Mezcle las muestras en un vórtex.
- Incube las reacciones a temperatura ambiente durante **5 minutos**.
- Centrifugue brevemente los tubos.
- Coloque los tubos en el imán durante **1 minuto o hasta que las microesferas estén completamente sedimentadas** contra la pared del tubo.
- Pipetee con cuidado y deseche el sobrenadante (**100 μl**) sin alterar las microesferas.
- Lave las microesferas **dos veces** con **tampón de limpieza de ligaduras**.
 - Resuspenda las microesferas en **180 μl** de tampón de limpieza de ligaduras agitando en vórtex, centrifugando brevemente y volviendo a colocarlas en el imán durante **1 minuto**.
 - Una vez que la suspensión se haya aclarado, deseche el sobrenadante.
- Lave las microesferas **una vez** con **agua ultrapura**:

- a. Resuspenda las microesferas en **180 µl** de agua ultrapura agitando en un vórtex, centrifugando brevemente y volviendo a colocarlas en el imán.
 - b. Una vez que la suspensión se haya aclarado, deseche el sobrenadante.
 - c. Asegúrese de que se haya retirado todo el sobrenadante de los tubos.
11. Eluya el ADN de las microesferas de limpieza de ligaduras:
- a. Resuspenda las microesferas de limpieza para ligadura en la cantidad de NaOH 5 mM indicada en el **prospecto específico del panel (A)**.
***Tenga en cuenta que, para los flujos de trabajo automatizados, puede añadirse 1 µl de NaOH 5 mM adicional al volumen de resuspensión de la microesfera de ligadura mostrado anteriormente. Este 1 µl adicional debe dejarse al extraer el ADN purificado en los próximos pasos.**
 - b. Transfiera las reacciones a un termociclador e inicie una incubación utilizando el programa y las directrices siguientes:
 - c. Utilice una tapa calentada (≥ 100 °C).

Condiciones de incubación de elución de ligadura

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	75	10
2	4	Mantener

- d. Una vez que la muestra haya alcanzado los 4 °C, centrifugue brevemente y transfírala al imán.

Paso 6: Primera PCR

1. Descongele el **tampón para la primera PCR 2.0 y GSP1** en hielo. Agite brevemente en vórtex y centrifugue el tampón y los cebadores. Mezcle las enzimas ya sea en un vórtex o pipeteando; a continuación, centrifugue.
2. En hielo, prepare una solución de trabajo de la **mezcla maestra para la primera PCR** en función del número deseado de reacciones (incluido un excedente del 20 %, sin sobrepasarlo) utilizando la tabla siguiente.

***Tenga en cuenta que la enzima para PCR también se utilizará en la segunda PCR, por lo que no deseche la enzima no utilizada después de realizar la mezcla maestra para la primera PCR.**

Mezcla maestra para la primera PCR	1X (µl)	___X (µl)
Tampón para la primera PCR 2.0 (10029094 o 10029076)	11,2	
Enzima para PCR (10029093 o 10029075)	0,8	
<i>Volumen total</i>	12	

- a. Mezcle en un agitador vórtex brevemente y centrifugue.
 - b. Mantenga la mezcla maestra en hielo.
3. Añada lo siguiente a nuevos tubos de 8 tiras de 0,2 ml o pocillos de placa:
 - a. **12 µl** de mezcla maestra para la primera PCR
 - b. GSP1 - Volumen indicado en el **prospecto específico del panel (B)**
***Tenga en cuenta que para los flujos de trabajo automatizados, los GSP para los paneles que se estén utilizando deben añadirse a su propia mezcla maestra en lugar de directamente a la muestra.**
 - c. Todo el volumen de ADN purificado del paso 5: Limpieza de ligaduras 2.
 4. Mezcle en un agitador vórtex brevemente y centrifugue.
 5. Vuelva a colocar los tubos en hielo.
 6. Transfiera las reacciones a un termociclador precalentado e inicie inmediatamente el programa indicado en el **prospecto específico del panel (primera reacción PCR)**.
 - a. Utilice una tapa calentada (≥ 100 °C).
 - b. Una vez que el programa haya alcanzado los 4 °C, centrifugue brevemente las reacciones y colóquelas en hielo. También es posible dejar los tubos en el termociclador a 4 °C durante la noche.

Limpieza de la reacción después de la primera PCR

Consulte el apartado **Advertencias y precauciones de estas instrucciones de uso** para obtener orientación sobre el trabajo con las microesferas de limpieza de reacción.

1. Resuspenda completamente las microesferas de limpieza de reacción agitándolas en un vórtex.
2. Añada un volumen de **0,8X (32 µl)** de microesferas de limpieza de reacción a cada reacción.
3. Agite en vórtex o pipetee 10 veces para mezclar e inspeccionar visualmente el color de la muestra con el fin de garantizar una mezcla homogénea.
4. Incube durante **5 minutos** a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C).
5. Centrifugue brevemente los tubos.

6. Coloque los tubos en el imán durante **4 minutos o hasta que las microesferas se sedimenten completamente** contra la pared del tubo.
7. Sin alterar el depósito de microesferas, utilice una pipeta para retirar y desechar el sobrenadante. Si el gránulo se desprende del imán y se extrae una parte de él al interior de la punta de la pipeta, vuelva a introducir el contenido en el tubo y repita el paso de incubación del imán.
8. Lave las microesferas **dos veces** con etanol al 70 % mientras aún están en el imán. Para cada lavado:
 - a. Añada **180 µl** de etanol al 70 %
 - b. Incube durante **30 segundos** a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C)
 - c. Retire con cuidado el etanol y deséchelo.
9. Después del lavado final, utilice una pipeta (≤ 20 µl de capacidad) para eliminar por completo los residuos de sobrenadante visibles y deje que los tubos se sequen durante **3-5 minutos** a temperatura ambiente con las tapas abiertas. **Tenga cuidado de no secar en exceso las microesferas**, ya que esto disminuirá significativamente la recuperación (rendimiento) general de ácido nucleico.
10. Eluya el ADN resuspendiendo las microesferas en el volumen de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 indicado en el **prospecto específico del panel (C)**.
11. Vuelva a colocar los tubos en el imán durante **2 minutos**.
12. Transfiera el volumen de eluato purificado en el **prospecto específico del panel (D)** a un nuevo tubo de PCR de 0,2 ml y vaya directamente al paso 7: Segunda PCR.

Paso 7: Segunda PCR

1. Descongele el **segundo tampón para PCR 2.0, GSP2** y la(s) **placa(s) de índices líquidos P7** (10029147 o 10029150) en hielo. Agite en vórtex el tampón y el GSP2 y, a continuación, centrifugue. Gire hacia abajo la placa P7 antes de destaparla. Puede perforarse el precinto de aluminio con una punta de pipeta para acceder a los adaptadores líquidos.
2. En hielo, prepare una solución de trabajo de la **mezcla maestra para la segunda PCR** en función del número deseado de reacciones (incluido un excedente del 20 %, sin sobrepasarlo) utilizando la tabla siguiente.

Mezcla maestra para la segunda PCR	1X (µl)	__X (µl)
Segundo tampón para PCR 2.0 (10029095 o 10029077)	11,2	
Enzima para PCR (10029093 o 10029075)	0,8	
<i>Volumen total</i>	12	

- a. Mezcle en un agitador vórtex brevemente y centrifugue.
- b. Mantenga la mezcla maestra en hielo.
3. Añada lo siguiente a nuevos tubos de 8 tiras de 0,2 ml o pocillos de placa:
 - a. **12 µl** de mezcla maestra para la segunda PCR
 - b. **4 µl** de índice líquido P7 correspondiente según la planificación del índice de la muestra. Vuelva a sellar la placa P7 utilizando un nuevo sello después de añadir el índice P7 a los pocillos correspondientes.
 - c. GSP2 - Volumen indicado en el **prospecto específico del panel (E)**.
***Tenga en cuenta que para los flujos de trabajo automatizados, los GSP para los paneles que se estén utilizando deben añadirse a su propia mezcla maestra en lugar de directamente a la muestra.**
 - d. Transfiera el volumen de ADN purificado del paso 6: Primera PCR indicado en el **prospecto específico del panel (D)**.
***Importante* Como este paso incorpora la etiqueta de índice P7 para el seguimiento a nivel de muestra, asegúrese de registrar qué índice líquido P7 se está utilizando para cada muestra.**
4. Mezcle en un agitador vórtex brevemente y centrifugue.
5. Vuelva a colocar los tubos en hielo.
6. Transfiera las reacciones a un termociclador precalentado e inicie inmediatamente el programa indicado en el **prospecto específico del panel (segunda reacción PCR)**.
 - a. Utilice una tapa calentada (≥ 100 °C).
 - b. Una vez que el programa haya alcanzado los 4 °C, centrifugue brevemente las reacciones y colóquelas en hielo. También es posible dejar los tubos en el termociclador a 4 °C durante la noche.

Limpieza de la reacción después de la segunda PCR

Consulte el apartado **Advertencias y precauciones de estas instrucciones de uso** para obtener orientación sobre el trabajo con las microesferas de limpieza de reacción.

1. Resuspenda completamente las microesferas de limpieza de reacción agitándolas en un vórtex.
2. Añada un volumen de **0,8X (32 µl)** de microesferas de limpieza de reacción a cada segunda reacción de PCR.

3. Agite en vórtex o pipetee 10 veces para mezclar e inspeccionar visualmente el color de la muestra con el fin de garantizar una mezcla homogénea.
4. Incube durante **5 minutos** a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C).
5. Centrifugue brevemente los tubos.
6. Coloque los tubos en el imán durante **4 minutos o hasta que las microesferas se sedimenten completamente** contra la pared del tubo.
7. Sin alterar el depósito de microesferas, utilice una pipeta para retirar y desechar el sobrenadante. Si el gránulo se desprende del imán y se extrae una parte de él al interior de la punta de la pipeta, vuelva a introducir el contenido en el tubo y repita el paso de incubación del imán.
8. Lave las microesferas **dos veces** con etanol al 70 % mientras aún están en el imán. Para cada lavado:
 - a. Añada **180 µl** de etanol al 70 %.
 - b. Incube durante **30 segundos** a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C).
 - c. Retire con cuidado el etanol y deséchelo.
9. Después del lavado final, utilice una pipeta (≤ 20 µl de capacidad) para eliminar por completo los residuos de sobrenadante visibles y deje que los tubos se sequen durante **3-5 minutos** a temperatura ambiente con las tapas abiertas. **Tenga cuidado de no secar en exceso las microesferas**, ya que esto disminuirá significativamente la recuperación (rendimiento) general de ácido nucleico.
10. Eluya el ADN resuspendiendo las microesferas en **20 µl** de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.
11. Vuelva a colocar los tubos en el imán durante **2 minutos**.
12. Transfiera **18 µl** de la solución purificada a un nuevo tubo de PCR de 0,2 ml. Asegúrese de evitar transferir las microesferas al nuevo tubo.
13. Deténgase o vaya directamente al paso 8: Cuantificar bibliotecas.

 **Punto de parada seguro:** No hay problema en detener y conservar las reacciones entre -30 °C y -10 °C.

Paso 8: Cuantificar bibliotecas

1. Cuantifique la concentración de cada biblioteca mediante qPCR siguiendo las instrucciones suministradas con el KAPA Universal Library Quantification Kit (Kit de cuantificación universal de bibliotecas KAPA).

 **Nota:** Las bibliotecas Archer están muy concentradas y pueden tener que diluirse en serie a 1:100 000 para la cuantificación con KAPA mediante qPCR.
2. Es posible utilizar la hoja de cálculo de la calculadora de carga para cuantificar, normalizar y secuenciar cálculos.
3. El factor de corrección de ajuste de tamaño recomendado para calcular la concentración de una biblioteca depende del tipo y la calidad de la entrada. Los valores de tamaño de fragmento calculados a continuación tienen en cuenta el tamaño del adaptador (157 pb) más la longitud media del fragmento insertado. Utilice un tamaño de fragmento estimado de 357 pb.
4. Utilice la cantidad de cada biblioteca para guiar la dilución de una alícuota para permitir la combinación de todas las bibliotecas normalizadas para crear una mezcla (pool) equimolar (p. ej., 10 nM).

 **Nota:** No se recomienda la cuantificación con un método fluorométrico o basado en electroforesis.

Control de calidad

Este producto se ha fabricado y comercializado de acuerdo con el sistema de gestión de calidad según la norma ISO 13485 de Integrated DNA Technologies, BV. El producto ha cumplido los requisitos de calidad de Integrated DNA Technologies.

Información de seguridad

Cuando se trabaje con productos químicos, utilizar siempre una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y protección ocular. Para obtener más información, consultar la ficha de datos de seguridad (safety data sheet, SDS) específica buscando en nuestro sitio web en <https://integrateddna-sds.thewerco.com/>.

Eliminación

Desechar el reactivo y el envase de acuerdo con las normativas locales.

Glosario de símbolos

Puede consultar un glosario de definiciones de símbolos en www.idtdna.com.

