

Guide de référence du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx[®]

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT

Introduction	6
Pour commencer	10
Guides d'instruments et de logiciels	20
Flux de travail du test	22
Saisie des renseignements sur l'analyse	23
Hybridation du pool d'oligonucléotides	28
Retrait des oligonucléotides non liés	31
Extension-ligation des oligonucléotides liés	34
Amplification PCR	35
Nettoyage PCR	39
Normalisation des bibliothèques	42
Regroupement de bibliothèques	46
Prochaines étapes	50
Assistance technique	



Ce document et son contenu sont exclusifs à Illumina, Inc. et à ses sociétés affiliées (« Illumina »); ils sont exclusivement destinés à l'usage contractuel de son client dans le cadre de l'utilisation du ou des produits décrits dans les présentes et ne peuvent servir à aucune autre fin. Ce document et son contenu ne seront utilisés ou distribués à aucune autre fin et ne seront communiqués, divulgués ou reproduits d'aucune façon sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Illumina ne cède aucune licence en vertu de son brevet, de sa marque de commerce, de ses droits d'auteur ou de ses droits traditionnels ni des droits similaires d'un tiers quelconque par ce document.

Les instructions contenues dans ce document doivent être suivies strictement et explicitement par un personnel qualifié et adéquatement formé de façon à assurer l'utilisation correcte et sûre du ou des produits décrits dans les présentes. Le contenu intégral de ce document doit être lu et compris avant l'utilisation de ce ou ces produits.

LE MANQUEMENT À LIRE COMPLÈTEMENT ET À SUIVRE EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LES PRÉSENTES POURRA CAUSER DES DOMMAGES AU(X) PRODUIT(S), DES BLESSURES AUX PERSONNES, UTILISATEURS OU AUTRES, ET DES DOMMAGES AUX AUTRES BIENS.

ILLUMINA DÉCLINE TOUTE RESPONSABILITÉ DÉCOULANT DE L'UTILISATION INAPPROPRIÉE DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LES PRÉSENTES (Y COMPRIS LEURS COMPOSANTES ET LE LOGICIEL).

© 2020 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Illumina, MiSeqDx, la couleur citrouille et la conception de bases en flux sont des marques de commerce d'Illumina, Inc. ou de ses sociétés affiliées aux États-Unis ou dans d'autres pays. Tous les autres noms, logos et marques de commerce sont la propriété de leurs détenteurs respectifs.

AMPure, Beckman et Beckman Coulter sont des marques déposées ou des marques de commerce de Beckman Coulter, Inc.

Historique des révisions

N° de document	Révision	Date	Description des modifications
15038346	03	Avril 2019	<ul style="list-style-type: none">• Mise à jour de l'adresse du représentant autorisé de l'UE.• Mise à jour de l'adresse du commanditaire australien.

N° de document	Révision	Date	Description des modifications
15038346	02	Août 2017	<ul style="list-style-type: none"> • Mise à jour de l'étiquetage CE Rep en remplaçant Emergo Europe par Illumina Cambridge Limited. • Ajout de renseignements pour les utilisateurs du logiciel Local Run Manager tout au long du guide. • Modification du titre de la section Créer une feuille d'échantillons par Préparer des renseignements sur les échantillons et modifications mineures apportées à la section, afin qu'elle s'applique aux utilisateurs de MiSeq Reporter et de Local Run Manager. • Dans la section Séquençage automatisé et Analyse de données, ajout de renseignements concernant l'analyse en temps réel (RTA) et le rôle de la RTA dans l'analyse primaire. • Ajout d'une nouvelle section intitulée Méthodes d'interface d'instrument MiSeqDx expliquant les différences de fonctions logicielles entre MiSeq Reporter et Local Run Manager et expliquant comment déterminer quel logiciel est installé sur votre système MiSeqDx. • Ajout d'une nouvelle section intitulée Guide d'instruments et de logiciels. Cette section apporte des renseignements sur les guides d'instruments et de logiciels à utiliser, en fonction de la configuration de l'instrument de votre système MiSeqDx et du logiciel d'analyse installé avec celui-ci. • Ajout d'une section intitulée Renseignements sur les analyses pour le MiSeqDx, afin d'introduire les différences entre l'utilisation d'IWM et l'utilisation du module de test de séquençage clinique de fibrose kystique du Local Run Manager pour saisir les renseignements concernant les analyses et les échantillons. • Hybridation du pool d'oligonucléotides - Procédure : pour assurer l'inclusion de l'échantillon NTC, suppression de la langue antérieure (« tous les puits contenant de l'ADN génomique ») remplacé par « tous les puits d'échantillons ». • Amplification par PCR - Préparation : ajout d'une étape de centrifugation pour le tube de polymérase PCR, pour s'assurer que des volumes appropriés de polymérase PCR sont utilisés. • Liste d'acronymes révisée : <ul style="list-style-type: none"> • NTC redéfini, de « contrôle de modèle négatif » à « aucun contrôle de modèle ». • Contrôle positif supprimé (POS).

N° de document	Révision	Date	Description des modifications
15038346	01	Mars 2017	<ul style="list-style-type: none"> • Équipement et matériel préamplification : mise à jour des exigences relatives à la centrifugeuse de table. • Saisie des renseignements sur l'échantillon : ajout d'une note précisant qu'il ne faut modifier les feuilles d'échantillons qu'avec le logiciel Worklist Manager d'Illumina. • Retrait des oligonucléotides non liés : préparation : ajout d'un énoncé d'avertissement sur la régulation de la température de la centrifugeuse. • Pour l'ensemble du document : ajout sur la couverture arrière de renseignements sur les commanditaires australiens.
15038346	B	Mars 2015	<ul style="list-style-type: none"> • Pour l'ensemble du document : mise à jour des renseignements concernant la marque de commerce. • Pour l'ensemble du document : mise à jour des marquages de conformité. • Saisie des renseignements sur l'échantillon : ajout d'une deuxième phrase à l'étape 5. • Dénaturer et diluer le contrôle interne PhiX : mise à jour de la procédure de dilution PhiX.
15038346	A	Avril 2014	<ul style="list-style-type: none"> • Publication originale

Introduction

Utilisation prévue

Le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina est un système de séquençage ciblé de diagnostic *in vitro* qui reséquence les régions de codage de protéines et les limites intron et exon du gène régulateur de la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique (*CFTR*) dans l'ADN génomique isolé à partir d'échantillons de sang entier périphérique d'origine humaine prélevé dans le K₂EDTA. Le test détecte les variants à simple nucléotide et les petits indels au sein de la région séquencée, et fournit également des rapports sur deux mutations introniques profondes ainsi que deux grandes délétions. Le test est destiné à être utilisé sur l'instrument MiSeqDx d'Illumina.

Le test est destiné à être utilisé pour faciliter le diagnostic des personnes soupçonnées d'avoir la fibrose kystique (FK). Ce test est plus approprié lorsque le patient présente une fibrose kystique atypique ou non classique ou lorsque d'autres panels de mutation n'ont pas permis d'identifier les deux mutations étiologiques. Les résultats de ce test doivent être interprétés par un généticien moléculaire clinicien diplômé ou équivalent et doivent être utilisés avec les autres renseignements cliniques et de laboratoire disponibles, y compris les symptômes cliniques, d'autres tests de diagnostic et les antécédents familiaux.

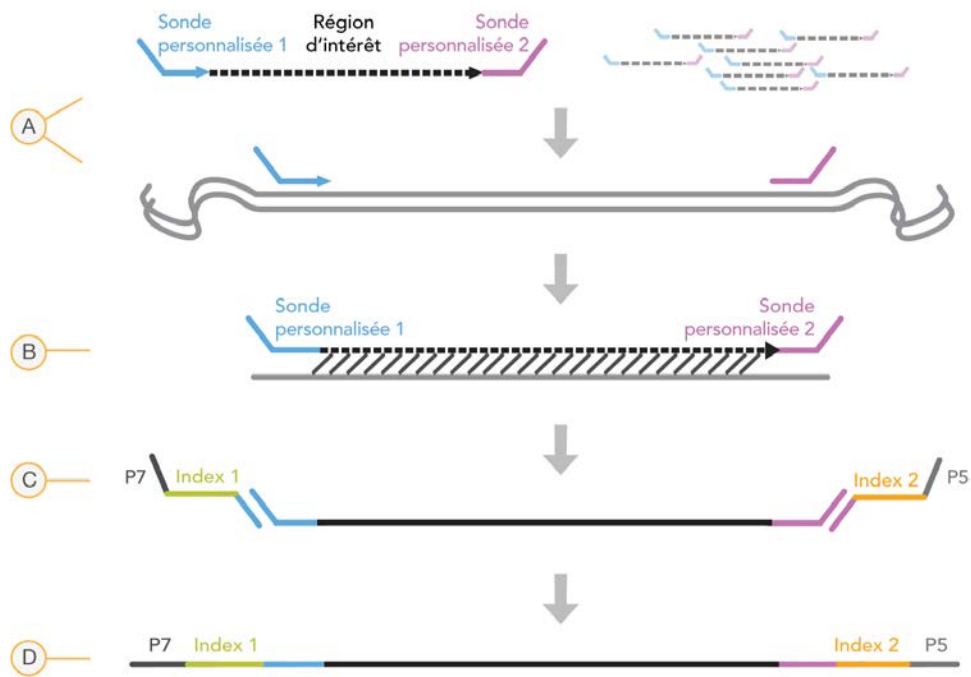
Ce test n'est pas indiqué pour être utilisé à des fins de diagnostic autonome, pour les tests de diagnostic foetal, les tests pré-implantatoires, le dépistage du porteur du gène, le dépistage néonatal ou le dépistage de population.

À propos de ce guide

Ce guide de référence fournit des instructions plus détaillées, des conseils techniques et des astuces utiles aux utilisateurs nouvellement formés pour leur permettre d'exécuter correctement le protocole du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx. Ceci est conçu comme un complément et ne vise pas à remplacer la notice.

Comment le test fonctionne-t-il?

Une paire d'oligonucléotides de fibrose kystique (FK) est conçue pour chaque amplicon *CFTR*. L'hybridation de ces oligonucléotides avec un ADN génomique se produit dans une plaque à 96 puits, suivie d'une extension et d'une ligation pour former des modèles d'ADN composés des régions d'intérêt bordées par des séquences de primer universelles. À l'aide des primers indexés fournis dans la trousse, les modèles d'ADN sont ensuite amplifiés par PCR, regroupés dans un seul tube puis séquencés sur l'instrument MiSeqDx.



- A Hybridisation de sondes d'oligonucléotides personnalisées
- B Extension et ligation
- C Ajout d'index et d'adaptateurs de séquençage par PCR
- D Amplicon final prêt pour le séquençage avec MiSeq

Présentation du processus

Le processus du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina se résume par les étapes suivantes :

Préparer les renseignements sur l'échantillon

Préparez d'abord les renseignements sur l'échantillon que le système MiSeqDx utilisera pour identifier chaque échantillon ainsi que l'index correspondant. Saisissez l'identifiant de l'échantillon, les index et les autres paramètres applicables à la plaque à 96 puits. Pour de plus amples renseignements, consultez *Saisie des renseignements sur l'analyse*, page 23.

Les renseignements sur l'échantillon que vous avez saisis pour le MiSeqDx peuvent également servir de guide pour la configuration de la plaque lors du flux de travail du test.

Préparation des bibliothèques

Préparez les bibliothèques à l'aide du protocole détaillé dans ce guide de l'utilisateur.

Séquençage des échantillons sur le système MiSeqDx

Le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx doit être séquençé sur un système MiSeqDx à l'aide d'une analyse à lecture appariée de 150 cycles et d'un double indexage. Pour obtenir des instructions pour réaliser une analyse de séquençage à l'aide de l'instrument MiSeqDx, consultez le Guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour votre configuration. Consultez la section *Guides d'instruments et de logiciels*, page 20.

Séquençage automatique et analyse des données

La première étape de l'analyse des données s'appelle l'analyse primaire. Ce processus est effectué par le logiciel d'analyse temps réel (RTA), et génère les définitions des bases et établit le score de qualité. L'étape suivante correspond à l'analyse secondaire. Les définitions des bases générées durant l'analyse primaire sont traitées afin d'obtenir des renseignements sur chaque échantillon. L'analyse est effectuée par les logiciels MiSeq Reporter ou Local Run Manager et comprend le démultiplexage, la génération du fichier FASTQ, l'alignement, l'appel des variants et la génération de fichiers VCF contenant des renseignements sur les variants trouvés à des emplacements spécifiques du génome de référence.