Símbolo	Descripción
	Inglés
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro

	Marcado Conformité Européene (CE)
	Representante autorizado en la Comunidad Europea/Unión Europea
	Número de catálogo del fabricante.
	Código de lote del fabricante.
	La fecha después de la cual no se debe utilizar el producto.
	Indica el fabricante.
	La fecha en que se fabricó el producto.
	El número total de pruebas que se pueden realizar con el producto.
	Límites de temperatura a los que puede exponerse el producto de forma segura.
	El usuario debe consultar las instrucciones de uso.
	Los símbolos de recordatorio llaman la atención sobre detalles menores que pueden pasarse fácilmente por alto y comprometer el procedimiento, lo que reduce el rendimiento del ensayo.
	Los símbolos de precaución indican pasos críticos en el procedimiento en los que existe riesgo de fallo del protocolo o daños al propio producto si no se observan cuidadosamente.
	Los símbolos de parada indican dónde puede suspenderse y reanudarse este procedimiento de forma segura más adelante sin riesgo de afectar al rendimiento del ensayo. Anote estos pasos y planifique su flujo de trabajo en consecuencia.
	Francés
	Italiano
	Español

Historial de versiones

Número de versión	Fecha de la versión	Descripción del cambio
01	04/2025	Documento nuevo
01	11/2025	Convertido a un nuevo tipo de documento (PRD-DOC-391 a RA-DOC-625). Contenido condensado, formatos de tabla y márgenes para la versión impresa. Se ha añadido a la tabla de definiciones. Se han añadido traducciones a otros idiomas (francés, español e italiano).



Información de contacto

 Integrated DNA Technologies

2425 55th St. Suite 100

Boulder, CO 80301

www.idtdna.com



Integrated DNA Technologies, BV

Interleuvenlaan 12 A

3001 Leuven, Bélgica

VARIANTPlex™-HT Dx flytande reagenser

Avsedd användning

För *in vitro*-diagnostisk användning.

Endast för professionellt bruk.

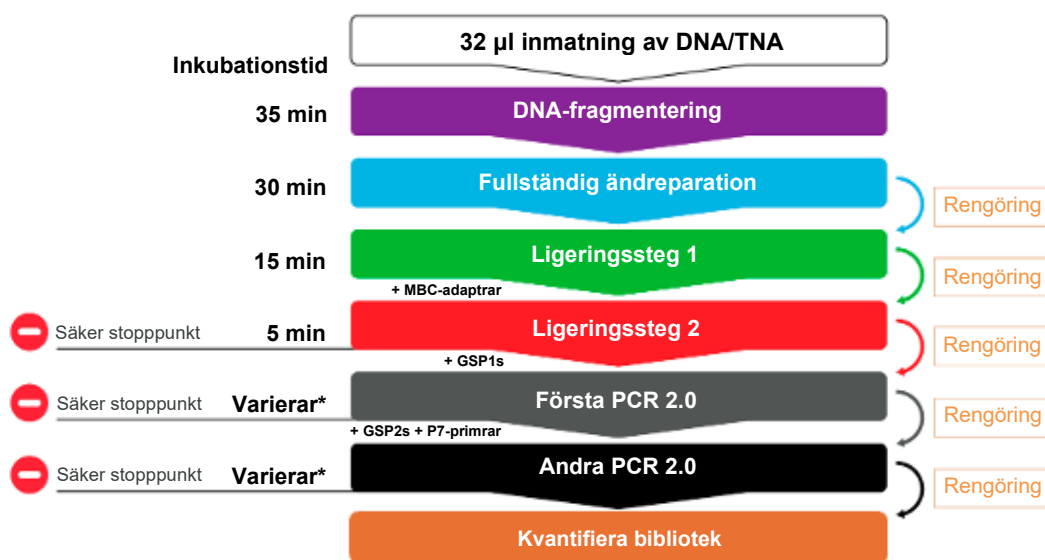
VARIANTPlex™-HT Dx är en uppsättning reagenser och förbrukningsvaror som används för beredning av provbibliotek, med manuella eller automatiserade metoder, från nukleinsyra (DNA eller TNA) extraherad från nyfryst eller formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad eller celler. Oligonukleotidpaneler som tillhandahålls av användaren krävs för beredning av bibliotek som riktar in sig på specifika genomiska områden av intresse. De genererade provbiblioteken innehåller P5- och P7-sekvenser för nedströms användning.

Sammanfattning och principer för förfarandet

Biblioteksberedning med hjälp av Anchored Multiplex PCR (AMP) är en snabb och skalbar metod för att generera målberikade bibliotek för NGS. AMP-teknik kan användas för applikationer i riktad DNA-sekvensering för att generera ett sekvenseringsbibliotek. Denna process är utformad för låg inmatning av nukleinsyra och ger robust prestanda.

AMP använder enriktade genspecifika primrar (GSP) som berikar för både kända och okända mutationer. Adaptrar som innehåller både molekylära streckkoder och provindex möjliggör kvantitativ multiplexdataanalys, deduplicering av avläsningar och korrekt mutationsbestämning.

Översikt över arbetsflöde



* Den första och andra PCR-tiden varierar beroende på den specifika GSP-panelen samt laboratoriets individuella cyklingsförhållanden. Se bipacksedeln för mer information.

Rekommendationer

- Läs igenom hela protokollet innan du börjar förbereda ditt bibliotek.
- Notera säkra stopppunkter under hela protokollet där prover säkert kan frysas (-30 °C till -10 °C) för att planera arbetsflödet.
- Torka av arbetsstationen och pipetter med rengöringsprodukter för nukleas och nukleinsyra (t.ex. RNase AWAY, Thermo Fisher Scientific).
- Om 96-brunnsplattor används, se till att de är fria från nukleas, att brunnarna är tillräckligt stora och att plattförselningarna är tillräckliga för att förhindra fuktförlust.

Varningar och försiktighetsåtgärder

- Använd god laboratoriesed för att förhindra kontaminering av prover med PCR-produkter.
- Använd nukleasfria PCR-rör, mikrocentrifugrör och pipettspetsar med aerosolbarriär.
- Kontrollera att den termocykel som används för biblioteksberedning är i gott skick och för närvarande kalibrerad enligt tillverkarens specifikationer. Vid användning av en termocykel med en 100 % ramphastighet >6 °C/sek, ställ in ramphastigheten på högst 6 °C/sek för första PCR och andra PCR.
- Se till att reaktionsreningskylor (som används upprepade gånger under hela arbetsflödet) ekvilibreras till rumstemperatur (20 °C till 25 °C) och resuspenderas helt före användning.
- Komponenterna i ligeringssteg 2 är viskösa och måste blandas helt före alikvotering.
- Använd inte reagenser efter det angivna utgångsdatumet.
- Rapportera omedelbart alla allvarliga tillbud relaterade till denna produkt till IDT och den behöriga myndigheten eller annan lokal tillsynsmyndighet där användaren och patienten bor.

Begränsningar

- För *in vitro*-diagnostisk användning.
- För användning med inmatningsmassor på 10 till 200 ng.
- De tillhandahållna enzymerna är känsliga för frekventa temperaturförändringar och potentiella frys-/upptiningshändelser.
- Enzymer fryser inte när de förvaras vid rekommenderat temperaturintervall för förvaring men kan frysas under transport.
- För bästa resultat rekommenderar vi att du förvarar enzymerna som tillhandahålls i en -20 °C bänkylbox och använder detta för att transportera enzymer mellan arbetsytor och frysar.
- Enzymkomponenter förblir stabila i upp till 5 nedfrysings-/upptiningscykler utan att påverka funktionen.
- Bufferterna fryser vid rekommenderad förvaringstemperatur och ska tinas på is före användning. För bästa resultat ska buffertar alikvoterats till lämpliga batchstorlekar för engångsbruk med tillräcklig överskottsmängd, så att alikvoterna inte återfrysas efter upptining. Inmatning av nukleinsyra (DNA) i EDTA-fri buffert (pH 7–8) eller ultrarent vatten är den optimala startmallen för AMP-biblioteksberedning. Använd INTE buffertar som innehåller EDTA.
- Kontakta teknisk support (archer-tech@idtdna.com) för rekommendationer om kommersiellt tillgängliga extraktionskit.
- Använd maximalt tillåten inmatningsmassa (200 ng) när så är möjligt. Högre inmatningskvantiteter möjliggör detektion av känsligare varianter.

Reagensberedning

- Volymerna som visas nedan måste ökas om du förbereder fler än 24 bibliotek.
- Gör minst **10 ml** färskt 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 från 1M Tris-HCl, pH 8,0 och ultrarent vatten.
 - Blanda **100 µl** 1M Tris-HCl, pH 8,0 med **9 900 µl** ultrarent vatten.
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 kan användas i upp till en vecka efter blandning.
- Bered minst **50 ml** färsk 70-procentig etanol från 100-procentig etanol och ultrarent vatten.
 - Tillsätt **35 ml** 100 % etanol till **15 ml** ultrarent vatten.
 - Stäng locket ordentligt för att minimera avdunstning när det inte används.
 - 70 % etanol är lämpligt för användning i upp till en vecka efter blandning.
- Bered minst **1 ml** färsk 5 mM NaOH arbetsstam från koncentrerad NaOH och ultrarent vatten.
 - Om du arbetar från 1 M NaOH, tillsätt **5 µl** 1 M NaOH till **995 µl** ultrarent vatten för att ge 5 mM slutlig NaOH.
 - Om du arbetar från 5 M, tillsätt **10 µl** 5 M NaOH till **990 µl** ultrarent vatten för att ge 50 mM NaOH. Blanda väl och centrifugera kortvarigt. Ta **100 µl** 50 mM NaOH och blanda med **900 µl** ultrarent vatten för att ge 5 mM NaOH. Blanda väl och centrifugera kortvarigt.

Produktkomponenter

Komponenterna i VARIANT[™]lex[™]-HT Dx-kitet listas enligt följande:
 VARIANT[™]lex[™]-HT Dx flytande reagenser – 96 reaktioner, REF 10029097
 VARIANT[™]lex[™]-HT Dx flytande reagenser – 24 reaktioner, REF 10029100
 Archer[™] reningsreagenser – 96 reaktioner, REF 10029134
 Archer[™] reningsreagenser – 24 reaktioner, REF 10029142
 Archer[™] adapterlösning Dx sats A – 96 reaktioner, REF 10029148
 Archer[™] adapterlösning Dx sats B – 96 reaktioner, REF 10029151

Tillhandahållet material

VARIANTPlex™-HT Dx flytande reagenser (96 reaktion, 10029097; 24 reaktion, 10029100)

Produkt	Innehåll	REF
DNA fragmenteringsbuffert	77 eller 308 µl reaktionsbuffert för enzymatisk DNA-skjuvning (-30 °C till -10 °C)	10029101, 10029098
DNA-fragmenteringsenzym	116 eller 416 µl enzym för klyvning av DNA (-30 °C till -10 °C)	10029102, 10029099
Buffert för fullständig ändreparation	213 eller 851 µl reaktionsbuffert för slutpolering (-30 °C till -10 °C)	10029070, 10029088
Enzym A för fullständig ändreparation	24 eller 96 µl vattenlösning innehållande glycerol och enzym (-30 °C till -10 °C)	10029068, 10029086
Enzym B för fullständig ändreparation	3,4 eller 13,5 µl vattenlösning innehållande glycerol och enzym (-30 °C till -10 °C)	10029069, 10029087
Ligeringssteg 1-buffert	89 eller 356 µl reaktionsbuffert till ligeringssteg 1 (-30 °C till -10 °C)	10029072, 10029090
Ligeringssteg 1-enzym	7,2 eller 29 µl vattenlösning innehållande glycerol och enzym (-30 °C till -10 °C)	10029071, 10029089
Ligeringssteg 2-buffert	591 eller 1 190 µl reaktionsbuffert till ligeringssteg 2 (-30 °C till -10 °C)	10029074, 10029092
Ligeringssteg 2-enzym	9,6 eller 38,5 µl vattenlösning innehållande glycerol och enzym (-30 °C till -10 °C)	10029073, 10029091
Första PCR-buffert 2.0	269 eller 1 076 µl reaktionsbuffert för första PCR (-30 °C till -10 °C)	10029076, 10029094
Andra PCR-buffert 2.0	269 eller 1 076 µl reaktionsbuffert för andra PCR (-30 °C till -10 °C)	10029077, 10029095
PCR-enzym	38,4 eller 154 µl vattenlösning innehållande glycerol och enzym (-30 °C till -10 °C)	10029075, 10029093

Archer™ reningsreagenser (24 reaktion, 10029142; 96 reaktion, 10029134)

Beskrivning	Innehåll och förvaringstemperatur	REF
Ligeringsreningskolor	1 200 µl rör med buffrad suspension av magnetiska kulor för infångning av ligerade produkter (2 till 8 °C).	10029135
Reningsbuffert för ligering	10,8 eller 43,2 ml buffrad lösning för tvättning av bindningsreaktioner vid ligering (2 °C till 8 °C)	10029144, 10029136
Reaktionsreningskolor	11,8 eller 35,2 ml buffrad suspension av magnetiska kulor för immobilisering av nukleinsyror (2 °C till 8 °C)	10029145, 10029137

Archer™ adapterlösning Dx kit (Set A 10029148; Set B 10029151)

Beskrivning	Innehåll och förvaringstemperatur	REF
<i>P5-adapterlösningssplatta A (Index 1–96)</i>	96-brunnssplatta som innehåller 2 µl MBC-adapteroligo (-30 °C till -10 °C)	10029146
<i>P7-indexlösningssplatta A (index 1–96)</i>	96-brunnssplatta som innehåller 4 µl av den andra PCR-indexprimer (-30 °C till -10 °C)	10029147
<i>P5-adapterlösningssplatta B (Index 97–192)</i>	96-brunnssplatta som innehåller 2 µl MBC-adapteroligo (-30 °C till -10 °C)	10029149
<i>P7-indexlösningssplatta B (index 97–192)</i>	96-brunnssplatta som innehåller 4 µl av den andra PCR-indexprimer (-30 °C till -10 °C)	10029150

Material som krävs men inte medföljer

- 1 M Tris-HCl, pH 8,0 (molekylbiologisk kvalitet)
- Ultrarent vatten (molekylbiologisk kvalitet)
- 200 mM Tris-HCl, pH 7,0 (för sekvensering)
- 100 % etanol (ACS-klassad), diverse
- Koncentrerad NaOH-lösning (ACS-klassad)
- RNase AWAY™ (Thermo Fisher Scientific-REF:7003)
- KAPA Universal Library Quantification Kit (KAPA Biosystems-REF:KKK4824)
- Standard PCR termocykler
- PCR-termocykler i realtid
- qPCR-rör
- 0,2 ml PCR-rör eller 96-brunnssplattor
- DynaMag™-96 Side Magnet (Thermo Fisher Scientific-REF:12331D)
- Mikrocentrifug
- Plattcentrifug
- Pipetter (P10, P20, P200 och P1000) (Pipetman eller motsvarande)
- Sterila, nukleasfria pipettspetsar med aerosolbarriär
- Vortexblandare
- PCR-rörets kylblock
- Handskar
- Qubit®-fluorometer (3.0 eller senare) (Thermo Fisher Scientific-REF:Q33216)
- Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific-REF:Q32854)
- Bänkfrysbox för 1,5 ml-rör, -20 °C, diverse
- Genspecifika primrar (kompatibla med Anchored Multiplex PCR)

Sammanfattning av prestandaegenskaper

En slutlig bibliotekskoncentration på 4 nM eller högre förväntas vid inmatningsmassor från 10 till 200 ng. Tabellen nedan sammanfattar prestandaresultaten för slutlig bibliotekskoncentration för VARIANTplex™-HT Dx. Alla resultat är godkända.

Primerpanel	Inmatningsbeskrivning (tillverkare och artikelnummer)	Inmatningsmassa (ng)	Replikat	Resultat (Godkänd-kriterier >90 % OPA)
<i>Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 3</i>	<i>Mimix Myeloid Cancer Panel (Horizon Discovery HD829)</i>	10	3	Godkänd
		50	3	
		200	3	
	<i>Vatten (Sigma-Aldrich W4502-50ML)</i>	0	5	Godkänd
<i>Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 4</i>	<i>Mimix™ Quantitative Multiplex, FFPE-referensstandard för IVD (Horizon Discovery HD200-IVD)</i>	10	3	Godkänd
		50	3	
		200	3	
	<i>Vatten (Sigma-Aldrich W4502-50ML)</i>	0	5	Godkänd

Procedur

Läs avsnittet "Arbeta med flytande reagenser" innan du börjar för ytterligare information om bästa praxis för enzymer och buffertar. Börja med att programmera termocyklern så att den inkluderar följande:

Inkubationsprogram	Steg	Temperatur (°C)	Tid (min)
DNA-fragmentering	1	4	1
	2	30	4
	3	65	30
	4	4	Håll
Andrasträngs-cDNA-syntes	1	16	60
	2	75	20
	3	4	Håll
Fullständig ändreparation (uppvärmt lock av)	1	25	30
	2	4	Håll
Ligeringssteg 1	1	37	15
	2	4	Håll
Ligeringssteg 2 (uppvärmt lock av)	1	22	5
	2	4	Håll
Ligeringseluering	1	75	10
	2	4	Håll

PCR-cykelprogram	Steg	Temperatur (°C)	Tid	Cykler
Första PCR	1	95	3 min	1
	2	95	30 sek	Varierar – Se panelens produktspecifika bipacksedel
	3	Varierar – Se panelens produktspecifika bipacksedel	10 sek	
	4		Varierar – Se panelens produktspecifika bipacksedel 100 % ramphastighet*	
	5	72	3 min	1
	6	4	Håll	1
Andra PCR	1	95	3 min	1
	2	95	30 sek	Varierar – Se panelens produktspecifika bipacksedel
	3	Varierar – Se panelens produktspecifika bipacksedel	10 sek	
	4		Varierar – Se panelens produktspecifika bipacksedel 100 % ramphastighet*	
	5	72	3 min	1
	6	4	Håll	1

*Se riktlinjer för ramphastighet i avsnittet "Varningar och försiktighetsåtgärder".

Steg 1: DNA-fragmentering

1. Tina **DNA-fragmentbufferten** på is. Vortexblanda bufferten kort, centrifugera ned och ställ tillbaka på is. **Vortexblanda inte enzymet**, vänd i stället röret försiktigt upp och ned 3–5 gånger och blanda genom att knäppa lätt på röret, centrifugera därefter ned.
2. Justera renade DNA-prover till en slutlig volym på **32 µl** och överför till ett nytt 0,2 ml 8-striprör eller plattbrunnar. Förvara proverna på is.

Komponent	Reaktionsblandning
Ultrarent vatten	32 – Xµl
Renad nukleinsyra	Xµl
<i>Total volym</i>	32 µl

3. På is, gör en **masterblandning till DNA-fragmentering** baserat på önskat antal reaktioner (inklusive men inte över 20 % överskott) med hjälp av tabellen nedan.

Masterblandning till DNA-fragmentering	1X (µl)	___X (µl)
Buffert till DNA-fragmentering (10029101 eller 10029098)	3,2	
DNA-fragmenteringsenzym (10029102 eller 10029099) Vortexblanda INTE, invertera INTE 3–5x- och knäpp lätt på röret innan du tillsätter	4,8	
Total volym	8	

- Blanda genom att kortvarigt vortexblanda och centrifugera ned.
 - Förvara masterblandningen på is.
4. Till varje **32 µl** inmatningsprov tillsätts **8 µl** masterblandning för DNA-fragmentering.
- Blanda genom att kortvarigt vortexblanda och centrifugera ned.
 - Sätt tillbaka rören på is.
5. Starta följande termocyklerprogram och överför endast reaktioner till blocket när temperaturen når 4 °C. Pausa programmet vid behov.

-  a. Använd ett uppvärmt lock (≥100 °C).

Inkubationsförhållanden för DNA-fragmentering

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minuter)
1	4	1
2	30	4
3	65	30
4	4	Håll

- När programmet har nått 4 °C, centrifugera snabbt ned reaktionerna och placera dem på is.

Steg 2: Fullständig ändreparation

1. Tina **bufferten för fullständig ändreparation** på is. Vortexblanda bufferten en kort stund och vortexblanda eller pipettera sedan enzymer och centrifugera sedan ned.
2. På is, gör en **masterblandning för fullständig ändreparation** baserat på önskat antal reaktioner (inklusive men inte över 20 % överskott) med hjälp av tabellen nedan.

Masterblandning för fullständig ändreparation	1X (µl)	___X (µl)
Buffert för fullständig ändreparation (10029070 eller 10029088)	8,86	
Enzym A för fullständig ändreparation (10029068 eller 10029086)	1	
Enzym B för fullständig ändreparation (10029069 eller 10029087)	0,14	
Total volym	10	

- Blanda genom att kortvarigt vortexblanda och centrifugera ned.
 - Förvara masterblandningen på is.
3. Till varje **40 µl** DNA-prov från steg 1: DNA-fragmentering, tillsätt **10 µl** av masterblandningen för fullständig ändreparation.
- Blanda genom att kortvarigt vortexblanda och centrifugera ned.
 - Sätt tillbaka rören på is.
4. Överför reaktionerna till en förvärm termocykel och starta en inkubation med hjälp av följande program och riktlinjer:
-  a. Uppvärm lock av. Om locket fortfarande är varmt, överväg att använda en annan termocykel eller lämna locket öppet.

Inkubationsförhållanden för fullständig ändreparation

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minuter)
1	25	30
2	4	Håll

- Placera proverna i termocyklern och starta programmet.
- När körningen är klar, centrifugera snabbt ned reaktionerna och placera dem på is.

Reaktionsrening efter fullständig ändreparation

Se avsnittet Varningar och försiktighetsåtgärder i denna bruksanvisning för vägledning om arbete med reaktionsreningskylor.

1. Resuspendera reaktionsreningskylor helt genom vortexblandning.
2. Ta upp rören från isen och tillsätt **2,5X** volym (**125 µl**) reaktionsreningskylor till varje fullständig ändreparationsreaktion.
3. Vortexblanda väl eller pipettera 10 gånger för att blanda och inspektera provets färg visuellt för att säkerställa en homogen blandning.
4. Inkubera i **5 minuter** vid rumstemperatur (20 °C till 25 °C).
5. Centrifugera rören kortvarigt.
6. Placera rören på magneten i **4 minuter eller tills kulorna är helt pelleterade** mot rörväggen.
7. Använd en pipett för att avlägsna och kassera supernatanten utan att störa de pelleterade kulorna. Om pelleten rubbas från magneten och en del dras in i pipettspetsen, sätt tillbaka innehållet i röret och upprepa magnetinkuberingssteget.
8. Tvätta kulorna **två gånger** med 70 % etanol medan de fortfarande sitter på magneten. För varje tvätt:
 - a. Tillsätt **180 µl** 70 % etanol.
 - b. Inkubera i **30 sekunder** vid rumstemperatur (20 °C till 25 °C).
 - c. Ta försiktigt bort etanolen och kassera den.
9. Efter den sista tvätten, använd en pipett (≤20 µl kapacitet) för att helt avlägsna synliga supernatantresten och låt rören torka i **3–5 minuter** vid rumstemperatur med öppna lock. **Var noga med att inte övertorka kulorna** eftersom detta avsevärt minskar den totala slutliga nukleinsyrakoncentrationen.
10. Eluera DNA genom att resuspendera kulorna i **16 µl** 10mM Tris-HCl, pH 8,0.
***Observera att för automatiserade arbetsflöden är det acceptabelt att tillsätta 1 µl 10mM Tris-HCl, pH 8,0 till volymen för kulresuspension som visas ovan. Denna extra 1 µl ska lämnas kvar när renat DNA avlägsnas i kommande steg.**
11. Sätt tillbaka rören på magneten i **2 minuter**.

Steg 3: Ligeringssteg 1

1. Tina **ligeringssteg 1-bufferten** på is. Vortexblanda bufferten en kort stund och vortexblanda eller pipettera sedan enzymer och centrifugera sedan ned.
2. På is, gör en **ligeringssteg 1-masterblandning** som arbetslösning baserat på önskat antal reaktioner (inklusive men inte över 50 % överskott) med hjälp av tabellen nedan.

Ligeringssteg 1-masterblandning	1X (µl)	___X (µl)
Ligeringssteg 1-buffert (10029090 eller 10029072)	3,7	
Ligeringssteg 1-enzym (10029089 eller 10029071)	0,3	
Total volym	4	

- a. Blanda genom att kortvarigt vortexblanda och centrifugera ned.
- b. Förvara masterblandningen på is.
3. Överför **16 µl** eluerat DNA från steg 2: Fullständig ändreparation i nya 0,2 ml 8-striprör eller plattbrunnar. Det är acceptabelt att en liten mängd reaktionsreningskylor överförs.
4. Tillsätt **4 µl** ligeringssteg 1-masterblandning till varje prov.
 - a. Blanda genom att kortvarigt vortexblanda och centrifugera ned.
 - b. Sätt tillbaka rören på is.
5. Överför reaktionerna till en förvärmad termocykel och starta en inkubation med hjälp av följande program och riktlinjer:
 - a. Använd ett uppvärmt lock (≥100 °C).

Ligeringssteg 1 inkubationsförhållanden

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minuter)
1	37	15
2	4	Håll

- b. Placera proverna i termocyklern och starta programmet.
- c. När programmet har nått 4 °C, ta ut rören ur temperaturblocket, centrifugera snabbt ned reaktionerna och placera dem på is.

Reaktionsrening efter ligerings steg 1

Se avsnittet Varningar och försiktighetsåtgärder i denna bruksanvisning för vägledning om arbete med reaktionsreningskylor.

1. Resuspendera reaktionsreningskylor helt genom vortexblandning.
2. Ta upp rören från isen och tillsätt **2,5X** volym (**50 µl**) reaktionsreningskylor till varje ligeringssteg 1-reaktion.
3. Vortexblanda väl eller pipettera 10 gånger för att blanda och inspektera provets färg visuellt för att säkerställa en jämn blandning.
4. Inkubera i **5 minuter** vid rumstemperatur (20 °C till 25 °C).
5. Centrifugera rören kortvarigt.
6. Placera rören på magneten i **4 minuter eller tills kulorna är helt pelleterade** mot rörväggen.
7. Använd en pipett för att avlägsna och kassera supernatanten utan att störa de pelleterade kulorna. Om pelleten rubbas från magneten och en del dras in i pipettspetsen, sätt tillbaka innehållet i röret och upprepa magnetinkuberingssteget.
8. Tvätta kulorna **två gånger** med 70 % etanol medan de fortfarande sitter på magneten. För varje tvätt:
 - a. Tillsätt **180 µl** 70 % etanol.
 - b. Inkubera i **30 sekunder** vid rumstemperatur (20 °C till 25 °C).
 - c. Ta försiktigt bort etanolen och kassera den.
9. Efter den sista tvätten, använd en pipett (≤20 µl kapacitet) för att helt avlägsna synliga supernatantresten och låt rören torka i **3–5 minuter** vid rumstemperatur med öppna lock. Var noga med att inte övertorka kulorna eftersom detta avsevärt minskar den totala slutliga nukleinsyrakoncentrationen.
10. Eluera DNA genom att resuspendera kulorna i **25 µl** 10 mM Tris-HCl, pH 8,0.
11. Sätt tillbaka rören på magneten i **2 minuter**.