MiSeq Reporter et Local Run Manager sont dotés des mêmes fonctions d'analyse et de rapports sur les échantillons. La principale différence entre les deux est la méthode utilisée pour effectuer l'interface avec l'instrument MiSeqDx. Pour obtenir plus de renseignements sur les différences et pour déterminer quel logiciel est utilisé, consultez *Méthodes de communication avec l'instrument MiSeqDx*, page 8.

Pour plus de renseignements sur le flux de travail d'analyse, consultez les guides du logiciel d'analyse qui est installé sur votre MiSeqDx. Consultez la section *Guides d'instruments et de logiciels*, page 20.

Méthodes de communication avec l'instrument MiSeqDx

Il existe deux méthodes différentes pour communiquer avec l'instrument MiSeqDx dans le cadre d'un test de séquençage clinique de la fibrose kystique. La méthode d'interface originale utilise le logiciel MiSeq Reporter ainsi qu'Illumina Worklist Manager (IWM) et le logiciel de gestion de l'utilisateur Illumina. La nouvelle méthode utilise le logiciel Local Run Manager.

MiSeq Reporter et Local Run Manager sont dotés des mêmes fonctions d'analyse et de rapports sur les échantillons.

Fonctions du logiciel	Originale	Nouvelle
Configurer une analyse pour l'instrument MiSeqDx	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Configuration et suivi de l'échantillon	Illumina Worklist Manager (IWM)	Local Run Manager
Contrôle de l'accès utilisateur	Logiciel de gestion de l'utilisateur Illumina	Local Run Manager
Effectuer une analyse secondaire	MiSeq Reporter	Local Run Manager
Générer les rapports	MiSeq Reporter	Local Run Manager

Suivez ces étapes pour déterminer si Local Run Manager est utilisé.

- 1 Accédez à l'instrument MiSeqDx à distance.
- 2 Connectez-vous lorsque vous y êtes invité.
- 3 Assurez-vous que « Local Run Manager » s'affiche en haut de l'écran.



REMARQUE

S'il ne vous est pas demandé de vous connecter lors d'un accès à distance à l'instrument, MiSeq Reporter est en cours d'utilisation.

Outils de suivi

Illumina fournit les outils suivants pour le suivi des échantillons et le guidage en laboratoire :

- ▶ Le **fichier de rapport de laboratoire** permet d'enregistrer des renseignements tels que le nom de l'opérateur, les renseignements sur l'échantillon et l'index, les heures de démarrage et d'arrêt, les numéros de lots de réactifs, ainsi que les codes à barres.
- ▶ Pour le logiciel MiSeq Reporter, **Illumina Worklist Manager** permet de créer la feuille d'échantillons à l'aide d'une application basée sur un assistant. Le logiciel Illumina Worklist Manager offre une fonction permettant d'enregistrer les paramètres correspondant à la plaque d'échantillon, tels que l'identifiant d'échantillon, les indices doubles, ainsi que d'autres caractéristiques applicables à l'analyse. Local Run Manager fournit les mêmes fonctionnalités. Cependant, il n'y a pas de feuille d'échantillons distincte. Saisissez les renseignements de configuration de l'échantillon directement dans le **module d'analyse de séquençage clinique de fibrose kystique de Local Run Manager**.



REMARQUE

Vous pouvez télécharger les documents ci-dessus du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina à partir du site Web d'Illumina. Rendez-vous à la page de soutien du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina et cliquez sur l'onglet **Documentation & Literature**.

Pour commencer

La présente section décrit le contenu de la trousse du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina, les consommables et l'équipement utilisés, les recommandations sur l'entrée d'ADN et les pratiques exemplaires à observer pendant l'exécution du protocole.

Contenu de la trousse du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx

La trousse du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina contient les composants suivants. Stockez les composants de la trousse à la température indiquée et dans les zones désignées de pré-amplification et de post-amplification.

Les réactifs de pré-amplification et de post-amplification étant livrés ensemble, il est important de déballer les réactifs de pré-amplification dans la zone de pré-amplification du laboratoire, puis de déplacer les réactifs de post-amplification vers la zone de stockage de post-amplification appropriée.

Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, boîte 1

Tableau 1 Boîte 1A : réactifs de pré-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Test de séquençage clinique de la fibrose kystique : pool d'oligos	1 tube	600 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des oligonucléotides ciblant le gène <i>CFTR</i>	de -25 à -15 °C
Tampon d'hybridation	1 tube	4,32 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et du formamide	de -25 à -15 °C
Mélange extension-ligation	1 tube	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant un mélange exclusif d'ADN polymérase, de ligase ADN et des dNTP	de -25 à -15 °C
Primers d'index C (A503), D (A504) et E (A505)	1 tube par primer	192 µl	Primers PCR avec des séquences d'indexage et des adaptateurs de séquençage	de -25 à -15 °C
Primers d'index 1 (A701), 2 (A702) et 10 (A710)	1 tube par primer	128 µl	Primers PCR avec des séquences d'indexage et des adaptateurs de séquençage	de -25 à -15 °C
Polymérase PCR	1 tube	56 µl	ADN polymérase exclusive	de -25 à -15 °C
Mélange maître PCR	1 tube	2,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des dNTP	de -25 à -15 °C

Tableau 2 Boîte 1B : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Diluant de normalisation de librairie	1 tube	4,6 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	de -25 à -15 °C
Tampon de dilution de librairie	1 tube	4,5 ml	Solution aqueuse tamponnée	de -25 à -15 °C
Contrôle interne PhiX	1 tube	10 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant l'ADN génomique PhiX	de -25 à -15 °C

Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, boîte 2

Tableau 3 Boîte 2 : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Contenu	Stockage
Cartouche MiSeqDx : test de séquençage clinique de la fibrose kystique	6 cartouches	Cartouche à utilisation unique qui contient des réactifs pour la génération d'amplifiats et le séquençage à utiliser avec l'instrument MiSeqDx, comprend du formamide, du 2-mercaptoéthanol et < 2 % de DMSO.	de -25 à -15 °C

Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, boîte 3

Tableau 4 Boîte 3A : réactifs de pré-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Tampon de lavage rigoureux	1 flacon	24 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	de 2 à 8 °C
Tampon de lavage universel	1 tube	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	de 2 à 8 °C

Tableau 5 Boîte 3B : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Billes de nettoyage PCR	1 tube	5 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide et du polyéthylène glycol	de 2 à 8 °C
Lavage de normalisation de librairie	2 tubes	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, du 2-mercaptoéthanol et du formamide	de 2 à 8 °C
Billes de librairie	1 tube	1,2 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide	de 2 à 8 °C
Flow Cell MiSeqDx - Test de séquençage clinique de la fibrose kystique	6 conteneurs	1 Flow Cell	Substrat en verre avec des oligonucléotides liés par covalence	de 2 à 8 °C

Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, boîte 4

Tableau 6 Boîte 4 : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Solution SBS MiSeqDx (PR2) - Test de séquençage clinique de la fibrose kystique	6 flacons	353,1 ml	Solution aqueuse tamponnée	de 2 à 8 °C

Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx, boîte 5

Tableau 7 Boîte 5 : réactifs de pré-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Plaque filtrante	6 plaques	s.o.	Plaque de microtitration en polypropylène avec une membrane en polyéthersulfone modifiée	de 15 à 30 °C

Tableau 8 Boîte 5 : réactifs de post-amplification

Composant	Quantité	Volume de remplissage	Ingrédients actifs	Stockage
Tampon d'éluion	1 tube	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée	de 15 à 30 °C
Tampon de stockage de librairie	1 tube	3,5 ml	Solution aqueuse tamponnée	de 15 à 30 °C

Réactifs nécessaires, non fournis

Réactifs de pré-amplification

- ▶ NaOH de 10 N (préparez à partir de comprimés ou utilisez une solution standard)
- ▶ Tampon TE
- ▶ Eau sans DNase/RNase

Réactifs de post-amplification

- ▶ NaOH de 10 N (préparez à partir de comprimés ou utilisez une solution standard)
- ▶ Éthanol 200 pour la biologie moléculaire
- ▶ Tampon TE
- ▶ Eau sans DNase/RNase

Équipement et matériel

Équipement et matériels fournis, vendus séparément

- 1 **Instrument MiSeqDx**, n° de référence DX-410-1001
- 2 **Trousse de montage de plaque d'index TruSeq**, n° de référence FC-130-1005
- 3 **Trousse de montage de plaque d'index et de collier TruSeq**, n° de référence FC-130-1007
- 4 **Bouchons de remplacement d'adaptateur d'index**, n° de référence DX-502-1003

Équipement et matériel nécessaires, non fournis

Équipement et matériel de pré-amplification

- 1 **Bloc chauffant** : un bloc chauffant pour une plaque à 96 puits est nécessaire. Le bloc chauffant doit être conforme aux spécifications de performance suivantes : vous pouvez utiliser des blocs chauffants avec couvercles chauffés.
 - Fourchette de température : de 5 °C à 99 °C
 - Régulation de la température : $\pm 0,1$ °C à 37 °C, $\pm 0,4$ °C à 60 °C
- 2 **Incubateur d'échantillons** : un incubateur (four à hybridation) est nécessaire. L'incubateur doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
 - Fourchette de température : de 10 °C à 100 °C
 - Régulation de la température : $\pm 0,2$ °C
- 3 **Centrifugeuse de table** : une centrifugeuse de table pouvant maintenir une température de 20 °C est nécessaire. (Une centrifugeuse séparée est nécessaire dans la zone de post-amplification.) Vous pouvez utiliser n'importe quelle centrifugeuse pour plaques qui accepte une plaque à 96 puits avec une unité de filtre atteignant les vitesses indiquées dans le protocole (de 280 à 2 400 x g).
- 4 **Pipettes de précision** : un ensemble de pipettes de précision est nécessaire. (Un ensemble séparé est nécessaire dans la zone de post-amplification.) L'utilisation de pipettes de précision est nécessaire pour veiller à la distribution précise des réactifs et des échantillons. Les pipettes monocanaux ou multicanaux peuvent être utilisées si elles sont étalonnées régulièrement et sont précises à moins de 5 % du volume indiqué.
- 5 **Consommables** : les consommables suivants sont nécessaires.
 - Plaques PCR à jupe à 96 puits, 0,2 ml, en polypropylène ou équivalent
 - Plaques de stockage à 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)
 - Bassin de solution, sans PVC, ni DNase, ni RNase (cuve)
 - Opercule adhésif en aluminium
 - Joint de plaque PCR approprié
 - Pointes de pipette résistantes à l'aérosol

Équipement et matériel de post-amplification

- 1 **Thermocycleur** : un thermocycleur est nécessaire. Le thermocycleur doit avoir un couvercle chauffé et respecter les spécifications de performance suivantes :
 - Plage de contrôle de la température : 4 °C à 99 °C
 - Précision du contrôle : $\pm 0,25$ °C de 35 °C à 99 °C
- 2 **Agitateur pour microplaques** : un agitateur pour microplaques est nécessaire dans la zone de post-amplification du laboratoire. L'agitateur pour microplaques doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
 - Vitesse de mélange maximale : 3 000 tr/min
 - Plage de vitesses de mélange : 200 à 3 000 tr/min
- 3 **Centrifugeuse de table** : une centrifugeuse de table pouvant maintenir une température de 20 °C est nécessaire. (Une centrifugeuse séparée est nécessaire dans la zone de préamplification.) Vous pouvez utiliser n'importe quelle centrifugeuse pour plaques atteignant les vitesses indiquées par le protocole (280 à 2 400 x g).
- 4 **Bloc chauffant** : un bloc chauffant pour les tubes est nécessaire. Le bloc chauffant doit être conforme aux spécifications de performance suivantes :
 - Plage de températures : ambiante +5 °C à 99 °C

- Régulation de température : $\pm 0,1$ °C à 37 °C; $\pm 0,4$ °C à 60 °C
- 5 **Support magnétique** : un support magnétique pour une plaque à 96 puits est nécessaire. Les meilleures performances sont atteintes lorsque les aimants sont du côté du support et non au fond.
 - 6 **Pipettes de précision** : un ensemble de pipettes de précision est nécessaire. (Un ensemble séparé est nécessaire dans la zone de préamplification.) L'utilisation de pipettes de précision est nécessaire pour s'assurer d'une distribution précise des réactifs et des échantillons. Les pipettes monocanaux ou multicanaux peuvent être utilisées si elles sont étalonnées régulièrement et sont précises à moins de 5 % du volume indiqué.
 - 7 **Consommables** : les consommables suivants sont nécessaires.
 - Plaques PCR à jupe à 96 puits, 0,2 ml, en polypropylène ou équivalent
 - Plaques de stockage à 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)



REMARQUE

Assurez-vous que la plaque à 96 puits s'adapte parfaitement au support magnétique.