Steg 4: Inklusion av MBC-adapter

1. Tina **P5-adapterlösningsskivan(-orna)** (10029146 eller 10029149). Centrifugera ned innan skivan öppnas. Det är acceptabelt att penetrera folieförseglingen med en pipettspets för att komma åt adapterlösningarna.
- ! ***Viktigt*** Eftersom detta steg införlivar **P5-indexetiketten** för spårning på provnivå, ska du säkerställa att vilken **MBC-adapter** som används för varje prov dokumenteras.
2. Överför **23 µl** eluerat DNA från rensningen efter steg 3: Ligeringssteg 1 ovan till nya 0,2 ml 8-striprör eller plattbrunnar. **Undvik att pipettera reaktionsreningskylor i denna reaktion.**
3. Tillsätt **2 µl** av respektive unik **P5 MBC-adapterlösningen** i totalt **25 µl**. Försegla adapterskivan igen med en ny försegling efter att alla P5 MBC-adapterar har lagts till i respektive prov.
 - a. Blanda genom att vortexa och centrifugera.
 - b. Sätt tillbaka rören på is.
4. Fortsätt omedelbart till steg 5: Ligeringssteg 2.

Steg 5: Ligeringssteg 2

1. Tina **ligeringssteg 2-bufferten** på is. Vortexblanda bufferten väl och centrifugera. Vortexblanda eller pipettera enzymer och centrifugera sedan ned dem.
2. På is, gör en **ligeringssteg 2-masterblandning** som arbetslösning baserat på önskat antal reaktioner (inklusive men inte över 20 % överskott) med hjälp av tabellen nedan.
- ! **På grund av viskositeten hos komponenterna i ligeringssteg 2-bufferten är det nödvändigt att långsamt pipettblanda stamlösningen minst 10 gånger och därefter vortexblanda i 10 sekunder INNAN den erforderliga volymen alikvoterar för arbetslösningen, samt återigen EFTER tillsats av ligeringssteg 2-enzymet.**

Ligeringssteg 2-masterblandning	1X (µl)	___X (µl)
Ligeringssteg 2-buffert (10029092 eller 10029074)	24,6	
Ligeringssteg 2-enzym (10029091 eller 10029073)	0,4	
Total volym	25	

- a. Blanda genom att kortvarigt vortexblanda och centrifugera ned.
 - b. Förvara masterblandningen på is.
3. Överför **25 µl** ligeringssteg 2-masterblandningen till varje rör eller brunn som innehåller **25 µl** av respektive prov (DNA + MBC-adapterlösningen) från steg 4: Inklusion av MBC-adapter ovan.
 - a. Blanda väl och centrifugera. **På grund av dessa komponenters viskositet krävs pipettblandning försiktigt 10 gånger utöver vortexblandning för att säkerställa fullständig blandning.**
 - b. Sätt tillbaka rören på is.

4. Överför reaktionerna till en förvärmad termocykel och starta en inkubation med hjälp av följande program och riktlinjer:

a. Uppvärm lock av

Ligeringssteg 2 inkubationsförhållanden

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minuter)
1	22	5
2	4	Håll

b. När programmet har nått 4 °C, centrifugera snabbt ned reaktionerna och placera dem på is.

– Säker stopppunkt: Det är OK att stoppa och förvara reaktionerna vid -30 °C till -10 °C.

Reaktionsrening efter ligeringssteg 2

! Försiktighet: Detta steg använder ligeringsreningskylor (10029135 eller 10029135) och ligeringsreningsbuffert (10029144 eller 10029136) istället för reaktionsreningskylor och 70 % etanol. Se till att använda ligeringsreningskylor och ligeringsreningsbuffert som medföljer kitet för detta steg.

Förbered ligeringsreningskylorna:

1. Resuspendera **ligeringsreningskylorna** helt genom vortexblandning.
2. Pipettera **50 µl** ligeringsreningskylor till nya 0,2 ml 8-striprör eller plattbrunnar.
3. Placera rör(en) på magneten i **1 minut eller tills kylorna har pelleterats**.
4. Använd en pipett för att avlägsna och kassera supernatanten utan att störa de pelleterade kylorna. Om pelleten rubbas från magneten och en del dras in i pipettspetsen, sätt tillbaka innehållet i röret och upprepa magnetpelleteringssteget.
5. Pipettera **50 µl ligeringsreningsbuffert** i varje rör för att resuspendera kylorna.

Reningsprocedur för ligering:

! Försiktighet: Vid vortexblandning av PCR-rör i efterföljande steg ska ett stadigt tryck bibehållas på alla lock eftersom det inneslutna rengöringsmedlet kan göra att locken öppnas.

1. Pipettera hela volymen av ligeringssteg 2-reaktionen i rören med ligeringsreningskylor och -reningsbuffert.
2. Blanda proverna genom vortexblandning.
3. Inkubera reaktionerna vid rumstemperatur i **5 minuter**.
4. Blanda proverna genom vortexblandning.
5. Inkubera reaktionerna vid rumstemperatur i **5 minuter**.
6. Centrifugera rören kortvarigt.
7. Placera rören på magneten i **1 minut eller tills kylorna är helt pelleterade** mot rörväggen.
8. Pipettera försiktigt av och kassera supernatanten (**100 µl**) utan att störa kylorna.
9. Tvätta kylorna **två gånger** med **ligeringsreningsbuffert**.
 - a. Resuspendera mikrosfärerna i **180 µl** ligeringsreningsbuffert genom att vortexa, kortvarigt centrifugera ned och sätta tillbaka dem på magneten i **1 minut**.
 - b. När suspensionen har rensats kassera supernatanten.
10. Tvätta kylorna **en gång** med **ultrarent vatten**:
 - a. Resuspendera kylorna i **180 µL** ultrarent vatten genom att vortexa, kortvarigt centrifugera ned och sätta tillbaka dem på magneten.
 - b. När suspensionen har rensats kassera supernatanten.
 - c. Se noga till att all supernatant har avlägsnats från rören.
11. Eluera DNA från ligeringsreningskylor:
 - a. Resuspendera ligeringsreningskylor i en mängd på 5 mM NaOH som specificeras i panelens produktspecifika **bipacksedel (A)**.
***Observera att för automatiserade arbetsflöden är det acceptabelt att lägga till ytterligare 1 µl 5 mM NaOH till volymen ligeringskyluresuspension som visas ovan. Denna extra 1 µl ska lämnas kvar när renat DNA avlägsnas i kommande steg.**
 - b. Överför reaktionerna till en termocykel och påbörja en inkubation med hjälp av följande program och riktlinjer:

c. Använd ett uppvärmt lock (≥100 °C).

Inkubationsförhållanden för ligeringseluering

Steg	Temperatur (°C)	Tid (minuter)
1	75	10
2	4	Håll

d. När provet har nått 4 °C, centrifugera snabbt ned och överför till magneten.

Steg 6: Första PCR

1. Tina den **första PCR-bufferten 2.0** och **GSP1** på is. Vortexblanda och centrifugera snabbt buffert och primrar. Vortexblanda eller pipettera enzymer och centrifugera sedan ned dem.
2. På is, gör en arbetslösning för **första PCR-masterblandningen** baserat på önskat antal reaktioner (inklusive men inte över 20 % överskott) med hjälp av tabellen nedan.

***Observera att PCR-enzymet också kommer att användas i andra PCR så kassera inte oanvänt enzym efter att första PCR-masterblandningen har gjorts.**

Första PCR-masterblandningen	1X (µl)	___X (µl)
Första PCR-buffert 2.0 (10029094 eller 10029076)	11,2	
PCR-enzym (10029093 eller 10029075)	0,8	
Total volym	12	

- a. Blanda genom att kortvarigt vortexblanda och centrifugera ned.
 - b. Förvara masterblandningen på is.
3. Till nya 0,2 ml 8-striprör eller plattbrunnar, tillsätt:
 - a. **12 µl** första PCR-masterblandning
 - b. GSP1 – Volym som specificeras i panelens produktspecifika **bipacksedel (B)**
***Observera att för automatiserade arbetsflöden ska GSP för sin/a panel(er) som används läggas till i sin egen masterblandning istället för direkt i provet.**
 - c. Hela volymen renat DNA från steg 5: Ligering 2 rening.
 4. Blanda genom att kortvarigt vortexblanda och centrifugera ned.
 5. Sätt tillbaka rören på is.
 6. Överför reaktionerna till en förvärm termocykel och starta omedelbart det program som specificeras i panelens produktspecifika **bipacksedel (första PCR-reaktionen)**.
 - a. Använd ett uppvärmt lock ($\geq 100^{\circ}\text{C}$).
 - b. När programmet har nått 4°C , centrifugera snabbt ned reaktionerna och placera dem på is. Det är också acceptabelt att lämna rören i termocykeln vid 4°C över natten.

Reaktionsrengöring efter första PCR

Se avsnittet **Varningar och försiktighetsåtgärder** i denna bruksanvisning för vägledning om arbete med reaktionsreningskylor.

1. Resuspendera reaktionsreningskylor helt genom vortexblandning.
2. Tillsätt **0,8X** volym (**32 µl**) reaktionsreningskylor till varje reaktion.
3. Vortexblanda väl eller pipettera 10 gånger för att blanda och inspektera provets färg visuellt för att säkerställa en homogen blandning.
4. Inkubera i **5 minuter** vid rumstemperatur (20°C till 25°C).
5. Centrifugera rören kortvarigt.
6. Placera rören på magneten i **4 minuter eller tills kulorna är helt pelleterade** mot rörväggen.
7. Använd en pipett för att avlägsna och kassera supernatanten utan att störa de pelleterade kulorna. Om pelleten rubbas från magneten och en del dras in i pipettspetsen, sätt tillbaka innehållet i röret och upprepa magnetinkuberingssteget.
8. Tvätta kulorna **två gånger** med 70 % etanol medan de fortfarande sitter på magneten. För varje tvätt:
 - a. Tillsätt **180 µl** 70 % etanol
 - b. Inkubera i **30 sekunder** vid rumstemperatur (20°C till 25°C)
 - c. Ta försiktigt bort etanolen och kassera den
9. Efter den sista tvätten, använd en pipett (≤ 20 µl kapacitet) för att helt avlägsna synliga supernatantresten och låt rören torka i **3–5 minuter** vid rumstemperatur med öppna lock. **Var noga med att inte övertorka kulorna** eftersom detta avsevärt minskar den totala slutliga nukleinsyrakoncentrationen.
10. Eluera DNA genom att resuspendera mikrosfärerna i volymen 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 specificerat i panelens produktspecifika **bipacksedel (C)**.
11. Sätt tillbaka rören på magneten i **2 minuter**.
12. Överför volymen av renat eluat från panelens produktspecifika **bipacksedel (D)** till ett nytt 0,2 ml PCR-rör och fortsätt direkt till steg 7: Andra PCR.

Steg 7: Andra PCR

1. Tina den **andra PCR-bufferten 2.0, GSP2 och P7-indexlösningsplatta(or)** (10029147 eller 10029150) på is. Vortexblanda bufferten och GSP2 och centrifugera sedan ned. Centrifugera P7-plattan innan den öppnas. Det är acceptabelt att penetrera folieförseglingen med en pipettspets för att komma åt adapterlösningarna.
2. På is, gör en arbetslösning för **andra PCR-masterblandningen** baserat på önskat antal reaktioner (inklusive men inte över 20 % överskott) med hjälp av tabellen nedan.

Andra PCR-masterblandningen	1X (µl)	___X (µl)
Andra PCR-buffert 2.0 (10029095 eller 10029077)	11,2	
PCR-enzym (10029093 eller 10029075)	0,8	
Total volym	12	

- a. Blanda genom att kortvarigt vortexblanda och centrifugera ned.
 - b. Förvara masterblandningen på is.
3. Till nya 0,2 ml 8-striprör eller plattbrunnar, tillsätt:
 - a. **12 µl** andra PCR-masterblandning
 - b. **4 µl** av respektive P7-indexlösning enligt provindexplaneringen Försegla P7-plattan igen med en ny försegling efter att P7-index har lagts till i respektive brunnar.
 - c. GSP2 – Volym specificerad i panelens produktspecifika **bipacksedel (E)**.
***Observera att för automatiserade arbetsflöden ska GSP för sin/a panel(er) som används läggas till i sin egen masterblandning istället för direkt i provet.**
 - d. Överför volymen renat DNA från steg 6: Första PCR som specificeras i panelens produktspecifika **bipacksedel (D)**.
***Viktigt* Eftersom detta steg införlivar P7-indexetiketten för spårning på provnivå, ska du säkerställa att vilken P7-indexlösning som används för varje prov dokumenteras.**
 4. Blanda genom att kortvarigt vortexblanda och centrifugera ned.
 5. Sätt tillbaka rören på is.
 6. Överför reaktionerna till en förvärm termocykel och starta omedelbart det program som specificeras i panelens produktspecifika **bipacksedel (andra PCR-reaktionen)**.
 - a. Använd ett uppvärmt lock ($\geq 100^{\circ}\text{C}$).
 - b. När programmet har nått 4°C , centrifugera snabbt ned reaktionerna och placera dem på is. Det är också acceptabelt att lämna rören i termocykeln vid 4°C över natten.

Reaktionsrening efter andra PCR

Se avsnittet Varningar och försiktighetsåtgärder i denna bruksanvisning för vägledning om arbete med reaktionsreningskylor.

1. Resuspendera reaktionsreningskylor helt genom vortexblandning.
2. Tillsätt **0,8X** volym (**32 µl**) reaktionsreningskylor till varje andra PCR-reaktion.
3. Vortexblanda väl eller pipettera 10 gånger för att blanda och inspektera provets färg visuellt för att säkerställa en homogen blandning.
4. Inkubera i **5 minuter** vid rumstemperatur (20°C till 25°C).
5. Centrifugera rören kortvarigt.
6. Placera rören på magneten i **4 minuter eller tills kulorna är helt pelleterade** mot rörväggen.
7. Använd en pipett för att avlägsna och kassera supernatanten utan att störa de pelleterade kulorna. Om pelleten rubbas från magneten och en del dras in i pipettspetsen, sätt tillbaka innehållet i röret och upprepa magnetinkuberingssteget.
8. Tvätta kulorna **två gånger** med 70 % etanol medan de fortfarande sitter på magneten. För varje tvätt:
 - a. Tillsätt **180 µl** 70 % etanol.
 - b. Inkubera i **30 sekunder** vid rumstemperatur (20°C till 25°C).
 - c. Ta försiktigt bort etanolen och kassera den.
9. Efter den sista tvätten, använd en pipett (≤ 20 µl kapacitet) för att helt avlägsna synliga supernatantresten och låt rören torka i **3–5 minuter** vid rumstemperatur med öppna lock. **Var noga med att inte övertorka kulorna** eftersom detta avsevärt minskar den totala slutliga nukleinsyrakoncentrationen.
10. Eluera DNA genom att resuspendera kulorna i **20 µl** 10 mM Tris-HCl, pH 8,0.
11. Sätt tillbaka rören på magneten i **2 minuter**.
12. Överför **18 µl** av den renade lösningen till ett nytt 0,2 ml PCR-rör. Var noga med att undvika överföring av kylor till det nya röret.
13. Stoppa eller fortsätt direkt till steg 8: Kvantifiera bibliotek.



Säker stoppunkt: Det är OK att stoppa och förvara reaktionerna vid -30°C till -10°C .

Steg 8: Kvantifiera bibliotek

1. Kvantifiera koncentrationen i varje bibliotek med qPCR enligt instruktionerna som medföljer KAPA Universal Library Quantification Kit.
Obs! Archer-bibliotek är mycket koncentrerade och kan behöva serieutspättas till 1:100 000 för kvantifiering med KAPA via qPCR.
 2. Kalkylbladet laddningskalkylator kan användas för kvantifiering, normalisering och sekvenseringsberäkningar.
 3. Den rekommenderade korrigeringsfaktorn för storleksjustering för beräkning av koncentrationen i ett bibliotek beror på inmatningstyp och kvalitet. De uppskattade värdena för fragmentstorlek nedan står för adapterstorlek (157 bp) plus genomsnittlig insatsfragmentlängd. Använd en uppskattad fragmentstorlek på 357 bp.
 4. Använd varje biblioteks kvantitet för att vägleda spädning av en delvolym för att möjliggöra kombination av alla normaliserade bibliotek för att skapa en ekvimolär pool (t.ex. 10nM).
- Obs! Kvantifiering med en fluorometrisk eller elektroforesbaserad metod rekommenderas inte.**

Kvalitetskontroll

Denna produkt tillverkades och släpptes i enlighet med kvalitetshanteringssystemet Integrated DNA Technologies, BV, ISO 13485. Produkten har uppfyllt kvalitetskrav från Integrated DNA Technologies.

Säkerhetsinformation

När du arbetar med kemikalier ska du alltid använda lämplig laboratorierock, engångshandskar och ögonskydd. För mer information, se det specifika säkerhetsdatabladet (SDS) genom att söka på vår webbplats på <https://integrateddna-sds.thewerco.com/>.

Kassering

Kassera reagens och förpackning i enlighet med lokala bestämmelser.

Symbolordlista

En ordlista med symboldefinitioner finns tillgänglig som referens på www.idtdna.com.

Symbol	Beskrivning
	Engelska
	In vitro-diagnostisk medicinteknisk produkt
	Conformité Européene (CE)-märke
	Auktoriserad representant i Europeiska gemenskapen/Europeiska unionen
	Tillverkarens katalognummer.
	Tillverkarens batchkod.
	Det datum efter vilket produkten inte ska användas.
	Anger tillverkaren.
	Det datum då produkten tillverkades.
	Det totala antalet tester som kan utföras med produkten.
	Temperaturgränserna för vilka produkten säkert kan exponeras.
	Användaren ska läsa bruksanvisningen.
	Påminnelse-symboler uppmärksammar smärre detaljer som lätt kan förbises och äventyra proceduren, vilket leder till minskad analysprestanda.
	Försiktighetssymboler betecknar kritiska steg i proceduren där risken för protokolfel eller skada på själva produkten kan uppstå om den inte observeras noggrant.
	Stoppsymboler indikerar var denna procedur säkert kan avbrytas och återupptas vid en senare tidpunkt utan risk för äventyrad analysprestanda. Notera dessa steg och planera arbetsflödet därefter.
	Franska
	Italienska
	Spanska

Versionshistorik

Versionsnummer	Versionsdatum	Beskrivning av ändring
01	04/2025	Nytt dokument
01	11/2025	Konverterat till nytt dokumentformat (PRD-DOC-391 till RA-DOC-625). Förkortat innehåll, tabellformat och marginaler för utskriftsversionen. Lade till definitionstabellen. Lade till översättningar för andra språk (franska, spanska och italienska).



Kontaktinformation

 **Integrated DNA Technologies**

2425 55th St. Suite 100
Boulder, CO 80301

www.idtdna.com



Integrated DNA Technologies, BV
Interleuvenlaan 12 A
3001 Leuven, Belgien

VARIANTPlex™-HT Dx flydende reagenser

Tilsigtet anvendelse

Til *in vitro*-diagnostisk brug.

Kun til professionel brug.

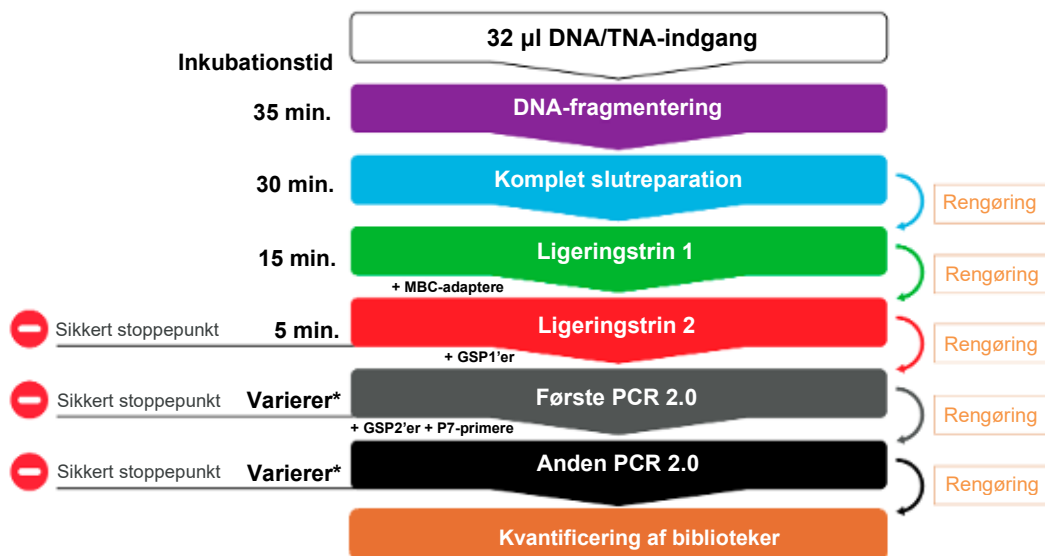
VARIANTPlex™-HT Dx er et sæt reagenser og forbrugsartikler, der bruges til at klargøre prøvebiblioteker ved hjælp af manuelle eller automatiserede metoder fra nukleinsyre (DNA eller TNA) ekstraheret fra friskfrosset eller formalinfikseret, paraffinindstøbt væv eller celler. Der kræves brugerleverede oligonukleotidpaneler til klargøring af biblioteker, der er rettet mod specifikke genomiske interesseområder. De dannede prøvebiblioteker indeholder P5- og P7-sekvenser til downstream-brug.

Sammenfatning og procedureprincipper

Klargøring af biblioteket ved hjælp af Anchored Multiplex PCR (AMP) er en hurtig og skalerbar metode til at generere målberigede biblioteker til NGS. AMP-teknologi kan bruges til applikationer i målrettet DNA-sekventering for at generere et sekventeringsbibliotek. Denne proces er designet til lav nukleinsyreindgang og giver robust ydeevne.

AMP anvender envejs genspecifikke primere (GSP'er), der beriges for både kendte og ukendte mutationer. Adaptere, der indeholder både molekylære stregkoder og prøveindekser, muliggør kvantitativ multipleksdataanalyse, aflæsningsdeduplikering og nøjagtig mutationsbestemmelse.

Oversigt over arbejdsgange



* Første og anden PCR-tid varierer afhængigt af det specifikke GSP-panel samt individuelle laboratoriecyklusforhold. Se indlægssedlen for yderligere oplysninger.

Anbefalinger

- Gennemgå hele protokollen, før du starter klargøringen af biblioteket.
- Vær opmærksom på sikre stoppepunkter under hele protokollen, hvor prøverne kan fryses sikkert (-30 °C til -10 °C) for at planlægge arbejdsgangen.
- Aftør arbejdsstation og pipetter med nuklease- og nukleinsyrerengøringsmidler (f.eks. RNase AWAY, Thermo Fisher Scientific).
- Hvis der anvendes 96-brønds plader, skal det sikres, at de er nukleasefri, at brøndene har tilstrækkelig volumen, og at pladeforseglingerne er tilstrækkelige til at forhindre fugttab.

Advarsler og forholdsregler

- Brug god laboratoriepraksis for at forhindre kontaminering af prøver med PCR-produkter.
- Brug nukleasefri PCR-rør, mikrocentrifugerør og pipettespidser med aerosol-barriere.

- Kontrollér, at den thermocycler, der anvendes til klargøring af biblioteket, er i god stand, og at den er aktuelt kalibreret i henhold til producentens specifikationer. Når der anvendes en thermocycler med en rampehastighed på 100 % >6 °C/sek., indstilles rampehastigheden til højst 6 °C/sek. for første PCR og anden PCR.
- Sørg for, at reaktionsrensningsperler (anvendes gentagne gange under hele arbejdsgangen) bringes til stuetemperatur (20 °C til 25 °C) og er resuspenderet fuldstændigt før brug.
- Ligeringsstrin 2 Komponenterne er viskøse og skal være blandet helt inden afmåling.
- Reagenser må ikke anvendes efter den angivne udløbsdato.
- Indberet straks alle alvorlige hændelser relateret til dette produkt til IDT og den kompetente myndighed eller anden lokal tilsynsmyndighed, hvor brugeren og patienten bor.

Begrænsninger

- Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- Til brug med indgangsmængder på 10 til 200 ng.
- De leverede enzymer er følsomme over for hyppige temperaturændringer og potentielle fryse-optøningshændelser.
- Enzymer vil ikke fryse ved opbevaring i det anbefalede opbevaringstemperaturområde men kan fryse under forsendelsen.
- For at opnå de bedste resultater anbefales det, at du opbevarer de enzymer, der leveres i en -20 °C køleboks til bord, og bruger denne til at transportere enzymer mellem arbejdsområder og fryser.
- Enzymkomponenter vil forblive stabile i op til 5 fryse-optøningscyklusser uden at påvirke funktionen.
- Buffere vil fryse ved den anbefalede opbevaringstemperatur og skal optøs på is inden brug. De bedste resultater opnås ved at afmåle buffere i passende batchstørrelser til engangsbrug med tilstrækkelig overfyldning, således at afmålte mængder ikke fryses igen efter optøning. Indgangsnukleinsyre (DNA) i EDTA-fri buffer (pH 7-8) eller ultrarent vand er den optimale startskabelon til klargøring af AMP-bibliotek. Brug IKKE EDTA-holdige buffere.
- Kontakt teknisk support (archer-tech@idtdna.com) for anbefalinger om kommercielt tilgængelige ekstraktionssæt.
- Brug så vidt muligt den maksimalt tilladte indgangsmasse (200 ng). Højere indgangsmængder muliggør mere følsom variantdetektion.