- Tubes coniques, 15 mL
- Tubes de microcentrifugeuse Eppendorf (bouchon vissé recommandé)
- Barrettes de huit tubes PCR
- Bassins de solution, sans PVC ni ADNase/ARNase (cuve)
- Opercules adhésifs en aluminium
- Joints de plaque adhésifs à usage unique
- Pointes de pipette résistantes à l'aérosol

Éviter la contamination du produit PCR

La procédure PCR est généralement utilisée dans le laboratoire pour amplifier des séquences d'ADN spécifiques. À moins de respecter une hygiène de laboratoire appropriée, les produits PCR peuvent contaminer les réactifs, les instruments et les échantillons d'ADN génomique, et entraîner des résultats inexacts et non fiables. La contamination du produit PCR peut mettre fin aux procédures du laboratoire et retarder considérablement les opérations normales.

Assurez-vous que le laboratoire est correctement installé pour réduire le risque de contamination du produit PCR.

► Séparer physiquement les zones de pré-amplification et de post-amplification

- Séparez physiquement l'espace de laboratoire réservé aux procédures de pré-amplification (extraction d'ADN, quantification et normalisation) de l'espace de laboratoire dédié aux procédures de post-amplification.
- N'utilisez jamais le même évier pour laver les cuves de pré-amplification et de post-amplification.
- Ne partagez jamais le même système de purification d'eau entre les procédures de pré-amplification et de post-amplification.
- Stockez toutes les fournitures utilisées dans les protocoles dans la zone de pré-amplification et transférez-les vers la zone de post-amplification au besoin.

► Utiliser des équipements et fournitures dédiés

- Dédiez des trousse complètes et distinctes d'équipements et de fournitures (pipettes, centrifugeuses, four, bloc chauffant, etc.) aux procédures de laboratoire de pré-amplification et de post-amplification. Veillez à ne jamais les échanger entre les procédures.

- Dédiez des espaces de stockage séparés (congélateurs et réfrigérateurs) aux consommables de pré-amplification et de post-amplification.

Les réactifs de pré-amplification et de post-amplification étant livrés ensemble, il est important de débarrasser les réactifs dans la zone de pré-amplification du laboratoire, puis de déplacer les réactifs de post-amplification vers la zone de stockage de post-amplification appropriée.

Procédures de laboratoire pré-amplification et post-amplification

Pour éviter la contamination du produit PCR, il est important d'établir des procédures de laboratoire et de suivre les meilleures pratiques. Illumina recommande un nettoyage quotidien et hebdomadaire des zones de laboratoire à l'aide d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (10 % d'eau de Javel).



ATTENTION

Pour éviter la dégradation d'un échantillon ou d'un réactif, assurez-vous que toutes les vapeurs de la solution de nettoyage se sont entièrement dissipées avant de commencer une procédure quelconque.

Nettoyage quotidien de la zone de pré-amplification

Un nettoyage quotidien de la zone de pré-amplification à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (10 % d'eau de Javel) permet d'éliminer le produit PCR ayant pénétré dans la zone de pré-amplification.

Identifiez les zones de pré-amplification qui présentent le risque de contamination le plus élevé et nettoyez ces zones avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (10 % d'eau de Javel) avant de commencer toute procédure de pré-amplification. Les zones à haut risque peuvent comprendre, mais sans s'y limiter, les éléments suivants :

- ▶ Paillasse
- ▶ Poignées de porte
- ▶ Poignées de porte de réfrigérateur ou de congélateur
- ▶ Souris d'ordinateur
- ▶ Claviers

Nettoyage quotidien de la zone de post-amplification

La réduction de la quantité de produit PCR dans la zone de post-amplification permet de réduire le risque de contamination dans la zone de pré-amplification. Un nettoyage quotidien de la zone de post-amplification à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (10 % d'eau de Javel) permet d'atteindre cet objectif.

Identifiez les zones de post-amplification qui présentent le risque de contamination le plus élevé et nettoyez ces zones avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (10 % d'eau de Javel) tous les jours. Les zones à haut risque peuvent comprendre, mais sans s'y limiter, les éléments suivants :

- ▶ Thermocycleurs
- ▶ Espace de paillasse utilisé pour le traitement d'ADN amplifié
- ▶ Poignées de porte
- ▶ Poignées de porte de réfrigérateur ou de congélateur
- ▶ Souris d'ordinateur
- ▶ Claviers

Nettoyage hebdomadaire de toutes les zones du laboratoire

Une fois par semaine, effectuez un nettoyage en profondeur des zones de pré-amplification et de post-amplification à l'aide d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (10 % d'eau de Javel).

- ▶ Nettoyez toutes les paillasse et surfaces de laboratoire.
- ▶ Nettoyez tous les instruments qui ne sont pas nettoyés tous les jours.
- ▶ Nettoyez soigneusement les planchers du laboratoire.
- ▶ Assurez-vous que le personnel chargé du nettoyage hebdomadaire est correctement formé sur la prévention de la contamination du produit PCR.

Articles tombés sur le plancher

Le plancher est contaminé par le produit PCR transféré sur les chaussures des personnes provenant de la zone de post-amplification; par conséquent, tout élément tombant sur le plancher doit être considéré comme étant contaminé.

- ▶ Les éléments jetables tombés sur le plancher, comme des tubes vides, des extrémités de pipette, des gants, des cintres de laboratoire, doivent être jetés.
- ▶ Les éléments non jetables tombés sur le plancher, comme une pipette ou un contenant d'échantillon important, doivent être immédiatement et soigneusement nettoyés avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (10 % d'eau de Javel) pour éliminer toute contamination par le produit PCR.
- ▶ Nettoyez toute surface de laboratoire qui est entrée en contact avec l'élément contaminé. Les personnes ayant manipulé un élément quelconque tombé sur le plancher, jetable ou non jetable, doivent jeter leurs gants de laboratoire et enfiler une nouvelle paire.

Précautions

Respectez les recommandations suivantes lors de la préparation de bibliothèques destinées au séquençage à l'aide de ce protocole.

Maintien de la cohérence

- ▶ **Utilisez des pipettes multicanaux** : pour assurer la cohérence d'un échantillon à l'autre, utilisez si possible une pipette multicanaux. Étalonnez régulièrement les pipettes.
- ▶ **Cohérence des préparations d'échantillons de plus petite taille** : chaque tube de réactif fourni avec la trousse contient un volume suffisant pour générer des résultats en utilisant des pipettes manuelles et des cuves à réactifs selon les techniques de laboratoire standard. Pour garantir une distribution précise des volumes du réactif, introduisez le réactif dans chaque puits à l'aide d'une pipette unique ou d'une pipette multicanaux dans une barrette de huit tubes PCR.

Manipulation des billes magnétiques

- ▶ **Utilisez-les à température ambiante** : avant de les utiliser, laissez les billes atteindre la température ambiante.
- ▶ **Agitez-les jusqu'à obtenir une suspension adéquate** : juste avant de les utiliser, agitez les billes jusqu'à ce que leur suspension soit adéquate et que la couleur apparaisse homogène.

- ▶ **Mélangez soigneusement les échantillons** : après avoir ajouté les billes aux échantillons, mélangez soigneusement en aspirant et en réinjectant dix fois à la pipette. Illumina recommande également d'utiliser un agitateur pour soigneusement mélanger les échantillons.
- ▶ **Laissez le temps d'obtenir une fixation maximale** : pour obtenir de meilleurs résultats, incubez les mélanges d'échantillons et de billes à température ambiante pendant la durée entière indiquée dans le protocole.
- ▶ **Aspirez lentement la solution clarifiée** : après avoir placé la plaque sur le support magnétique, attendez que la solution se clarifie avant de continuer. Laissez la plaque sur le support magnétique en aspirant lentement la solution clarifiée; faites attention de ne pas secouer les billes séparées.

Prévention de la contamination croisée

- ▶ **Changez de pointes de pipettes entre la distribution des réactifs et des échantillons** : utilisez toujours des pointes de pipette neuves entre la distribution des réactifs et des échantillons.
- ▶ **Mélangez les plaques comme indiqué** : mélangez les échantillons avec une pipette multicanaux et centrifugez la plaque, lorsqu'indiqué. N'agitez pas les plaques.
- ▶ **Utilisez des pointes de pipettes résistantes aux aérosols** : l'utilisation de pointes de pipettes résistantes aux aérosols permet de réduire le risque de transfert d'amplicons et de contamination croisée entre les échantillons.

Lavage à l'éthanol à 80 % lors de l'étape de nettoyage PCR

- ▶ **Préparez une nouvelle solution d'éthanol à 80 %** : préparez toujours une nouvelle solution d'éthanol à 80 % pour les étapes de lavage. L'éthanol peut absorber l'eau présente dans l'air et affecter les résultats.
- ▶ **Retirez tout l'éthanol des puits** : assurez-vous que tout l'éthanol est retiré du fond des puits, car il pourrait contenir des contaminants résiduels. Utilisez une pipette multicanaux P20 pour retirer l'éthanol résiduel et accélérer le séchage.
- ▶ **Laissez assez de temps pour une évaporation complète** : comptez au moins cinq minutes de temps de séchage hors du support magnétique à température ambiante pour une évaporation complète. L'éthanol résiduel peut modifier la performance des réactions ultérieures.

Exigences d'entrée d'ADN

- ▶ Le protocole du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina exige 250 ng d'ADN génomique. Illumina recommande vivement de quantifier le matériel génomique de départ.
- ▶ **Quantification de l'ADN d'entrée** : quantifiez le matériel génomique de départ à l'aide de méthodes par spectromètre UV basées sur les mesures OD A260/A280.
- ▶ **Évaluation de la qualité de l'ADN** : des mesures d'absorbance à 260 nm servent généralement à quantifier l'ADN. Le rapport entre l'absorbance à 260 nm et l'absorbance à 280 nm sert d'indication de la pureté de l'échantillon. Ce protocole est optimisé pour l'ADN disposant de valeurs de rapports d'absorbance supérieures à 1,5.

Contrôles qualité

- ▶ Les bonnes pratiques de laboratoire exigent qu'un échantillon d'ADN de contrôle positif et qu'un autre échantillon de contrôle négatif (sans modèle) soient inclus dans chaque analyse.
- ▶ L'échantillon d'ADN de contrôle positif doit être un échantillon correctement caractérisé présentant une mutation CFTR connue.
- ▶ Illumina recommande également d'inclure un contrôle de type sauvage à chaque analyse.

Acronymes

Tableau 9 Acronymes pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina

Acronyme	Définition
AMP	Plaque d'amplification
CLP	Plaque de nettoyage
DAL	Librairie d'amplicons dilués
FPU	Unité de plaque filtrante
HYB	Plaque d'hybridation
LNP	Plaque de normalisation de librairie
NTC	Contrôle sans modèle
PAL	Librairie d'ensembles d'amplicons
SGP	Plaque de stockage

Guides d'instruments et de logiciels

Les guides d'instruments et de logiciels utilisés avec le test de séquençage clinique de la fibrose kystique Illumina MiSeqDx dépendent de la configuration du lecteur de l'instrument MiSeqDx et du logiciel d'analyse installé sur celui-ci.

Si vous ne savez pas quel logiciel est installé sur le MiSeqDx, consultez les *Méthodes de communication avec l'instrument MiSeqDx*, page 8. Si vous n'êtes pas sûr de la configuration du lecteur de votre MiSeqDx, communiquez avec le support technique d'Illumina.