Klargøring af reagenser

- De volumener, der vises nedenfor, skal øges, hvis du forbereder mere end 24 biblioteker.
- Lav mindst **10 ml** frisk 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 fra 1M Tris-HCl, pH 8,0 og ultrarent vand.
 - Bland **100 µl** 1M Tris-HCl, pH 8,0 med **9900 µl** ultrarent vand.
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 kan anvendes i op til én uge efter blanding.
- Lav mindst **50 ml** frisk 70 % ethanol fra 100 % ethanol og ultrarent vand.
 - Tilsæt **35 ml** 100 % ethanol til **15 ml** ultrarent vand.
 - Luk låget omhyggeligt for at minimere fordampning, når det ikke er i brug.
 - 70 % ethanol er egnet til brug i op til én uge efter blanding.
- Lav mindst **1 ml** frisk 5 mM NaOH arbejdsmateriale af koncentreret NaOH og ultrarent vand.
 - Ved arbejde med 1 M NaOH tilsættes **5 µl** 1 M NaOH til **995 µl** ultrarent vand for at få 5 mM endelig NaOH.
 - Hvis der arbejdes med 5 M, tilsættes **10 µl** 5 M NaOH til **990 µl** ultrarent vand for at få 50 mM NaOH. Bland omhyggeligt, og centrifuger kort ned. Tag **100 µl** 50 mM NaOH, og kombinér med **900 µl** ultrarent vand for at få 5 mM NaOH. Bland omhyggeligt, og centrifuger kort ned.

Produktkomponenter

Komponenterne i VARIANT[™]Plex[™]-HT Dx-kittet er anført som følger:

VARIANT[™]Plex[™]-HT Dx flydende reagenser – 96 reaktioner, REF 10029097

VARIANT[™]Plex[™]-HT Dx flydende reagenser – 24 reaktioner, REF 10029100

Archer[™] oprensingsreagenser – 96 reaktioner, REF 10029134

Archer[™] oprensingsreagenser – 24 reaktioner, REF 10029142

Archer[™] flydende adapter Dx-kit sæt A – 96 reaktioner, REF 10029148

Archer[™] flydende adapter Dx-kit sæt B – 96 reaktioner, REF 10029151

Leverede materialer

VARIANTPlex™-HT Dx flydende reagenser (96 reaktioner, 10029097, 24 reaktioner, 10029100)

Produkt	Indhold	REF
DNA-fragmenteringsbuffer	77 eller 308 µl reaktionsbuffer til enzymatisk DNA-forskydning (-30 °C til -10 °C)	10029101, 10029098
DNA-fragmenteringsenzym	116 eller 416 µl enzym til kløvning af DNA (-30 °C til -10 °C)	10029102, 10029099
Buffer til komplet slutreparation	213 eller 851 µl reaktionsbuffer til slutpolering (-30 °C til -10 °C)	10029070, 10029088
Enzym A til komplet slutreparation	24 eller 96 µl vandig opløsning indeholdende glycerol og enzym (-30 °C til -10 °C)	10029068, 10029086
Enzym B til komplet slutreparation	3,4 eller 13,5 µl vandig opløsning indeholdende glycerol og enzym (-30 °C til -10 °C)	10029069, 10029087
Ligeringsstrin 1 buffer	89 eller 356 µl reaktionsbuffer til ligeringsstrin 1 (-30 °C til -10 °C)	10029072, 10029090
Ligeringsstrin 1 enzym	7,2 eller 29 µl vandig opløsning indeholdende glycerol og enzym (-30 °C til -10 °C)	10029071, 10029089
Ligeringsstrin 2 buffer	591 eller 1190 µl reaktionsbuffer til ligeringsstrin 2 (-30 °C til -10 °C)	10029074, 10029092
Ligeringsstrin 2 enzym	9,6 eller 38,5 µl vandig opløsning indeholdende glycerol og enzym (-30 °C til -10 °C)	10029073, 10029091
Første PCR-buffer 2.0	269 eller 1076 µl reaktionsbuffer til første PCR (-30 °C til -10 °C)	10029076, 10029094
Anden PCR-buffer 2.0	269 eller 1076 µl reaktionsbuffer til anden PCR (-30 °C til -10 °C)	10029077, 10029095
PCR-enzym	38,4 eller 154 µl vandig opløsning indeholdende glycerol og enzym (-30 °C til -10 °C)	10029075, 10029093

Archer™ oprensingsreagenser (24 reaktioner, 10029142, 96 reaktioner, 10029134)

Beskrivelse	Indhold og opbevaringstemperatur	REF
Ligeringsoprensingsperler	1200 µl rør med bufferet magnetisk perleslam til opsamling af ligerede produkter (2 °C til 8 °C)	10029135
Ligeringsoprensingsbuffer	10,8 eller 43,2 ml bufferopløsning til vask af ligeringsoprensingsbindende reaktioner (2 °C til 8 °C)	10029144, 10029136
Reaktionsoprensingsperler	11,8 eller 35,2 ml bufferet magnetisk perleslam til immobilisering af nukleinsyrer (2 °C til 8 °C)	10029145, 10029137

Archer™ flydende adapter Dx-kit (sæt A 10029148, sæt B 10029151)

Beskrivelse	Indhold og opbevaringstemperatur	REF
Flydende P5-adapterplade A (indeks 1-96)	96-brønnds plade indeholdende 2 µl MBC-adapter oligonukleotid (-30 °C til -10 °C)	10029146
Flydende P7-indeksplade A (indeks 1-96)	96-brønnds plade indeholdende 4 µl anden PCR-indekseringsprimer (-30 °C til -10 °C)	10029147
Flydende P5-adapterplade B (indeks 97-192)	96-brønnds plade indeholdende 2 µl MBC-adapter oligonukleotid (-30 °C til -10 °C)	10029149
Flydende P7-indeksplade B (indeks 97-192)	96-brønnds plade indeholdende 4 µl anden PCR-indekseringsprimer (-30 °C til -10 °C)	10029150

Nødvendige materialer, der ikke medfølger

- 1 M Tris-HCl, pH 8,0 (molekylærbiologisk kvalitet)
- Ultrarent vand (molekylærbiologisk kvalitet)
- 200 mM Tris-HCl, pH 7,0 (til sekventering)
- 100 % ethanol (ACS-kvalitet) Forskellige
- Koncentreret NaOH-opløsning (ACS-kvalitet)
- RNase AWAY™ (Thermo Fisher Scientific-REF:7003)
- KAPA universalt bibliotekskvantificeringskit (KAPA Biosystems-REF:KK4824)
- Standard PCR-thermocycler
- Realtids PCR-thermocycler
- qPCR-rør
- 0,2 mL PCR-rør eller 96-brønnds plader
- DynaMag™ 96 sidemagnet (Thermo Fisher Scientific-REF:12331D)
- Mikrocentrifuge
- Pladecentrifuge
- Pipetter (P10, P20, P200 og P1000) (Pipetman eller tilsvarende)
- Sterile, nukleasefri pipettespidser med aerosolbarriere
- Vortexmixer
- Køleblok til PCR-rør
- Handsker
- Qubit® fluorometer (3,0 eller højere) (Thermo Fisher Scientific-REF:Q33216)
- Qubit dsDNA HS-analysekit (Thermo Fisher Scientific-REF:Q32854)
- 20 °C 1,5 ml rør, køleboks til bord, forskellige
- Genspecifikke primere (kompatible med Anchored Multiplex PCR)

Sammenfatning af ydeevnekarakteristika

Der forventes et biblioteksudbytte på 4nM eller derover, når indgangsmasser er mellem 10-200 ng. Tabellen herunder opsummerer ydeevneresultaterne for biblioteksudbyttet af VARIANT^{Pl}ex™-HT Dx. Alle resultater opfylder acceptkriterierne.

Primerpanel	Indgangsbeskrivelse (producent og varenummer)	Indgangsmasse (ng)	Replikater	Resultat (opfyldelseskriterier >90 % OPA)
Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 3	Mimix Myeloid Cancer Panel (Horizon Discovery HD829)	10	3	Opfyldt
		50	3	
		200	3	
	Vand (Sigma-Aldrich W4502-50ML)	0	5	Opfyldt
Gene Specific Primer Oligonucleotide Pool 4	Mimix™ Quantitative Multiplex, FFPE Reference Standard IVD (Horizon Discovery HD200-IVD)	10	3	Opfyldt
		50	3	
		200	3	
	Vand (Sigma-Aldrich W4502-50ML)	0	5	Opfyldt

Procedure

Før du begynder, skal du læse afsnittet "Arbejde med flydende reagenser" for yderligere oplysninger om bedste praksis for enzymer og buffere. For at gøre det lettere kan du starte med at programmere thermocycleren, så den omfatter følgende:

Inkubationsprogram	Trin	Temperatur (°C)	Tid (min.)
DNA-fragmentering	1	4	1
	2	30	4
	3	65	30
	4	4	Hold
Syntese af anden cDNA-streng	1	16	60
	2	75	20
	3	4	Hold
Komplet slutreparation (opvarmet låg af)	1	25	30
	2	4	Hold
Ligeringsstrin 1	1	37	15
	2	4	Hold
Ligeringsstrin 2 (opvarmet låg af)	1	22	5
	2	4	Hold
Ligeringseluering	1	75	10
	2	4	Hold

PCR-cyklusprogrammer	Trin	Temperatur (°C)	Tid	Cyklusser
Første PCR	1	95	3 min.	1
	2	95	30 sek.	(Varierer– Se den panelspecifikke indlægsseddel)
	3	(Varierer–Se den panelspecifikke indlægsseddel)	10 sek.	
	4		(Varierer–Se den panelspecifikke indlægsseddel) 100 % rampehastighed*	
	5	72	3 min.	1
	6	4	Hold	1
Anden PCR	1	95	3 min.	1
	2	95	30 sek.	(Varierer– Se den panelspecifikke indlægsseddel)
	3	(Varierer–Se den panelspecifikke indlægsseddel)	10 sek.	
	4		(Varierer–Se den panelspecifikke indlægsseddel) 100 % rampehastighed*	
	5	72	3 min.	1
	6	4	Hold	1

*Se retningslinjerne for rampehastighed i afsnittet "Advarsler og forholdsregler".

Trin 1: DNA-fragmentering

- Optø **DNA-fragmenteringsbufferen** på is. Bland bufferen kort i vortexmixer, og centrifuger derefter ned, og læg igen på is. **Undlad at blande enzymeret.** Vend i stedet forsigtigt røret 3-5 gange og bank forsigtigt for at blande, og centrifuger derefter ned.
- Justér oprensede DNA-prøver til et endeligt volumen på **32 µl**, og overfør dem til et nyt 0,2 ml 8-strip rør eller brøndplader. Opbevar prøverne på is.

Komponent	Reaktionsblanding
Ultrarent vand	32 - X µl
Oprenset nukleinsyre	X µl
Samlet volumen	32 µl

- Lav en arbejdsopløsning af **DNA-fragmenteringsmastermix** på is baseret på det ønskede antal reaktioner (inklusive, men ikke over 20 % overfyldning) ved hjælp af tabellen nedenfor.

DNA-fragmenteringsmastermix	1X (µl)	___X (µl)
DNA-fragmenteringsbuffer (10029101 eller 10029098)	3,2	
DNA-fragmenteringsenzym (10029102 eller 10029099) Bland IKKE. Vend 3-5x, og bank let på røret før tilsætning	4,8	
Samlet volumen	8	

- Bland kort med vortexmixer, og centrifuger ned.
 - Opbevar mastermix på is.
- Tilsæt **8 µl** DNA-fragmenteringsmastermix til hver **32 µl** indgangsprøve.
 - Bland kort med vortexmixer, og centrifuger ned.
 - Sæt rørene tilbage på is.
 - Start følgende thermocyclerprogram, og overfør først reaktioner til blokken, når temperaturen når 4 °C. Sæt om nødvendigt programmet på pause.
 - Brug et opvarmet låg (≥100 °C).

Inkubationsbetingelser for DNA-fragmentering

Trin	Temperatur (°C)	Tid (minutter)
1	4	1
2	30	4
3	65	30
4	4	Hold

- Når programmet har nået 4 °C, skal reaktionerne centrifugeres kort ned og anbringes på is.

Trin 2: Komplet slutreparation

- Optø den **bufferen til komplet slutreparation** på is. Bland kortvarigt bufferen i vortexmixer, og bland enzymerne i vortexmixer eller pipette, og centrifuger dem derefter ned.
- Lav en arbejdsopløsning af **mastermix til komplet slutreparation** på is baseret på det ønskede antal reaktioner (inklusive, men ikke over 20 % overfyldning) ved hjælp af tabellen nedenfor.

Mastermix til komplet slutreparation	1X (µl)	___X (µl)
Buffer til komplet slutreparation (10029070 eller 10029088)	8,86	
Enzym A til komplet slutreparation (10029068 eller 10029086)	1	
Enzym B til komplet slutreparation (10029069 eller 10029087)	0,14	
Samlet volumen	10	

- Bland kort med vortexmixer, og centrifuger ned.
 - Opbevar mastermix på is.
- Til hver **40 µl** DNA-prøve fra trin 1: DNA-fragmentering, tilsæt **10 µl** mastermix til komplet slutreparation.
 - Bland kort med vortexmixer, og centrifuger ned.
 - Sæt rørene tilbage på is.
 - Overfør reaktioner til en forvarmet thermocycler, og start en inkubation ved hjælp af følgende program og retningslinjer:
 - Opvarmet låg af. Hvis låget stadig er varmt, kan det overvejes at bruge en anden thermocycler eller lade låget være åbent.

Inkubationsbetingelser for komplet slutreparation

Trin	Temperatur (°C)	Tid (minutter)
1	25	30
2	4	Hold

- Anbring prøverne i thermocycleren, og start programmet.
- Når kørslen er færdig, skal reaktionerne centrifugeres kort ned og anbringes på is.

Reaktionsoprensning efter komplet slutreparation

Se afsnittet **Advarsler og forholdsregler** i denne brugsanvisning for vejledning i arbejde med reaktionsoprensningsperler.

- Resuspendér reaktionsoprensningsperler fuldstændigt i vortexmixer.
- Fjern rørene fra isen, og tilsæt **2,5X** volumen (**125 µl**) reaktionsoprensningsperler til hver komplet slutreparationsreaktion.

3. Bland godt i vortexmixer eller pipettér 10 gange for at blande, og efterse prøvens farve visuelt for at sikre en homogen blanding.
4. Inkubér i **5 minutter** ved stuetemperatur (20 °C til 25 °C).
5. Centrifuger rørene kort ned.
6. Anbring rørene på magneten i **4 minutter, eller indtil perlerne er helt pelleteret** mod prøverørsvæggen.
7. Brug en pipette til at fjerne og kassere supernatanten uden at forstyrre perlepelleten. Hvis pelleten løsner sig fra magneten, og en del trækkes ind i pipettespidsen, returneres indholdet til røret, og magnetinkubationstrinet gentages.
8. Vask perler **to gange** med 70 % ethanol, mens de stadig er på magneten. For hver vask:
 - a. Tilsæt **180 µl** 70 % ethanol.
 - b. Inkubér i **30 sekunder** ved stuetemperatur (20 °C til 25 °C).
 - c. Fjern forsigtigt ethanol, og kassér det.
9. Efter den sidste vask bruges en pipette (≤20 µl kapacitet) til helt at fjerne synlige supernatantrester. Lad rørene tørre i **3-5 minutter** ved stuetemperatur med åbne låg. **Pas på ikke at overtørre perler**, da dette vil reducere den samlede restitution (udbytte) af nukleinsyre signifikant.
10. Eluér DNA ved at resuspendere perler i **16 µl** 10mM Tris-HCl, pH 8,0.
***Bemærk, at for automatiserede arbejdsgange er det acceptabelt at tilsætte 1 µl 10mM Tris-HCl, pH 8,0 til perle-resuspensionsvolumenet, der er vist ovenfor. Denne ekstra 1 µl skal efterlades, når det oprensede DNA fjernes i de kommende trin.**
11. Sæt rørene tilbage på magneten i **2 minutter**.

Trin 3: Ligeringsstrin 1

1. Optø **ligeringsstrin 1-bufferen** på is. Bland kortvarigt bufferen i vortexmixer, og bland enzymerne i vortexmixer eller pipette, og centrifuger dem derefter ned.
2. Lav en arbejdsopløsning af **ligeringsstrin 1-mastermix** på is baseret på det ønskede antal reaktioner (inklusive, men ikke over 50 % overfyldning) ved hjælp af tabellen nedenfor.

Ligeringsstrin 1-mastermix	1X (µl)	___X (µl)
Ligeringsstrin 1-buffer (10029090 eller 10029072)	3,7	
Ligeringsstrin 1-enzym (10029089 eller 10029071)	0,3	
Samlet volumen	4	

- a. Bland kort med vortexmixer, og centrifuger ned.
- b. Opbevar mastermix på is.
3. Overfør **16 µl** elueret DNA fra trin 2: Fuldfør komplet slutreparation i nye 0,2 ml 8-strip rør eller brøndplader. Det er acceptabelt at der overføres en lille mængde reaktionsoprensningsperler.
4. Tilsæt **4 µl** af ligeringsstrin 1-mastermix til hver prøve.
 - a. Bland kort med vortexmixer, og centrifuger ned.
 - b. Sæt rørene tilbage på is.
5. Overfør reaktioner til en forvarmet thermocycler, og start en inkubation ved hjælp af følgende program og retningslinjer:
 - a. Brug et opvarmet låg (≥100 °C).

Inkubationsbetingelser for ligeringsstrin 1

Trin	Temperatur (°C)	Tid (minutter)
1	37	15
2	4	Hold

- b. Anbring prøverne i thermocycleren, og start programmet.
- c. Når programmet har nået 4 °C, fjernes rørene fra temperaturblokken, reaktionerne centrifugeres kort ned og anbringes på is.

Reaktionsoprensning efter ligeringsstrin 1

Se afsnittet **Advarsler og forholdsregler** i denne brugsanvisning for vejledning i arbejde med reaktionsoprensningsperler.

1. Resuspendér reaktionsoprensningsperler fuldstændigt i vortexmixer.
2. Fjern rørene fra isen, og tilsæt **2,5X** volumen (**50 µl**) reaktionsoprensningsperler til hver ligeringsstrin 1-reaktion.
3. Bland godt i vortexmixer eller pipettér 10 gange for at blande, og efterse prøvens farve visuelt for at sikre jævn blanding.
4. Inkubér i **5 minutter** ved stuetemperatur (20 °C til 25 °C).
5. Centrifuger rørene kort ned.
6. Anbring rørene på magneten i **4 minutter, eller indtil perlerne er helt pelleteret** mod prøverørsvæggen.

7. Brug en pipette til at fjerne og kassere supernatanten uden at forstyrre perlepelleten. Hvis pelleten løsner sig fra magneten, og en del trækkes ind i pipettespidsen, returneres indholdet til røret, og magnetinkubationstrinet gentages.
8. Vask perler **to gange** med 70 % ethanol, mens de stadig er på magneten. For hver vask:
 - a. Tilsæt **180 µl** 70 % ethanol.
 - b. Inkubér i **30 sekunder** ved stuetemperatur (20 °C til 25 °C).
 - c. Fjern forsigtigt ethanol, og kassér det.
9. Efter den sidste vask bruges en pipette (≤20 µl kapacitet) til helt at fjerne synlige supernatantrestre. Lad rørene tørre i **3-5 minutter** ved stuetemperatur med åbne låg. Pas på ikke at overtørre perler, da dette vil reducere den samlede restitution (udbytte) af nukleinsyre signifikant.
10. Eluér DNA ved at resuspendere perler i **25 µl** 10 mM Tris-HCl, pH 8,0.
11. Sæt rørene tilbage på magneten i **2 minutter**.

Trin 4: MBC-adapterinkorporering

1. Optø **plade(r) med flydende P5-adapter** (10029146 eller 10029149). Centrifuger ned, før pladen fjernes fra forseglingen. Det er acceptabelt at gennembore folieforseglingen med en pipettespids for at få adgang til de flydende adaptore.
- ! ***Vigtigt*** Da dette trin inkorporerer P5-indeksmærket til sporing på prøveniveau, skal du sørge for at registrere, hvilken MBC-adapter der anvendes til hver prøve.
2. Overfør **23 µl** elueret DNA fra oprensningen efter trin 3: Ligeringsstrin 1 ovenfor til nye 0,2 ml 8-strip rør eller brøndplader. **Undgå at pipettere reaktionsoprensningsperler til denne reaktion.**
3. Tilsæt **2 µl** af den respektive unikke **flydende P5 MBC-adapter**, så der i alt opnås **25 µl**. Forsegl adapterpladen igen med en ny forsegling, når alle P5 MBC-adaptere er blevet tilsat til de respektive prøver.
 - a. Bland med vortexmixer, og centrifuger ned.
 - b. Sæt rørene tilbage på is.
4. Fortsæt straks til trin 5: Ligeringsstrin 2.

Trin 5: Ligeringsstrin 2

1. Optø **ligeringsstrin 2-buffere** på is. Bland bufferen godt i vortexmixer, og centrifuger ned. Bland enzymer med vortexmixer eller pipette, og centrifuger dem derefter ned.
2. Lav en arbejdsopløsning af **ligeringsstrin 2-mastermix** på is baseret på det ønskede antal reaktioner (inklusive, men ikke over 20 % overfyldning) ved hjælp af tabellen nedenfor.

! **På grund af viskositeten af ligeringsstrin 2-bufferkomponenterne er det vigtigt langsomt at blande stamopløsningen med pipette mindst 10 gange og derefter blande i vortexmixer i 10 sekunder FØR den nødvendige mængde til arbejdsopløsningen afmåles, og igen EFTER tilsætning af ligeringsstrin 2-enzymet.**

Ligeringsstrin 2-mastermix	1X (µl)	___X (µl)
Ligeringsstrin 2-buffer (10029092 eller 10029074)	24,6	
Ligeringsstrin 2-enzym (10029091 eller 10029073)	0,4	
Samlet volumen	25	

- a. Bland kort med vortexmixer, og centrifuger ned.
 - b. Opbevar mastermix på is.
3. Overfør **25 µl** mastermix fra ligeringsstrin 2 til hvert rør eller brønd, der indeholder **25 µl** af hver prøve (DNA + flydende MBC-adapter) fra trin 4: MBC-adapterinkorporering ovenfor.
 - a. Bland omhyggeligt, og centrifuger ned. **På grund af disse komponenters viskositet er omhyggelig blanding med pipette 10 gange foruden blanding i vortexmixer påkrævet for at sikre fuldstændig blanding.**
 - b. Sæt rørene tilbage på is.
4. Overfør reaktioner til en forvarmet thermocycler, og start en inkubation ved hjælp af følgende program og retningslinjer:
 - a. Opvarmet låg af

Inkubationsbetingelser for ligeringsstrin 2

Trin	Temperatur (°C)	Tid (minutter)
1	22	5
2	4	Hold

- b. Når programmet har nået 4 °C, skal reaktionerne centrifugeres kort ned og anbringes på is.

— **Sikkert stoppepunkt:** Det er acceptabelt at stoppe og opbevare reaktionerne ved -30 °C til -10 °C.

Reaktionsoprensning efter ligeringsstrin 2

- Forsigtig:** Dette trin bruger ligeringsoprensningsperler (10029135 eller 10029135) og ligeringsoprensningsbuffer (10029144 eller 10029136) i stedet for reaktionsoprensningsperler og 70 % ethanol. Sørg for at bruge ligeringsoprensningsperler og ligeringsoprensningsbuffer, der følger med kittet til dette trin.

Klargør ligeringsoprensningsperler:

1. Resuspendér **ligeringsoprensningsperler** fuldstændigt i vortexmixer.
2. Pipetter **50 µl** ligeringsoprensningsperler i nye 0,2 ml 8-strip rør for hver reaktion.
3. Anbring rør på magneten i **1 minut, eller indtil perlerne er pelleteret**.
4. Brug en pipette til at fjerne og kassere supernatanten uden at forstyrre perlepelleten. Hvis pelleten løsner sig fra magneten, og en del trækkes ind i pipettespidsen, returneres indholdet til røret, og magnetpelleteringstrinet gentages.
5. Pipetter **50 µl ligeringsoprensningsbuffer** i hvert rør for at resuspendere perler.

Ligeringsoprensningsprocedure:

- Forsigtig:** Når PCR-rørene blandes i de efterfølgende trin, skal der opretholdes et fast tryk på alle låg, da det indeholdte rengøringsmiddel kan få lågene til at åbne.

1. Pipetter hele mængden af ligeringsstrin 2-reaktion ned i rørene med ligeringsoprensningsperler og -buffer.
2. Bland prøverne i vortexmixer.
3. Inkubér reaktioner ved stuetemperatur i **5 minutter**.
4. Bland prøverne i vortexmixer.
5. Inkubér reaktioner ved stuetemperatur i **5 minutter**.
6. Centrifuger rørene kort ned.
7. Anbring rørene på magneten i **1 minut, eller indtil perlerne er helt pelleteret** mod prøverørsvæggen.
8. Pipetter forsigtigt supernatanten (**100 µl**) af, og bortskaf den uden at forstyrre perlerne.
9. Vask perlerne **to gange** med **ligeringsoprensningsbuffer**.
 - a. Resuspendér perler i **180 µl** ligeringsoprensningsbuffer ved at blande i vortexmixer, kort centrifugere ned og sætte dem tilbage på magneten i **1 minut**.
 - b. Når opslæmningen er blevet klar, skal supernatanten kasseres.
10. Vask perlerne **én gang** med **ultrarent vand**:
 - a. Resuspendér perler i **180 µl** ultrarent vand ved at blande i vortexmixer, kort centrifugere ned og sætte dem tilbage på magneten.
 - b. Når opslæmningen er blevet klar, skal supernatanten kasseres.
 - c. Sørg for, at al supernatant er fjernet fra rørene.
11. Eluér DNA fra ligeringsoprensningsperler:
 - a. Resuspendér ligeringsoprensningsperler i den mængde 5 mM NaOH, der er specificeret i den panelspecifikke **indlægseddél (A)**.
***Bemærk, at for automatiserede arbejdsgange er det acceptabelt at tilsætte yderligere 1 µl 5 mM NaOH til ligeringsperle-resuspensionsvolumenet, der er vist ovenfor. Denne ekstra 1 µl skal efterlades, når det oprensede DNA fjernes i de kommende trin.**
 - b. Overfør reaktioner til en thermocycler, og start en inkubation ved hjælp af følgende program og retningslinjer:
 - c. Brug et opvarmet låg ($\geq 100^\circ\text{C}$).