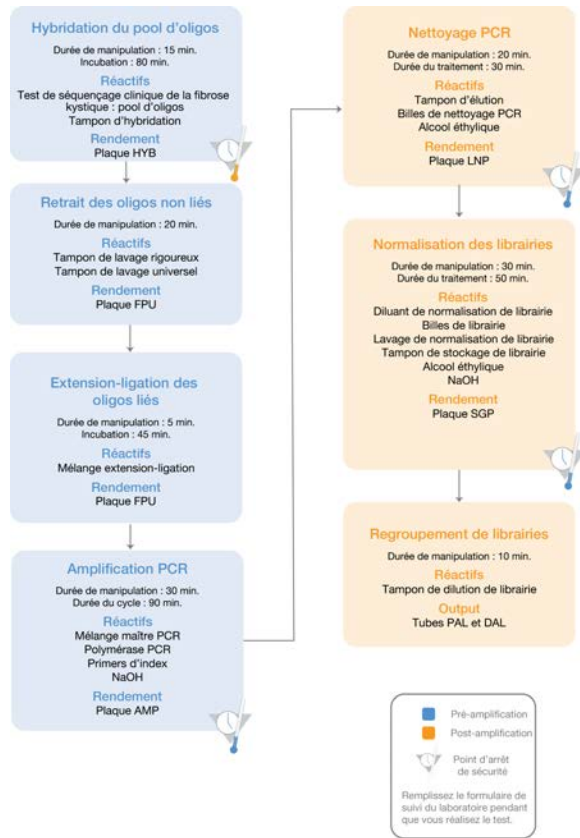
Guides	Lecteur à amorçage double avec le logiciel Local Run Manager	Lecteur à amorçage double avec le logiciel MiSeq Reporter	Lecteur à amorçage simple avec le logiciel MiSeq Reporter
<i>Guide de préparation du site MiSeqDx pour instruments avec configuration à amorçage double (document n° 15070066)</i> Guide de préparation du site	x	x	
<i>Guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour MOS v2 (document n° 1000000021961)</i> Guide de référence de l'instrument	x		
<i>Guide de référence du logiciel Local Run Manager pour MiSeqDx (document n° 1000000011880)</i> Guide du logiciel d'analyse	x		
<i>Guide du flux de travail du module d'analyse de séquençage clinique Local Run Manager (document n° 1000000012185)</i> Guide du logiciel d'analyse	x		
<i>Guide de référence MiSeqDx pour instruments avec configuration à amorçage double (document n° 15070067)</i> Guide de référence de l'instrument		x	
<i>Guide de préparation du site de l'instrument MiSeqDx (document n° 15038351)</i> Guide de préparation du site			x

Guides	Lecteur à amorçage double avec le logiciel Local Run Manager	Lecteur à amorçage double avec le logiciel MiSeq Reporter	Lecteur à amorçage simple avec le logiciel MiSeq Reporter
<i>Guide de référence de l'instrument MiSeqDx (document n° 15038353)</i> Guide de référence de l'instrument			x
<i>Guide du logiciel MiSeq Reporter (document n° 15038356)</i> Guide du logiciel d'analyse		x	x
<i>Guide de sécurité et de conformité de l'instrument MiSeqDx (document n° 15034477)</i> Guide de sécurité et de conformité de l'instrument	x	x	x

Flux de travail du test

Le diagramme suivant montre le flux de travail du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina. Les points d'arrêt de sécurité sont marqués entre les étapes.

Figure 1 Test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina Flux de travail



Saisie des renseignements sur l'analyse

Vous pouvez utiliser les logiciels MiSeq Reporter ou Local Run Manager pour configurer un test de séquençage clinique de la fibrose kystique. Pour obtenir des renseignements complets, consultez les guides du logiciel d'analyse concernant votre configuration répertoriés dans *Guides d'instruments et de logiciels*, page 20.

Si vous utilisez le logiciel MiSeq Reporter, utilisez Illumina Worklist Manager pour générer une feuille d'échantillons.

Si vous utilisez le logiciel Local Run Manager, il n'existe pas de feuille d'échantillons distincte. Saisissez les renseignements de configuration de l'analyse et des échantillons directement dans le module d'analyse de séquençage clinique de la fibrose kystique dans Local Run Manager.

Pour obtenir plus de renseignements sur les différences entre MiSeq Reporter et Local Run Manager, consultez *Méthodes de communication avec l'instrument MiSeqDx*, page 8.

Utilisation d'Illumina Worklist Manager (IWM)

Préparation de la feuille d'échantillons MiSeqDx

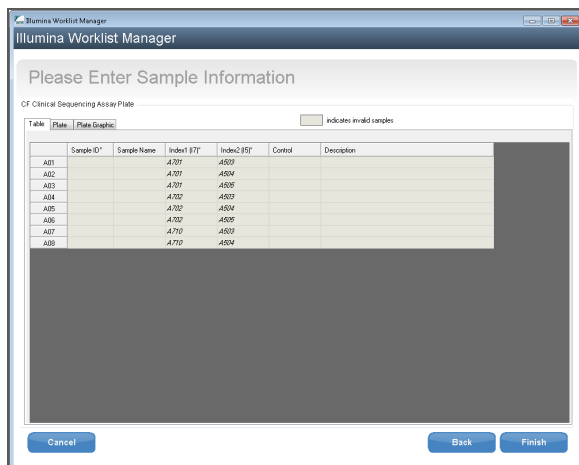
- 1 À partir de l'écran d'accueil du Worklist Manager d'Illumina, sélectionnez **Create Worklist** (Créer la liste de travail). L'écran Enter Run Parameters (Entrer les paramètres d'analyse) s'ouvre.

Figure 2 Worklist Manager d'Illumina, écran Enter Run Parameters (Entrer les paramètres d'analyse)

- 2 Dans le champ Test Type (Type de test), sélectionnez **CF Clinical Sequencing Assay** (Test de séquençage clinique de la fibrose kystique).
- 3 Dans le champ Worklist Name (Nom de la liste de travail), saisissez un nom pour la feuille d'échantillons. Il s'agit d'un champ obligatoire.
 - Si l'identifiant du code à barres de la cartouche de réactifs alphanumérique est utilisé pour le nom de la feuille d'échantillons, le logiciel MiSeq Operating Software (MOS) trouve automatiquement la feuille d'échantillons. (Cet identifiant se trouve sur l'étiquette de la cartouche de réactifs, juste sous le code à barres.)
 - Si un autre nom est utilisé pour la feuille d'échantillons, le bouton **Browse** (Parcourir) du MiSeq Operating Software (MOS) peut être utilisé pour trouver la feuille d'échantillons appropriée.
- 4 [Facultatif] Saisissez une description pour identifier l'analyse.

- 5 Assurez-vous que la date correspond à la date de début de l'analyse. La date du jour apparaît par défaut.
- 6 Sélectionnez **Next** (Suivant). L'écran Enter Sample Information (Saisissez les renseignements sur l'échantillon) s'ouvre.

Figure 3 Worklist Manager d'Illumina, écran Enter Sample Information (Entrer les renseignements sur l'échantillon)



Saisie des renseignements sur l'échantillon

- 1 Dans l'onglet Table (Tableau) ou l'onglet Plate (Plaque), saisissez les renseignements suivants pour chaque puits d'échantillon :
 - a **Sample ID** (Identifiant de l'échantillon) : saisissez un identifiant d'échantillon unique. L'identifiant de l'échantillon sert à suivre l'échantillon, de la préparation au séquençage et à l'analyse. L'identifiant est habituellement un code à barres; toutefois, toute valeur est acceptable.
 - b **Index 1 et Index 2** : précisez l'adaptateur d'index qui sera utilisé pour chaque lecture d'index. Illumina recommande d'utiliser des combinaisons créant au moins une base A ou C (rouge) et au moins une base G ou T (vert) pour chaque cycle.



REMARQUE

Veillez consulter la section *Débit d'échantillons et représentation d'index*, page 27, pour obtenir de l'aide dans le choix des index appropriés.

- 2 **[Facultatif]** Pour enregistrer des renseignements plus détaillés sur les échantillons, saisissez un nom et une description.
- 3 **[Facultatif]** Pour identifier des contrôles sur la plaque, sélectionnez Negative (Négatif) ou Positive (Positif) dans le menu déroulant **Control** (Contrôle).
- 4 Accédez à l'onglet Plate Graphic (Graphique de la plaque) et utilisez les options **Copy to Clipboard** (Copier dans le bloc-notes) ou **Print** (Imprimer) pour capturer une image de la plaque d'échantillon.

Figure 4 Illumina Worklist Manager, onglet Plate Graphic (Graphique de la plaque)

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

- 5 Sélectionnez **Finish** (Terminer). Lorsque vous enregistrez une feuille d'échantillons, le logiciel crée automatiquement un fichier .csv et un fichier .png de l'onglet Plate Graphic (Graphique de la plaque) et les enregistre au même emplacement pour être utilisés avec la configuration de l'expérience.



REMARQUE

Utilisez seulement le Worklist Manager d'Illumina pour modifier les renseignements dans la feuille d'échantillons. La modification des renseignements hors du logiciel Illumina Worklist Manager peut entraîner l'échec de l'analyse.

Utilisation du module d'analyse de séquençage clinique de la fibrose kystique dans Local Run Manager

Configuration des paramètres

- 1 Connectez-vous à Local Run Manager.
- 2 Cliquez sur **Create Run** (Créer une analyse), puis sélectionnez **CF Clinical** (Fibrose kystique clinique).
- 3 Saisissez un nom d'analyse pour identifier l'analyse du séquençage à l'analyse. Utilisez des caractères alphanumériques, des espaces, des traits de soulignement ou des tirets.
- 4 [Facultatif] Saisissez une description d'analyse pour aider à identifier l'analyse. Utilisez des caractères alphanumériques.


Spécification des échantillons pour l'analyse

Indiquez des échantillons pour l'analyse à l'aide des solutions suivantes :

- ▶ **Saisie manuelle des échantillons** : utilisez le tableau vide sur l'écran Create Run (Créer une analyse). Les puits d'échantillons suggérés sont mis en surbrillance.
- ▶ **Importation des échantillons** : naviguer vers un fichier de valeurs séparées par des virgules (*.csv) externe. Il est possible d'en télécharger un modèle sur l'écran Create Run (Créer une analyse).

Après avoir rempli le tableau des échantillons, il est possible d'exporter les renseignements concernant les échantillons vers un fichier externe, puis d'utiliser le fichier comme référence lors de la préparation de bibliothèques ou d'importer le fichier pour une autre analyse.


Saisie manuelle des échantillons

- Entrez un nom d'échantillon unique dans le champ Sample Name (Nom de l'échantillon).
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets ou des caractères de soulignement.
- Faites un clic droit et sélectionnez des échantillons de contrôle positifs et négatifs.
- [Facultatif] Saisissez une description d'échantillon dans l'onglet Sample Description (Description de l'échantillon).
Utilisez des caractères alphanumériques, des tirets, des caractères de soulignement ou des espaces.
- [Facultatif] Sélectionnez un adaptateur d'Index 1 à partir de la liste déroulante Index 1 (i7).
Cette étape est facultative, car les combinaisons d'index i7 et i5 qui remplissent les puits automatiquement remplissent déjà les exigences de diversité d'index.
- [Facultatif] Sélectionnez un adaptateur d'Index 2 à partir de la liste déroulante Index 2 (i7).
Cette étape est facultative, car les combinaisons d'index i7 et i5 qui remplissent les puits automatiquement remplissent déjà les exigences de diversité d'index.
- Cliquez sur l'icône  **Print** (Imprimer) pour afficher la disposition de la plaque.
- Sélectionnez **Print** (Imprimer) pour imprimer la disposition de la plaque à titre de référence pour la préparation de bibliothèques.
- [Facultatif] Cliquez sur **Export** (Exporter) pour exporter les renseignements concernant les échantillons vers un fichier externe.
- Cliquez sur **Save Run** (Enregistrer l'analyse).

Importation d'échantillons

- Cliquez sur **Import Samples** (Importer des échantillons) et recherchez l'emplacement du fichier contenant les renseignements des échantillons. Il est possible d'importer deux types de fichiers.
 - ▶ Cliquez sur **Template** (Modèle) pour créer une nouvelle disposition de plaque. Le fichier de modèle contient les en-têtes de colonnes corrects pour l'importation. Saisissez les renseignements des échantillons de l'analyse dans chaque colonne. Supprimez les renseignements d'exemple dans les cellules non utilisées, puis enregistrez le fichier.

Sample_Name	Description	I7_Index_ID	I5_Index_ID	Sample_Well	Control
Sample1		A701	A503	A01	
Sample2		A701	A504	A02	
Sample3		A701	A505	A03	
Sample4		A702	A503	A04	
Sample5		A702	A504	A05	
Sample6		A702	A505	A06	
Sample7		A710	A503	A07	Positive
Sample8		A710	A504	A08	Negative

- ▶ Utilisez un fichier de renseignements d'échantillon préalablement exporté en utilisant la fonction **Export** (Exporter) du module d'analyse de flux de travail.
- 2 Cliquez sur l'icône  **Print** (Imprimer) pour afficher la disposition de la plaque.
- 3 Sélectionnez **Print** (Imprimer) pour imprimer la disposition de la plaque à titre de référence pour la préparation de bibliothèques.
- 4 [Facultatif] Cliquez sur **Export** (Exporter) pour exporter les renseignements concernant les échantillons vers un fichier externe.
- 5 Cliquez sur **Save Run** (Enregistrer l'analyse).

Débit d'échantillons et représentation d'index

Dans le cas du test de séquençage clinique de la fibrose kystique MiSeqDx d'Illumina, le débit d'échantillons par analyse MiSeqDx est huit échantillons. Les primers d'indexage utilisés pendant l'amplification par PCR doivent être choisis en fonction du débit d'échantillons final souhaité pour assurer la diversité dans la séquence d'indexage.

L'instrument MiSeqDx utilise un voyant DEL vert pour séquencer des bases G/T et un voyant DEL rouge pour séquencer des bases A/C. À chaque cycle, au moins un des deux nucléotides de chaque canal de couleur doit être lu pour assurer l'enregistrement approprié. Il est important de maintenir l'équilibre des couleurs pour chaque base de la lecture d'index en cours de séquençage, sinon un échec de l'enregistrement pourrait se produire lors du séquençage de la lecture d'index.

Utilisez le jeu d'index d'équilibre des couleurs minimal suivant pour les analyses de séquençage de huit échantillons :

Tableau 10 Mélanges de primers d'index pour des analyses de séquençage avec huit échantillons

	Primer d'index 1 (A701)	Primer d'index 2 (A702)	Primer d'index 10 (A710)
Primer d'index C (A503)	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3
Primer d'index D (A504)	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6
Primer d'index E (A505)	Échantillon 7	Échantillon 8	--

Si six échantillons uniques (à l'exclusion des contrôles positifs et négatifs) ne sont pas disponibles, il convient d'effectuer l'analyse avec les répliques de n'importe quel échantillon d'ADN génomique humain.

Hybridation du pool d'oligonucléotides

Lors de cette étape, le pool d'oligonucléotides de fibrose kystique contenant les oligonucléotides en amont et en aval spécifiques au gène régulateur de perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR) est hybridé avec les échantillons d'ADN génomique.



AVERTISSEMENT

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire adaptée à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html.

Durée estimée

- ▶ Durée totale : 1 heure 35 minutes
- ▶ Durée de manipulation : 15 minutes

Consommables

Élément	Quantité	Stockage	Fourni par
Test de séquençage clinique de la fibrose kystique : pool d'oligos	1 tube	de -25 à -15 °C	Illumina
Tampon d'hybridation	1 tube	de -25 à -15 °C	Illumina
ADN génomique (50 ng/µl recommandé)	5 µl	de -25 à -15 °C	Utilisateur
Plaque PCR à jupe 96 puits	1 plaque	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Opercule adhésif en aluminium	2 opercules	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Cuves stériles	Au besoin	de 15 à 30 °C	Utilisateur

Préparation

- 1 Retirez le pool d'oligos pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique, le tampon d'hybridation, les échantillons d'ADN génomique et l'échantillon de contrôle positif du stockage entre -25 °C et -15 °C et laissez décongeler jusqu'à la température ambiante.
- 2 Agitez vigoureusement le tampon d'hybridation et le pool d'oligos pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique pour veiller à ce que tous les précipités soient complètement dissouts, puis centrifugez brièvement les tubes pour recueillir le liquide.



REMARQUE

Avant d'utiliser le tampon d'hybridation, tenez le tube devant une lumière et inspectez visuellement pour vous assurer que tous les précipités sont complètement dissouts.

- 3 Réglez un bloc chauffant de 96 puits à 95 °C.
- 4 Préchauffez un incubateur à 37 °C pour préparer l'étape d'extension-ligation.
- 5 Créez la plaque d'échantillon en fonction du graphique de la plaque imprimé à partir d'Illumina Worklist Manager ou de Local Run Manager. Vérifiez la position de correspondance des contrôles positifs et négatifs. Illumina recommande le traitement des échantillons par lots d'au moins huit.



REMARQUE

L'utilisation des contrôles active l'assistance technique d'Illumina pour vous fournir une assistance de dépannage efficace. L'assistance technique d'Illumina ne fournira pas d'assistance à moins que les réactions de ce contrôle aient été incluses dans l'analyse.

Procédure

- 1 Étiquetez une nouvelle plaque PCR de 96 puits « **HYB_Plate_ID** » (Identifiant_Plaque_HYB).
- 2 Ajoutez 5 µl d'échantillon ou de contrôle à 50 ng/µl (250 ng total) dans les puits appropriés dans la plaque **HYB**. Suivez la disposition de la plaque générée pour une sélection appropriée des puits.



REMARQUE

Vérifiez que la disposition de l'échantillon d'ADN et les positions des contrôles positifs et négatifs correspondent au graphique de la plaque.

- 3 À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 5 µl du pool d'oligos pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique dans tous les puits d'échantillons. Changez les pointes après chaque colonne pour éviter la contamination croisée.
- 4 À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 40 µl de tampon d'hybridation à chaque échantillon dans la plaque **HYB**. Pipettez doucement vers le haut et le bas trois à cinq fois pour mélanger. Changez les pointes après chaque colonne pour éviter la contamination croisée.



REMARQUE

Assurez-vous que tous les cristaux ou précipités dans le tampon d'hybridation sont dissouts.



REMARQUE

Ne mélangez pas le tampon d'hybridation et le pool d'oligos pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique au moment de les stocker. S'il est combiné, le pool d'oligos pour le test de séquençage clinique de la fibrose kystique devient instable, même lorsqu'il est stocké congelé.

- 5 Scellez la plaque **HYB** avec une feuille d'aluminium adhésive et fixez le joint avec un rouleau en caoutchouc ou une cale d'étanchéité.
- 6 Centrifugez à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute.
- 7 Placez la plaque **HYB** dans le bloc préchauffé à 95 °C et incubez pendant une minute.

- 8 Réduisez la température du bloc préchauffé à 40 °C et continuez à incuber jusqu'à ce que le bloc chauffant atteigne 40 °C. Ce processus dure environ 80 minutes.

**REMARQUE**

Durant l'incubation, la température du bloc chauffant diminue progressivement de 95 à 40 °C. Ce processus dure généralement 80 minutes. Ce refroidissement progressif est très important pour une bonne hybridation; par conséquent, les thermocycleurs PCR avec refroidissement actif (p. ex. Peltier avec refroidissement thermoélectrique) ne sont pas recommandés pour ce processus.

**POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ**

Après que le bloc chauffant a atteint 40 °C, la plaque **HYB** est stable lorsqu'elle est maintenue à 40 °C pendant deux heures.

Retrait des oligonucléotides non liés

Ce processus retire les oligonucléotides non liés provenant de l'ADN génomique à l'aide d'un filtre capable de sélection en fonction de la taille. Deux étapes de lavage à l'aide du tampon de lavage rigoureux permettent de garantir l'élimination complète des oligonucléotides non liés. Une troisième étape de lavage à l'aide du tampon de lavage universel permet de retirer le tampon de lavage rigoureux résiduel et de préparer les échantillons pour l'étape d'extension-ligation.



AVERTISSEMENT

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire adaptée à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html.

Durée estimée

- ▶ Durée totale : 20 minutes
- ▶ Durée de manipulation : 20 minutes

Consommables

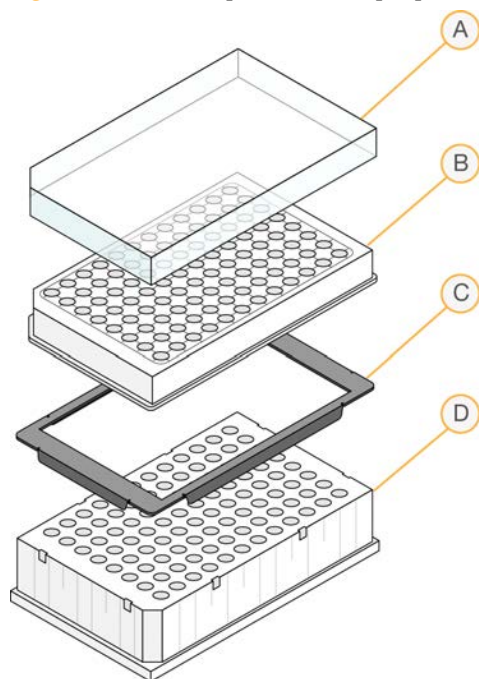
Élément	Quantité	Stockage	Fourni par
Mélange extension-ligation	1 tube	de -25 à -15 °C	Illumina
Tampon de lavage rigoureux	1 flacon	de 2 à 8 °C	Illumina
Tampon de lavage universel	1 tube	de 2 à 8 °C	Illumina
Plaque filtrante	1 plaque	de 15 à 30 °C	Illumina
Collier adaptateur	1 plaque	de 15 à 30 °C	Illumina
Plaque MIDI	1 plaque	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Cuves	Au besoin	de 15 à 30 °C	Utilisateur

Préparation

- 1 Retirez le mélange extension-ligation du lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C et décongelez à température ambiante.
Le mélange extension-ligation est utilisé dans l'étape d'extension-ligation et prend environ 20 minutes pour décongeler.
- 2 Retirez le tampon de lavage rigoureux et le tampon de lavage universel du lieu de stockage entre 2 °C et 8 °C et réservez à température ambiante.

- 3 Assemblez l'unité d'assemblage de la plaque filtrante (**FPU**) dans l'ordre suivant (de haut en bas) :

Figure 5 Ensemble pour unité de plaque filtrante



- A Couvercle
- B Plaque filtrante
- C Collier adaptateur
- D Plaque MIDI

- 4 Étiquetez la plaque filtrante avec « **FPU_Plate_ID** » (Identifiant_Plaque_FPU). L'identifiant de la plaque doit correspondre à l'identifiant utilisé pour la plaque **HYB**.
- 5 Lavez au préalable la membrane de la plaque filtrante comme suit :
 - a À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 45 µl de tampon de lavage rigoureux à chaque puits.
 - b Couvrez la plaque **FPU** avec un couvercle pour plaque filtrante et gardez-la couverte pendant chaque étape de centrifugation.
 - c Centrifugez la plaque **FPU** à 2 400 x g à 20 °C pendant cinq minutes.



REMARQUE

Assurez-vous que tous les puits de la plaque filtrante se vident complètement. Si le tampon de lavage n'est pas complètement évacué, centrifugez encore à 2 400 x g à 20 °C jusqu'à ce que tout le liquide ait disparu (cinq à dix minutes supplémentaires).



ATTENTION

Il est impératif de contrôler la température de la centrifugeuse durant les étapes de lavage. Si la température grimpe à 25 °C ou plus, la température élevée pourrait augmenter la stringence de la fixation des primers. Dans de rares cas, si les échantillons comportent des SNV dans les régions de fixation des primers, la stringence élevée pourrait entraîner l'absence d'amplification des allèles.

Procédure

- 1 Une fois l'hybridation terminée, vérifiez que le bloc chauffant a refroidi à 40 °C. Alors que la plaque **HYB** est encore dans le bloc chauffant, renforcez le joint d'étanchéité à l'aide d'un rouleau en caoutchouc ou d'un gainage. Si 40 °C n'est pas atteint au bout de 80 minutes, continuez à incuber jusqu'à ce que le bloc chauffant ait refroidi à 40 °C.
- 2 Retirez la plaque **HYB** du bloc chauffant et centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant une minute pour recueillir la condensation.
- 3 À l'aide d'une pipette multicanal réglée sur 60 µl, transférez le volume entier de chaque échantillon au centre des puits prélavés correspondants de la plaque filtrante. Changez les pointes après chaque colonne pour éviter la contamination croisée.
- 4 Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant cinq minutes.
- 5 Lavez la plaque filtrante comme suit :
 - a À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 45 µl de tampon de lavage rigoureux à chaque puits d'échantillon.
Il n'est pas nécessaire de changer les pointes entre les colonnes si vous prenez soin d'éviter la contamination croisée.
 - b Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant cinq minutes.



REMARQUE

Si le tampon de lavage n'est pas complètement évacué, centrifugez encore à 2 400 × g à 20 °C jusqu'à ce que tout le liquide ait disparu (cinq à dix minutes supplémentaires).