Inkubationsbetingelser for ligeringseluering

Trin	Temperatur (°C)	Tid (minutter)
1	75	10
2	4	Hold

- d. Når prøven har nået 4°C , centrifugeres den kort ned og overføres til magneten.

Trin 6: Første PCR

1. Optø den **første PCR-buffer 2.0** og **GSP1** på is. Bland buffer og primere kort i vortexmixer, og centrifuger ned. Bland enzymer med vortexmixer eller pipette, og centrifuger dem derefter ned.
2. Lav en arbejdsopløsning af **første PCR-mastermix** på is baseret på det ønskede antal reaktioner (inklusive, men ikke over 20 % overfyldning) ved hjælp af tabellen nedenfor.

***Bemærk, at PCR-enzymet også vil blive anvendt i anden PCR, så ubenyttet enzym må ikke bortskaffes efter fremstilling af første PCR-mastermix.**

Første PCR-mastermix	1X (µl)	___X (µl)
Første PCR-buffer 2.0 (10029094 eller 10029076)	11,2	
PCR-enzym (10029093 eller 10029075)	0,8	
Samlet volumen	12	

- a. Bland kort med vortexmixer, og centrifuger ned.
- b. Opbevar mastermix på is.
3. Til nye 0,2 ml 8-strip rør eller brøndplader tilføjes:
 - a. **12 µl** første PCR-mastermix
 - b. GSP1 - Volumen angivet i den panelspecifikke **indlægsseddel (B)**
***Bemærk, at for automatiserede arbejdsgange skal GSP'erne for det/de anvendte panel(er) føjes til deres eget mastermix i stedet for direkte til prøven.**
 - c. Hele mængden af oprenset DNA fra trin 5: Oprensning af ligering 2.
4. Bland kort med vortexmixer, og centrifuger ned.
5. Sæt rørene tilbage på is.
6. Overfør reaktioner til en forvarmet thermocycler, og start straks det program, der er angivet i den panelspecifikke **indlægsseddel (første PCR-reaktion)**.
 - a. Brug et opvarmet låg ($\geq 100^{\circ}\text{C}$).
 - b. Når programmet har nået 4°C , skal reaktionerne centrifugeres kort ned og anbringes på is. Det er også acceptabelt at lade rørene blive siddende i thermocycleren ved 4°C natten over.

Reaktionsoprensning efter første PCR

Se afsnittet **Advarsler og forholdsregler** i denne brugsanvisning for vejledning i arbejde med reaktionsoprensningsperler.

1. Resuspendér reaktionsoprensningsperler fuldstændigt i vortexmixer.
2. Tilsæt **0,8X** volumen (**32 µl**) reaktionsoprensningsperler til hver reaktion.
3. Bland godt i vortexmixer eller pipettér 10 gange for at blande, og efterse prøvens farve visuelt for at sikre en homogen blanding.
4. Inkubér i **5 minutter** ved stuetemperatur (20°C til 25°C).
5. Centrifuger rørene kort ned.
6. Anbring rørene på magneten i **4 minutter, eller indtil perlerne er helt pelleteret** mod prøverørsvæggen.
7. Brug en pipette til at fjerne og kassere supernatanten uden at forstyrre perlepelleten. Hvis pelleten løsner sig fra magneten, og en del trækkes ind i pipettespidsen, returneres indholdet til røret, og magnetinkubationstrinet gentages.
8. Vask perler **to gange** med 70 % ethanol, mens de stadig er på magneten. For hver vask:
 - a. Tilsæt **180 µl** 70 % ethanol
 - b. Inkubér i **30 sekunder** ved stuetemperatur (20°C til 25°C)
 - c. Fjern forsigtigt ethanol, og kassér det.
9. Efter den sidste vask bruges en pipette (≤ 20 µl kapacitet) til helt at fjerne synlige supernatantrester. Lad rørene tørre i **3-5 minutter** ved stuetemperatur med åbne låg. **Pas på ikke at overtørre perler**, da dette vil reducere den samlede restitution (udbytte) af nukleinsyre signifikant.
10. Eluér DNA ved at resuspendere perler i det volumen på 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, der er specificeret i den panelspecifikke **indlægsseddel (C)**.
11. Sæt rørene tilbage på magneten i **2 minutter**.
12. Overfør mængden af oprenset eluat i den panelspecifikke **indlægsseddel (D)** til et nyt 0,2 ml PCR-rør, og fortsæt direkte til trin 7: Anden PCR.

Trin 7: Anden PCR

1. Optø den **anden PCR-buffer 2.0**, **GSP2** og **flydende P7-indeksplade(r)** (10029147 eller 10029150) på is. Bland buffer og GSP2 i vortexmixer, og centrifuger derefter ned. Centrifuger P7-pladen ned, før forseglingen fjernes. Det er acceptabelt at gennembore folieforseglingen med en pipettespids for at få adgang til de flydende adaptore.
2. Lav en arbejdsopløsning af **anden PCR-mastermix** på is baseret på det ønskede antal reaktioner (inklusive, men ikke over 20 % overfyldning) ved hjælp af tabellen nedenfor.

Anden PCR-mastermix	1X (µl)	__X (µl)
Anden PCR-buffer 2.0 (10029095 eller 10029077)	11,2	
PCR-enzym (10029093 eller 10029075)	0,8	
<i>Samlet volumen</i>	12	

- a. Bland kort med vortexmixer, og centrifuger ned.
- b. Opbevar mastermix på is.
3. Til nye 0,2 ml 8-strip rør eller brøndplader tilføjes:
 - a. **12 µl** anden PCR-mastermix
 - b. **4 µl** respektive flydende P7-indeks i henhold til prøveindeksplanlægning. Forsegl P7-pladen igen med en ny forsegling efter tilsætning af P7-indeks til de respektive brønde.

- c. GSP2 - Volumen angivet i den panelspecifikke **indlægsseddel (E)**.
***Bemærk, at for automatiserede arbejdsgange skal GSP'erne for det/de anvendte panel(er) føjes til deres eget mastermix i stedet for direkte til prøven.**
- d. Overfør volumen af oprenset DNA fra trin 6: Første PCR specificeret i den panelspecifikke **indlægsseddel (D)**.
***Vigtigt* Da dette trin inkorporerer P7-indeksmærket til sporing på prøveniveau, skal du sørge for at registrere, hvilket flydende P7-indeks, der anvendes til hver prøve.**
4. Bland kort med vortexmixer, og centrifuger ned.
5. Sæt rørene tilbage på is.
6. Overfør reaktioner til en forvarmet thermocycler, og start straks det program, der er angivet i den panelspecifikke **indlægsseddel (anden PCR-reaktion)**.
 - a. Brug et opvarmet låg ($\geq 100^{\circ}\text{C}$).
 - b. Når programmet har nået 4°C , skal reaktionerne centrifugeres kort ned og anbringes på is. Det er også acceptabelt at lade rørene blive siddende i thermocycleren ved 4°C natten over.

Reaktionsoprensning efter anden PCR

Se afsnittet **Advarsler og forholdsregler** i denne brugsanvisning for vejledning i arbejde med reaktionsoprensningsperler.

1. Resuspendér reaktionsoprensningsperler fuldstændigt i vortexmixer.
 2. Tilsæt **0,8X** volumen (**32 μl**) reaktionsoprensningsperler til alle anden PCR-reaktioner.
 3. Bland godt i vortexmixer eller pipettér 10 gange for at blande, og efterse prøvens farve visuelt for at sikre en homogen blanding.
 4. Inkubér i **5 minutter** ved stuetemperatur (20°C til 25°C).
 5. Centrifuger rørene kort ned.
 6. Anbring rørene på magneten i **4 minutter, eller indtil perlerne er helt pelleteret** mod prøverørsvæggen.
 7. Brug en pipette til at fjerne og kassere supernatanten uden at forstyrre perlepelleten. Hvis pelleten løsner sig fra magneten, og en del trækkes ind i pipettespidsen, returneres indholdet til røret, og magnetinkubationstrinet gentages.
 8. Vask perler **to gange** med 70 % ethanol, mens de stadig er på magneten. For hver vask:
 - a. Tilsæt **180 μl** 70 % ethanol.
 - b. Inkubér i **30 sekunder** ved stuetemperatur (20°C til 25°C).
 - c. Fjern forsigtigt ethanol, og kassér det.
 9. Efter den sidste vask bruges en pipette ($\leq 20 \mu\text{l}$ kapacitet) til helt at fjerne synlige supernatantrestes. Lad rørene tørre i **3-5 minutter** ved stuetemperatur med åbne låg. **Pas på ikke at overtørre perler**, da dette vil reducere den samlede restitution (udbytte) af nukleinsyre signifikant.
 10. Eluér DNA ved at resuspendere perler i **20 μl** 10 mM Tris-HCl, pH 8,0.
 11. Sæt rørene tilbage på magneten i **2 minutter**.
 12. Overfør **18 μl** af den oprensede opløsning til et nyt 0,2 ml PCR-rør. Sørg for ikke at overføre perler til det friske rør.
 13. Stop eller fortsæt direkte til trin 8: Kvantificering af biblioteker.
-  **Sikkert stoppepunkt:** Det er acceptabelt at stoppe og opbevare reaktionerne ved -30°C til -10°C .

Trin 8: Kvantificering af biblioteker

1. Kvantificér koncentrationen af hvert bibliotek med qPCR i henhold til anvisningerne, der følger med KAPA universalt bibliotekskvantificeringskit.

 **Bemærk:** Archer-biblioteker er meget koncentrerede og skal muligvis serielt fortyndes til 1:100.000 til kvantificering med KAPA via qPCR.
 2. Loading Calculator-regnearket kan bruges til kvantificering, normalisering og sekventeringsberegninger.
 3. Den anbefalede størrelsesjusteringskorrektionsfaktor til beregning af koncentrationen i et bibliotek afhænger af indgangstype og -kvalitet. Værdierne for den estimerede fragmentstørrelse herunder tager højde for adapterstørrelse (157 bp) plus den gennemsnitlige længde af indsatsfragmentet. Brug en anslået fragmentstørrelse på 357 bp.
 4. Brug hvert biblioteks kvantitet til at styre fortynding af en afmålt mængde for at muliggøre kombination af alle normaliserede biblioteker for at oprette en ækvimolær pulje (f.eks. 10 nM).
-  **Bemærk:** Kvantificering med en fluorometrisk eller elektroforesebaseret metode anbefales ikke.

Kvalitetskontrol

Dette produkt blev fremstillet og lanceret i overensstemmelse med Integrated DNA Technologies, BV, ISO 13485 Quality Management System. Produktet har opfyldt kvalitetskravene fra Integrated DNA Technologies.

Sikkerhedsoplysninger

Bær altid en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og øjenværn ved arbejde med kemikalier. For yderligere oplysninger henvises der til det specifikke sikkerhedsdatablad (SDS) ved at søge på vores websted på <https://integrateddna-sds.thewerco.com/>.

Bortskaffelse

Bortskaf reagens og emballage i overensstemmelse med lokale bestemmelser.

Symbolforklaring

En ordliste over symboldefinitioner fås til reference på www.idtdna.com.

Symbol	Beskrivelse
	Engelsk
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Conformité Européene (CE)-mærkning
	Autoriseret repræsentant i Det Europæiske Fællesskab/Den Europæiske Union
	Producentens katalognummer.
	Producentens batchkode.
	Den dato, hvorefter produktet ikke må anvendes.
	Angiver producenten.
	Den dato, hvor produktet blev fremstillet.
	Det samlede antal tests, der kan udføres med produktet.
	De temperaturgrænser, som produktet med sikkerhed kan eksponeres for.
	Brugeren skal læse brugsanvisningen.
	Påmindelsessymboler gør opmærksom på mindre detaljer, der let kan overses og kompromittere proceduren, hvilket resulterer i nedsat ydeevne af analysen.
	Forsigtighedssymboler angiver kritiske trin i proceduren, hvor der kan være risiko for protokolfejl eller beskadigelse af selve produktet, hvis de ikke observeres nøje.
	Stopsymboler angiver, hvor denne procedure kan suspenderes sikkert og genoptages på et senere tidspunkt uden risiko for, at analysens ydeevne kompromitteres. Notér disse trin, og planlæg din arbejdsgang i overensstemmelse hermed.
	Fransk
	Italiensk
	Spansk

Versionshistorik

Versionsnummer	Versionsdato	Beskrivelse af ændring
01	04/2025	Nyt dokument
01	11/2025	Konverterede til ny dokumenttype (PRD-DOC-391 til RA-DOC-625). Kondenseret indhold, tabelformater og margener mhp. udskriftsversion. Tilføjede til definitionstabellen. Tilføjede oversættelser (fransk, spansk og italiensk).



Kontaktoplysninger

Integrated DNA Technologies
2425 55th St. Suite 100
Boulder, CO 80301
www.idtdna.com

Integrated DNA Technologies, BV
Interleuvenlaan 12 A
3001 Leuven, Belgien