- 6 Répétez le lavage comme suit :
 - a À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 45 µl de tampon de lavage rigoureux à chaque puits d'échantillon.
Il n'est pas nécessaire de changer les pointes entre les colonnes si vous prenez soin d'éviter la contamination croisée.
 - b Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant cinq minutes.
 - c Si le tampon de lavage n'est pas complètement évacué, centrifugez encore la plaque filtrante à 2 400 × g à 20 °C pendant cinq minutes.
- 7 Jetez tout liquide circulant (contenant du formamide) recueilli jusqu'ici dans un conteneur à déchets dangereux approprié, puis réassemblez la **FPU**. La même plaque **MIDI** peut être réutilisée pour le reste du processus de préamplification.
- 8 À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 45 µl de tampon de lavage universel à chaque puits d'échantillon.
Il n'est pas nécessaire de changer les pointes entre les colonnes si vous prenez soin d'éviter la contamination croisée.
- 9 Couvrez la plaque filtrante avec un couvercle et centrifugez à 2 400 × g à 20 °C pendant dix minutes.



REMARQUE

Veillez à ce que tout liquide soit vidé après la centrifugation. Répétez la centrifugation si nécessaire. Les résidus de tampon de lavage peuvent inhiber les réactions enzymatiques suivantes.

Extension-ligation des oligonucléotides liés

Cette procédure relie les oligonucléotides en amont et en aval hybridés. Une ADN polymérase s'étend de l'oligonucléotide en amont jusqu'à la région ciblée, suivie d'une ligation à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide en aval en utilisant une ADN ligase. Cela aboutit à la formation de produits contenant les régions d'intérêt ciblées bordées par les séquences requises pour l'amplification.

Durée estimée

- ▶ Durée totale : 50 minutes
- ▶ Durée de manipulation : 5 minutes

Consommables

Élément	Quantité	Stockage	Fourni par
Mélange extension-ligation	1 tube	de -25 à -15 °C	Illumina
Opercule adhésif en aluminium	1 opercule	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Cuves	Au besoin	de 15 à 30 °C	Utilisateur

Procédure

- 1 À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 45 µl de mélange extension-ligation chaque puits d'échantillon de la plaque filtrante. La réaction de l'extension-ligation se déroule sur la membrane de plaque filtrante. Il n'est pas nécessaire de changer les pointes entre les colonnes si vous prenez soin d'éviter la contamination croisée.
- 2 Scellez la plaque filtrante avec une feuille d'aluminium adhésive, puis posez le couvercle pour maintenir la feuille pendant l'incubation.
- 3 Incubez l'ensemble **FPU** dans l'incubateur préchauffé à 37 °C pendant 45 minutes.
- 4 Pendant que la plaque **FPU** est en incubation, préparez la plaque d'amplification comme décrit dans la section suivante.

Amplification PCR

Lors de cette étape, les produits de l'extension-ligation sont amplifiés à l'aide de primers qui ajoutent des séquences d'indexage pour le multiplexage des échantillons, ainsi que des adaptateurs courants nécessaires pour la génération d'amplifiats.

Durée estimée

- ▶ Durée totale : ~ 90 minutes
- ▶ Durée de manipulation : 30 minutes

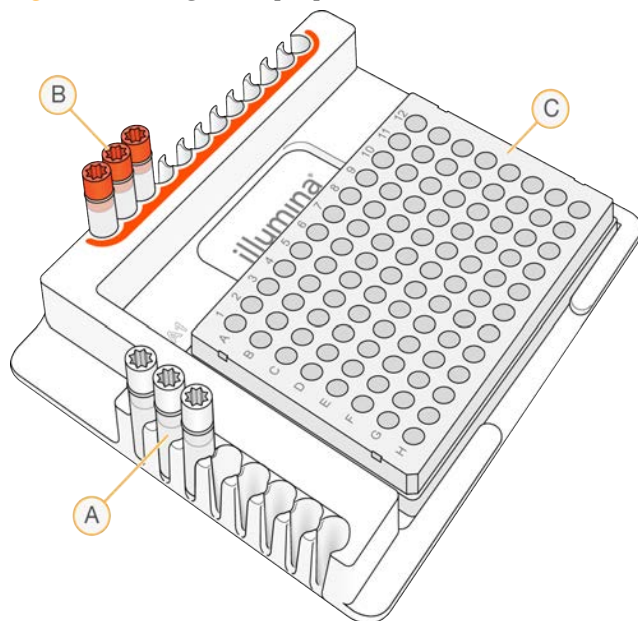
Consommables

Élément	Quantité	Stockage	Fourni par
Mélange maître PCR	1 tube	de -25 à -15 °C	Illumina
Primers d'index C (A503), D (A504) et E (A505)	1 tube par primer	de -25 à -15 °C	Illumina
Primers d'index 1 (A701), 2 (A702) et 10 (A710)	1 tube par primer	de -25 à -15 °C	Illumina
Polymérase PCR	1 tube	de -25 à -15 °C	Illumina
Joint de plaque PCR approprié	1	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Nouvelle préparation de NaOH de 0,05 N	Au besoin	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Plaque PCR à jupe, 96 puits	1 plaque	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Cuves	Au besoin	de 15 à 30 °C	Utilisateur

Préparation

- 1 Préparez une nouvelle solution 0,05 N de NaOH en ajoutant 25 µl de 10 N de NaOH à 4 975 µl d'eau sans DNase ni RNase.
- 2 Déterminez les primers d'index à utiliser selon le graphique de plaque imprimé à partir d'Illumina Worklist Manager ou de Local Run Manager.
- 3 Retirez le mélange maître PCR et les primers d'index appropriés de leur lieu de stockage entre -25 et -15 °C, et décongelez sur une paillasse à température ambiante. Laissez les réactifs décongeler pendant vingt minutes environ.
- 4 Une fois les primers d'index complètement décongelés, agitez chaque tube et centrifugez brièvement les tubes dans une microcentrifugeuse. Utilisez des tubes Eppendorf de 1,7 ml comme adaptateurs pour la microcentrifugeuse.
- 5 Organisez les primers dans un support en procédant comme suit :
 - a Placez les tubes (bouchons blancs, solution transparente) de primers d'index C (A503), D (A504) et E (A505) à la verticale en ligne avec les rangées A à H.
 - b Placez les tubes (bouchons orange, solution jaune) de primers d'index 1 (A701), 2 (A702) et 10 (A710) à l'horizontale en ligne avec les colonnes 1 à 12.

Figure 6 Montage de la plaque d'index



- A Primers d'index C (A503), D (A504) et E (A505) (bouchons blancs)
 B Primers d'index 1 (A701), 2 (A702) et 10 (A710) (bouchons orange)
 C Plaque d'amplification

- 6 Étiquetez une nouvelle plaque PCR à 96 puits « AMP » (plaque d'amplification).
- 7 Ajoutez des primers d'index à la plaque **d'amplification** en fonction de la feuille d'échantillons comme suit :
 - a À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 4 µl des primers d'index C (A503), D (A504) et E (A505) (solution transparente) aux puits appropriés dans une colonne de la plaque **d'amplification**. Il n'est pas nécessaire de changer les pointes entre les colonnes.
 - b Pour éviter la contamination croisée de l'index, mettez au rebut les bouchons blancs d'origine et utilisez de nouveaux bouchons blancs.
 - c À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 4 µl des primers d'index 1 (A701), 2 (A702) et 10 (A710) (solution jaune) aux puits appropriés dans une rangée de la plaque **d'amplification**. *Les pointes doivent être changées après chaque rangée pour éviter la contamination croisée de l'index.*
 - d Pour éviter la contamination croisée de l'index, mettez au rebut les bouchons orange d'origine et utilisez des bouchons orange neufs. Retirez tous les tubes de primer d'index de la zone de travail.
- 8 Préparez la solution de travail PCR mélange maître PCR/polymérase PCR comme suit :
 - a Centrifugez brièvement le tube de polymérase PCR avant utilisation pour éliminer les bulles d'air.
 - b Ajoutez 5,6 µl de polymérase PCR aux 280 µl du mélange maître PCR.
 - c Retournez 20 fois la solution de travail PCR préparée pour la mélanger.
 Vous ajouterez cette solution de travail à la plaque **d'amplification** dans la section suivante. La solution de travail PCR est stable à température ambiante pendant dix minutes.



REMARQUE

Ajoutez toujours la polymérase PCR au mélange maître PCR juste avant l'utilisation. Ne stockez jamais la solution de travail PCR combinée.

Procédure

- 1 Lorsque la réaction d'extension-ligation de 45 minutes est terminée, retirez le **FPU** de l'incubateur. Retirez l'opercule en aluminium et remplacez par le couvercle de la plaque filtrante.
Le retrait de l'opercule d'aluminium avant la centrifugation est recommandée pour s'assurer que le surnageant de réaction s'écoulera correctement dans la plaque de déchets.
 - 2 Centrifugez la plaque **FPU** à $2\,400 \times g$ à 20 °C pendant 2 minutes.
 - 3 À l'aide d'une pipette multicanaux, ajoutez $25\ \mu\text{l}$ de NaOH de 0,05 N à chaque puits d'échantillon sur la plaque filtrante. Assurez-vous que les extrémités de la pipette sont en contact avec la membrane et pipettez la solution NaOH de haut en bas cinq à six fois. Les extrémités doivent être changées après chaque colonne.
 - 4 Recouvrez et incubez la plaque filtrante à température ambiante pendant 5 minutes.
 - 5 Pendant que la plaque filtrante est en incubation, utilisez une pipette multicanaux pour transférer $22\ \mu\text{l}$ de la solution de travail PCR à chaque puits de la plaque AMP contenant des primers d'index. Changez les extrémités entre les échantillons.
 - 6 Transférez les échantillons élués du filtre à la plaque AMP comme suit :
 - a Réglez une pipette multicanaux P20 à $20\ \mu\text{l}$.
 - b Pipettez les échantillons de la première colonne de la plaque filtrante de haut en bas cinq à six fois.
 - c Transférez $20\ \mu\text{l}$ de la plaque filtrante à la colonne correspondante de la plaque **AMP**.
 - d Pipettez doucement de haut en bas cinq à six fois pour combiner soigneusement l'ADN à la solution de travail PCR.
-
- #### REMARQUE
- Inclinez légèrement la plaque **FPU** pour assurer l'aspiration complète et éviter les bulles d'air.
- e Transférez les autres colonnes de la plaque filtrante à la plaque **AMP** en procédant de la même manière. *Les extrémités doivent être changées après chaque colonne pour éviter la contamination croisée des index et des échantillons.*
 - f Après le transfert de tous les échantillons, la plaque MIDI de collecte des déchets du **FPU** peut être mise au rebut. Le collier d'adaptateur métallique doit être nettoyé et mis de côté pour une utilisation future.
- 7 Recouvrez la plaque **AMP** d'un joint de plaque approprié et sécurisez avec un rouleau en caoutchouc.
- 8 Centrifugez à $1\,000 \times g$ à 20 °C pendant 1 minute.
- 9 Transférez la plaque **AMP** vers la zone de post-amplification.

- 10 Réalisez la PCR en utilisant le programme suivant sur un thermocycleur :
- 95 °C pendant 3 minutes
 - 25 cycles de :
 - 95 °C pendant 30 secondes
 - 62 °C pendant 30 secondes
 - 72 °C pendant 60 secondes
 - 72 °C pendant 5 minutes
 - Maintenez à 10 °C

**POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ**

Si vous ne procédez pas immédiatement au nettoyage PCR, la plaque **AMP** peut rester sur le thermocycleur durant la nuit ou peut être stockée entre 2 °C et 8 °C jusqu'à 48 heures.

Nettoyage PCR

Ce procédé utilise des billes de nettoyage PCR pour purifier les produits PCR des autres composants de réaction.

Durée estimée

- ▶ Durée totale : 50 minutes
- ▶ Durée de manipulation : 20 minutes

Consommables

Élément	Quantité	Stockage	Fourni par
Tampon d'élu­tion	1 tube	de 15 à 30 °C	Illumina
Billes de nettoyage PCR	400 µl pour 8 échantillons	de 2 à 8 °C	Illumina
Nouvelle préparation d'éthanol à 80 %	5 ml pour 8 échantillons	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Plaques MIDI à 96 puits	2	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Joint de plaque adhésif	Au besoin	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Cuves	Au besoin	de 15 à 30 °C	Utilisateur

Préparation



REMARQUE

Veillez consulter la section **Précautions** au début du présent protocole concernant la manutention des billes magnétiques et le lavage avec de l'éthanol à 80 % au cours du nettoyage PCR.

- 1 Amenez les billes de nettoyage PCR à la température ambiante.
- 2 Préparez une nouvelle solution d'éthanol à 80 % à partir de l'éthanol absolu.



REMARQUE

Préparez toujours une nouvelle solution d'éthanol à 80 % pour les étapes de lavage. L'éthanol peut absorber l'eau contenue dans l'air, ce qui peut avoir une incidence sur les résultats.

Procédure

- 1 Centrifugez la plaque d'amplification à 1 000 × g à 20 °C pendant une minute pour recueillir la condensation.
- 2 Étiquetez la nouvelle plaque MIDI avec « **CLP_Plate_ID** » (Identifiant_Plaque_CLP) (CLP : plaque de nettoyage).
- 3 Retournez les Billes de nettoyage PCR dix fois. Agitez vigoureusement à l'aide d'un agitateur vortex, puis renversez dix fois encore.
- 4 Inspectez visuellement la solution pour vous assurer que les billes sont bien en suspension.

- 5 À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 45 µl de billes de nettoyage PCR dans chaque puits de la plaque **CLP**.
- 6 À l'aide d'une pipette multicanal réglée sur 60 µl, transférez la totalité du produit PCR de la plaque d'amplification à la plaque **CLP**. Changez les pointes entre les échantillons.
- 7 Scellez la plaque **CLP** avec un joint adhésif de plaque.
- 8 Secouez la plaque **CLP** dans un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant deux minutes.
- 9 Incubez à température ambiante (15 °C à 30 °C) sans secouer pendant dix minutes.
- 10 Placez la plaque sur un support magnétique pendant au moins deux minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
- 11 Avec la plaque **CLP** sur le support magnétique et une pipette multicanal réglée sur 100 µl, retirez soigneusement et jeter le surnageant. Changez les pointes entre les échantillons.



REMARQUE

Si des billes sont accidentellement aspirées dans les pointes, reversez les billes dans la plaque et laissez la plaque reposer sur l'aimant pendant deux minutes, puis vérifiez que le surnageant a été éliminé.

- 12 Avec la plaque **CLP** sur le support magnétique, lavez les billes avec de l'éthanol à 80 % fraîchement préparé comme suit :
 - a À l'aide d'une pipette, ajoutez 200 µl d'éthanol à 80 % fraîchement préparé dans chaque puits d'échantillon. Le changement de pointes n'est pas requis si vous faites preuve de précaution pour éviter la contamination croisée. Vous n'avez pas besoin de remettre les billes en suspension à ce moment.
 - b Placez la plaque sur le support magnétique pendant 30 secondes ou jusqu'à ce que le surnageant soit éliminé.
 - c Retirez le surnageant et mettez-le au rebut.
- 13 Avec la plaque **CLP** sur le support magnétique, effectuez un deuxième lavage à l'éthanol comme suit :
 - a À l'aide d'une pipette, ajoutez 200 µl d'éthanol à 80 % fraîchement préparé dans chaque puits d'échantillon.
 - b Incubez la plaque sur le support magnétique pendant 30 secondes ou jusqu'à ce que le surnageant paraisse éliminé.
 - c Retirez le surnageant et mettez-le au rebut.
- 14 Utilisez une pipette multicanal P20 réglée sur 20 µl pour retirer l'excès d'éthanol.
- 15 Retirez la plaque **CLP** du support magnétique et laissez les billes sécher à l'air libre pendant dix minutes.
- 16 À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 30 µl de tampon d'élution à chaque échantillon.
Le changement de pointes n'est pas requis si vous faites preuve de précaution pour éviter la contamination croisée.
- 17 Scellez la plaque avec un timbre adhésif pour plaques.

- 18 Secouez la plaque **CLP** dans un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant deux minutes.



REMARQUE

Assurez-vous que tous les échantillons sont complètement en suspension. S'il y a des échantillons dans lesquels les billes ne sont pas complètement en suspension, pipettez doucement de haut en bas pour les remettre en suspension et répétez les deux étapes précédentes.

- 19 Incubez à température ambiante (15 °C à 30 °C) pendant deux minutes.
- 20 Placez la plaque **CLP** sur un support magnétique pendant au moins deux minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
- 21 Étiquetez la nouvelle plaque MIDI avec « **LNP_Plate_ID** » (Identifiant_Plaque_LNP) (LNP : plaque de normalisation de librairie).
- 22 À l'aide d'une pipette multicanal P20 et des pointes fines, transférez soigneusement 20 µl du surnageant de la plaque **CLP** à la plaque **LNP**. Changez les pointes entre les échantillons pour éviter la contamination croisée.



REMARQUE

Si des billes sont accidentellement aspirées dans les pointes, reversez les billes dans la plaque et laissez la plaque reposer sur l'aimant pendant deux minutes, puis vérifiez que le surnageant a été éliminé.

- 23 [Facultatif] Transférez les 10 µl restants du surnageant de la plaque **CLP** à la nouvelle plaque et étiquetez la plaque avec un nom et une date d'analyse. Conservez cette plaque entre -25 °C et -15 °C jusqu'à la fin de l'analyse de séquençage et de l'analyse de données. Les produits PCR nettoyés peuvent être utilisés pour des efforts de dépannage en cas de pannes d'échantillon.
- 24 Si vous arrêtez à ce point, scellez la plaque **LNP** avec un timbre adhésif pour plaques, puis centrifugez à 1 000 × g à 20 °C pendant une minute pour vous assurer que tout le surnageant se trouve au fond du puits.



POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Après le nettoyage du PCR, la plaque est stable jusqu'à une durée maximale de 3 heures entre 2 °C et 8 °C.

Normalisation des librairies

Cette procédure normalise la quantité de chaque librairie pour assurer une représentation égale des librairies dans l'échantillon regroupé.

Durée estimée

- ▶ Durée totale : 1 heure 20 minutes
- ▶ Durée de manipulation : 30 minutes

Consommables

Élément	Quantité	Stockage	Fourni par
Diluant de normalisation de librairie	1 tube	de -25 à -15 °C	Illumina
Billes de librairie	1 tube	de 2 à 8 °C	Illumina
Lavage de normalisation de librairie	2 tubes	de 2 à 8 °C	Illumina
Tampon de stockage de librairie	1 tube	de 15 à 30 °C	Illumina
Nouvelle préparation de NaOH 0,1 N	2 ml pour 48 échantillons	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Plaque PCR à jupe 96 puits	1 plaque	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Tube conique de 15 ml	1 tube	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Joint de plaque adhésif	Au besoin	de 15 à 30 °C	Utilisateur



AVERTISSEMENT

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire adaptée à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html.

Préparation

- 1 Préparez une nouvelle solution de NaOH de 0,1 N en ajoutant 30 µl de NaOH de 10 N à 2 970 µl d'eau sans DNase ni RNase.
- 2 Retirez le diluant de normalisation de librairie du stockage entre -25 °C et -15 °C et amenez à la température ambiante. Utilisez un bain d'eau entre 20 et 25 °C, le cas échéant.



REMARQUE

Le diluant de normalisation de librairie pourrait former des précipités ou cristaux visibles. Avant toute utilisation, agitez vigoureusement, puis maintenez le tube devant une lumière et inspectez visuellement pour vous assurer que tous les précipités sont complètement dissouts.

- 3 Retirez les billes de librairie et le lavage de normalisation de librairie de leur lieu de stockage entre 2 °C et 8 °C et ramenez-les à température ambiante. Utilisez un bain d'eau entre 20 et 25 °C, le cas échéant.
- 4 Agitez les billes de librairie vigoureusement pendant une minute avec inversion intermittente jusqu'à ce que les billes soient en suspension et qu'aucun culot ne se trouve au fond du tube lorsque celui-ci est retourné.

Procédure

- 1 Ajoutez 394 µl de diluant de normalisation de librairie dans un nouveau tube de 1,5 ml.
- 2 Utilisez une pipette P1000 réglée à 1 000 µl pour remettre correctement en suspension les billes de librairie en pipettant de haut en bas dix fois.



REMARQUE

Il est extrêmement important de remettre complètement en suspension le culot de billes de la librairie au fond du tube. L'utilisation d'une pipette P1000 permet de s'assurer que les billes sont en suspension de manière homogène et qu'il n'y a aucune masse de billes au fond du tube. Cette étape est essentielle pour obtenir une densité uniforme des amplifiats sur la Flow Cell.

- 3 Pipettez 72 µl de billes de librairie dans le tube qui contient le diluant de normalisation de librairie. Mélangez correctement en retournant le tube 15 à 20 fois.



REMARQUE

Une pipette P1000 réglée à 1 000 µl est requise pour remettre complètement les billes en suspension à l'étape 2. Mélangez uniquement les quantités requises de diluant de normalisation de librairie et de billes de librairie pour le test actuel. Vous devez entreposer séparément le reste du diluant de normalisation de librairie et les billes de librairie à leurs températures respectives recommandées. Afin de préserver la stabilité, les billes de librairie ne devraient jamais être congelées ni mélangées avec le diluant de normalisation de librairie si ce n'est pas pour un usage immédiat.

- 4 À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 45 µl de la solution combinée de diluant de normalisation de librairie et de billes de librairie dans chacun des puits de la plaque LNP qui contient les librairies. Il n'est pas nécessaire de changer les pointes entre les colonnes si vous prenez soin d'éviter la contamination croisée.
- 5 Scellez la plaque LNP avec un joint adhésif de plaque.
- 6 Secouez la plaque LNP sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 30 minutes.



REMARQUE

Cette incubation de 30 minutes est cruciale pour la normalisation appropriée de la librairie. Les incubations supérieures ou inférieures à 30 minutes peuvent affecter la représentation de la librairie et la densité des amplifiats.



REMARQUE

Si vous comptez procéder au séquençage le jour même, c'est un bon moment pour commencer la décongélation de la cartouche de réactifs. Suivez les instructions de décongélation de la cartouche de réactifs MiSeqDx qui se trouvent à la section *Préparation de la cartouche de réactifs*, page 46.

- 7 Placez la plaque sur un support magnétique pendant au moins deux minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
- 8 Avec la plaque LNP sur le support magnétique et une pipette multicanal réglée sur 80 µl, retirez soigneusement le surnageant et mettez-le au rebut dans un conteneur à déchets dangereux approprié.



REMARQUE

Si une bille est aspirée par inadvertance dans les pointes, versez-la sur la plaque et laissez-la au repos pendant deux minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.

- 9 Retirez la plaque **LNP** du support magnétique et lavez les billes avec le lavage de normalisation de librairie comme suit :
 - a À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 45 µl de lavage de normalisation de librairie à chaque puits d'échantillon.
Il n'est pas nécessaire de changer les pointes entre les colonnes si vous prenez soin d'éviter la contamination croisée.
 - b Scellez la plaque **LNP** avec un joint adhésif de plaque.
 - c Secouez la plaque **LNP** sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 5 minutes.
 - d Placez la plaque sur le support magnétique pendant au moins 2 minutes ou jusqu'à ce que le surnageant soit évacué.
 - e Retirez le surnageant avec précaution et mettez-le au rebut dans un conteneur à déchets dangereux approprié.
- 10 Retirez la plaque **LNP** du support magnétique et répétez le lavage avec le lavage de normalisation de librairie comme suit :
 - a À l'aide d'une pipette multicanal, ajoutez 45 µl de lavage de normalisation de librairie à chaque puits.
Il n'est pas nécessaire de changer les pointes entre les colonnes si vous prenez soin d'éviter la contamination croisée.
 - b Scellez la plaque **LNP** avec un joint adhésif de plaque.
 - c Secouez la plaque **LNP** dans un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant cinq minutes.
 - d Placez la plaque sur le support magnétique pendant au moins deux minutes.
 - e Retirez le surnageant avec précaution et mettez-le au rebut dans un conteneur à déchets dangereux approprié.
- 11 Utilisez une pipette multicanal P20 réglée sur 20 µl pour retirer l'excès de lavage de normalisation de librairie.
- 12 Retirez la plaque **LNP** du support magnétique et ajoutez 30 µl de la solution 0,1 N NaOH à chaque puits pour éluer l'échantillon.
- 13 Scellez la plaque **LNP** avec un joint adhésif de plaque.
- 14 Secouez la plaque **LNP** sur un agitateur pour microplaques à 1 800 tr/min pendant 5 minutes.
- 15 Pendant l'élution de 5 minutes, inscrivez « **SGP_Plate_ID** » (identifiant de la plaque de stockage) sur l'étiquette d'une nouvelle plaque PCR à 96 puits.
- 16 Ajoutez 30 µl de tampon de stockage de librairie dans chaque puits qui sera utilisé dans la plaque **SGP**.
- 17 Après l'élution de cinq minutes, assurez-vous que tous les échantillons de la plaque **LNP** sont complètement en suspension. Si les échantillons ne sont pas complètement en suspension, pipettez doucement ces échantillons de haut en bas ou tapotez doucement la plaque sur la paillasse pour remettre les billes en suspension, puis secouez-la pendant encore cinq minutes.
- 18 Placez la plaque **LNP** sur le support magnétique pendant au moins deux minutes.

- 19 À l'aide d'une pipette multicanal réglée sur 30 µl, transférez le surnageant de la plaque **LNP** à la plaque **SGP**. Pipettez de haut en bas cinq fois pour mélanger.



REMARQUE

Si des billes sont accidentellement aspirées dans les pointes, reversez les billes dans la plaque et laissez la plaque reposer sur l'aimant pendant 2 minutes, puis vérifiez que le surnageant a été éliminé.

- 20 Scellez la plaque **SGP** avec un joint adhésif de plaque, puis centrifugez à 1 000 g à 20 °C pendant 1 minute.



POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous ne procédez pas immédiatement au groupement des librairies ni au séquençage ultérieur sur l'instrument MiSeqDx, stockez la plaque **SGP** à une température comprise entre -25 et -15 °C pendant trois jours au maximum.

Regroupement de librairies

En préparation de la génération d'amplifiats et du séquençage, des volumes égaux de librairie normalisée sont associés, dilués dans du tampon d'hybridation et dénaturés à la chaleur avant le séquençage sur le MiSeqDx. Le contrôle interne PhiX est utilisé pour le séquençage.

Durée estimée

- ▶ Durée totale : 10 minutes
- ▶ Durée de manipulation : 10 minutes

Consommables

Élément	Quantité	Stockage	Fourni par
Tampon de dilution de librairie	1 tube	de -25 à -15 °C	Illumina
Contrôle interne PhiX 10 nmol	2 µl	de -25 à -15 °C	Illumina
Nouvelle préparation de NaOH 0,1 N	1 ml	de 15 à 30 °C	Utilisateur
1X tampon TE	8 µl	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Tubes Eppendorf (bouchon à vis recommandé)	2 tubes	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Barrette de huit tubes PCR	1	de 15 à 30 °C	Utilisateur
Seau à glace de 2,5 l	1	de 15 à 30 °C	Utilisateur

Préparation du regroupement de librairies

- 1 Réglez sur 96 °C un bloc chauffant adapté aux tubes de centrifugeuse de 1,5 ml.
- 2 Dans un seau à glace, préparez un bain d'eau glacée. Faites refroidir le tampon de dilution de librairie dans le bain d'eau glacée.
- 3 Commencez à décongeler la cartouche de réactifs de l'instrument MiSeqDx.

Préparation de la cartouche de réactifs

Suivez les instructions ci-dessous pour décongeler la cartouche de réactifs à l'aide d'un récipient d'eau à température ambiante. Cette méthode prend environ une heure.

- 1 Retirez la cartouche de réactifs de son lieu de stockage maintenu entre -25 °C et -15 °C.
- 2 Placez la cartouche de réactifs dans un récipient contenant suffisamment d'eau de laboratoire à température ambiante pour immerger la base de la cartouche de réactifs jusqu'à la ligne de délimitation de l'eau imprimée sur la cartouche de réactifs. Le niveau de l'eau ne doit pas dépasser la ligne de délimitation maximale.

Figure 7 Ligne de délimitation maximale de l'eau



- 3 Laissez la cartouche décongeler dans le bain d'eau à température ambiante pendant environ une heure ou jusqu'à décongélation complète.
- 4 Retirez la cartouche du bain d'eau et tapotez-la doucement contre la paille pour retirer l'eau de la base de la cartouche. Séchez la base de la cartouche. Assurez-vous que l'eau n'a pas éclaboussé la partie supérieure de la cartouche de réactifs.

Inspection de la cartouche de réactifs

- 1 Renversez la cartouche de réactifs dix fois pour mélanger les réactifs décongelés, puis vérifiez que toutes les positions sont décongelées.



REMARQUE

Il est essentiel que les réactifs contenus dans la cartouche soient parfaitement décongelés et mélangés afin de garantir un séquençage correct.

- 2 Vérifiez les réactifs des positions 1, 2 et 4 pour vous assurer qu'ils sont complètement mélangés et qu'ils ne contiennent pas de précipités.
- 3 Tapotez doucement la cartouche sur la paille pour éliminer les bulles d'air dans les réactifs.



REMARQUE

Comme les tubes des dispositifs d'aspiration MiSeqDx descendent au fond de chaque réservoir pour aspirer les réactifs, il est important qu'il ne reste aucune bulle d'air dans les réservoirs.

- 4 Placez la cartouche de réactifs sur la glace ou réservez-la à une température comprise entre 2 °C et 8 °C (pendant un maximum de six heures) jusqu'à ce que vous soyez prêt à configurer l'analyse. Pour obtenir de meilleurs résultats, chargez directement l'échantillon et configurez l'analyse.

Dénaturation et dilution du contrôle interne PhiX

- 1 Préparez la solution de NaOH 0,1 N en combinant les volumes suivants dans un tube conique :
 - Eau sans RNase/DNase (2 475 µl)
 - Stock de NaOH 10 N (25 µl)
- 2 Retournez le tube plusieurs fois pour mélanger.



ATTENTION

L'utilisation de NaOH fraîchement dilué est essentielle pour dénaturer complètement les échantillons pour la génération d'amplifiats sur le système MiSeqDx.



REMARQUE

Si le contrôle PhiX est préparé le même jour que la normalisation de librairie, vous pouvez utiliser le même stock de NaOH 0,1 N.

- 3 Combinez les volumes suivants pour diluer la bibliothèque de contrôle interne PhiX de 2 nmol :
 - Bibliothèque de contrôle interne PhiX 10 nmol (2 µl)
 - Tampon 1X TE (8 µl)
- 4 Combinez les volumes suivants pour obtenir une bibliothèque de contrôle interne PhiX 1 nmol :
 - Bibliothèque de contrôle interne PhiX 2 nmol (10 µl)
 - NaOH 0,1 N (10 µl)
- 5 Agitez brièvement la solution de la bibliothèque de contrôle interne PhiX de 1 nmol.
- 6 Centrifugez le contrôle interne PhiX de 1 nmol à 280 x g à 20 °C pendant une minute.
- 7 Incubez pendant 5 minutes à température ambiante pour dénaturer la solution de la bibliothèque de contrôle interne PhiX en brins uniques.
- 8 Combinez les volumes suivants dans un nouveau microtube à centrifuger afin d'obtenir une bibliothèque de contrôle interne PhiX de 20 pmol :
 - Bibliothèque de contrôle interne PhiX dénaturée (2 µl)
 - Tampon de dilution de bibliothèque préalablement réfrigéré (98 µl)



REMARQUE

La bibliothèque de contrôle interne PhiX de 20 pM dénaturée peut être stockée jusqu'à trois semaines entre -25 °C et -15 °C comme des parties aliquotées à usage unique. Après trois semaines, le nombre d'amplifiats tend à diminuer.

Préparation des échantillons pour le séquençage

- 1 Amenez le tampon de dilution de bibliothèque à la température ambiante. Agitez le tampon de dilution de bibliothèque et veillez à ce que tous les précipités soient complètement dissouts.
 - 2 Si la plaque **SGP** a été conservée congelée, décongelez la plaque **SGP** à la température ambiante.
 - 3 Centrifugez la plaque **SGP** à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute pour recueillir la condensation.
 - 4 Étiquetez un nouveau tube de type Eppendorf avec « **PAL_Plate_ID** » (bibliothèques d'amplicons regroupés).
 - 5 Si la plaque **SGP** a été conservée congelée, à l'aide d'une pipette multicanal P200 réglée à 40 µl, mélangez chaque bibliothèque à séquencer en pipettant de haut en bas trois à cinq fois. Changez les pointes entre les échantillons.
 - 6 Transférez 5 µl de chaque bibliothèque à séquencer de la plaque **SGP** à la barrette de huit tubes PCR. Scellez la plaque **SGP** avec un joint adhésif de plaque et réservez.
-
- REMARQUE
- Après utilisation, conservez la plaque **SGP** scellée à une température entre -25 °C et -15 °C. La plaque **SGP** scellée est stable pendant un maximum de trois jours.
- 7 Combinez et transférez le contenu de la barrette de huit tubes PCR dans le tube **PAL**. Mélangez complètement le tube **PAL** à l'aide d'un agitateur vortex.
 - 8 Étiquetez un nouveau tube de type Eppendorf avec « **DAL_Plate_ID** » (bibliothèque d'amplicons dilués).
 - 9 Ajoutez 585 µl de tampon de dilution de bibliothèque au tube **DAL**.

- 10 Ajoutez 6 µl de contrôle interne PhiX 20 pM au tube **DAL**. À l'aide de la même pointe, pipettez de haut en bas trois à cinq fois pour rincer la pointe et effectuer un transfert complet.
- 11 Transférez 9 µl de **PAL** dans le tube **DAL** qui contient le tampon de dilution de librairie. À l'aide de la même pointe, pipettez de haut en bas trois à cinq fois pour rincer la pointe et effectuer un transfert complet.
- 12 Mélangez le tube **DAL** sous agitateur vortex à vitesse maximale.



REMARQUE

Si vous souhaitez garder le **PAL** restant pour une utilisation ultérieure, conservez le tube **PAL** à une température de -25 °C à -15 °C. Un **PAL** conservé est bon pendant trois jours.

- 13 Centrifugez le tube **DAL** à 1 000 x g à 20 °C pendant une minute pour recueillir le contenu.
- 14 À l'aide d'un bloc chauffant, incubez le tube **DAL** à 96 °C pendant deux minutes.
- 15 Après l'incubation, retournez le tube **DAL** une ou deux fois pour le mélanger, puis placez-le immédiatement dans un bain d'eau glacée.
- 16 Gardez le tube **DAL** dans le bain d'eau glacée pendant cinq minutes.



REMARQUE

Vous devez effectuer l'étape de la dénaturation par chaleur immédiatement avant de charger le tube **DAL** dans la cartouche de réactifs MiSeqDx pour veiller à ce que le modèle soit chargé efficacement dans la Flow Cell MiSeqDx.

Prochaines étapes

Une fois la librairie d'amplicons regroupée avec le PhiX dilué et dénaturé, les librairies sont prêtes à être chargées sur la cartouche MiSeqDx : test de séquençage clinique de la fibrose kystique dans le réservoir désigné étiqueté **Load Samples** (Charger les échantillons). L'analyse de séquençage est ensuite configurée au moyen de l'interface du logiciel d'exploitation de MiSeq (MOS). Consultez le Guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour votre configuration. Consultez la section *Guides d'instruments et de logiciels*, page 20.

[Cette page a été volontairement laissée vide.]

Assistance technique

Pour obtenir une assistance technique, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.

Tableau 11 Coordonnées générales d'Illumina

Site Web	www.illumina.com
Courriel	techsupport@illumina.com

Tableau 12 Numéros de téléphone de l'assistance clientèle d'Illumina

Région	Numéro de la personne-ressource	Région	Numéro de la personne-ressource
Amérique du Nord	1 800 809 4566	Irlande	1 800 812 949
Allemagne	0 800 180 8994	Italie	800 874 909
Australie	1 800 775 688	Norvège	800 16836
Autriche	0 800 296575	Nouvelle-Zélande	0 800 451 650
Belgique	0 800 811 02	Pays-Bas	0 800 022 3859
Danemark	8088 2346	Royaume-Uni	0 800 917 0041
Espagne	900 812168	Suède	020 790 181
Finlande	0 800 918 363	Suisse	0 800 563 118
France	0 800 911850	Autres pays	+44 1799 534 000

Fiches signalétiques

Les fiches signalétiques sont disponibles sur le site Web d'Illumina à l'adresse support.illumina.com/sds.html.

Documentation produit

De la documentation sur les produits est disponible en format PDF sur le site Web d'Illumina. Accédez au site support.illumina.com, sélectionnez un produit, puis cliquez sur **Documentation & Literature** (Documentation et littérature).



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, CA 92122 États-Unis
+(1) 800 809-ILMN (4566)
+(1) 858 202-4566 (en dehors de
l'Amérique du Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.
Freddy van Riemsdijkweg 15
5657 EE Eindhoven
Pays-Bas

Commanditaire australien :
Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Australie