

Formulario de seguimiento de laboratorio de TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO
SOLO PARA EXPORTACIÓN

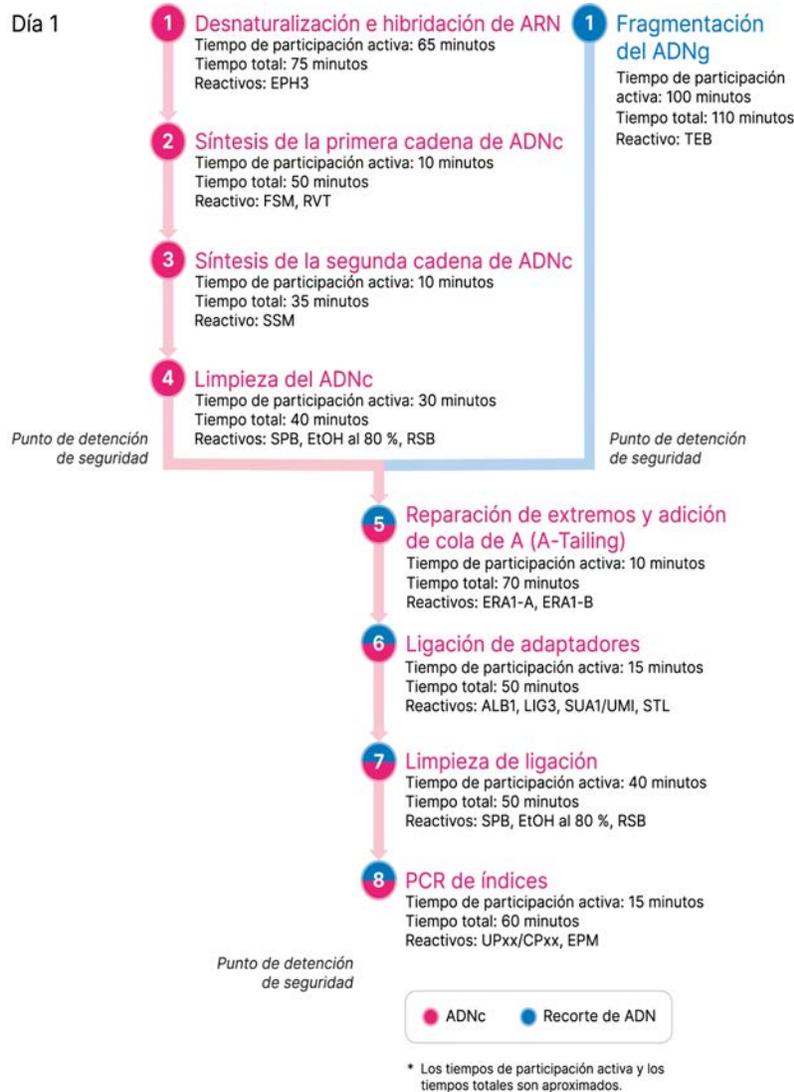
Instrucciones de uso

En la **Figura 1** y la **Figura 2** se muestra un resumen del flujo de trabajo de TruSight Oncology Comprehensive (TSO Comprehensive).

Antes de iniciar el protocolo, consulte las advertencias y precauciones en *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive (EU))* (n.º de documento 200007789).

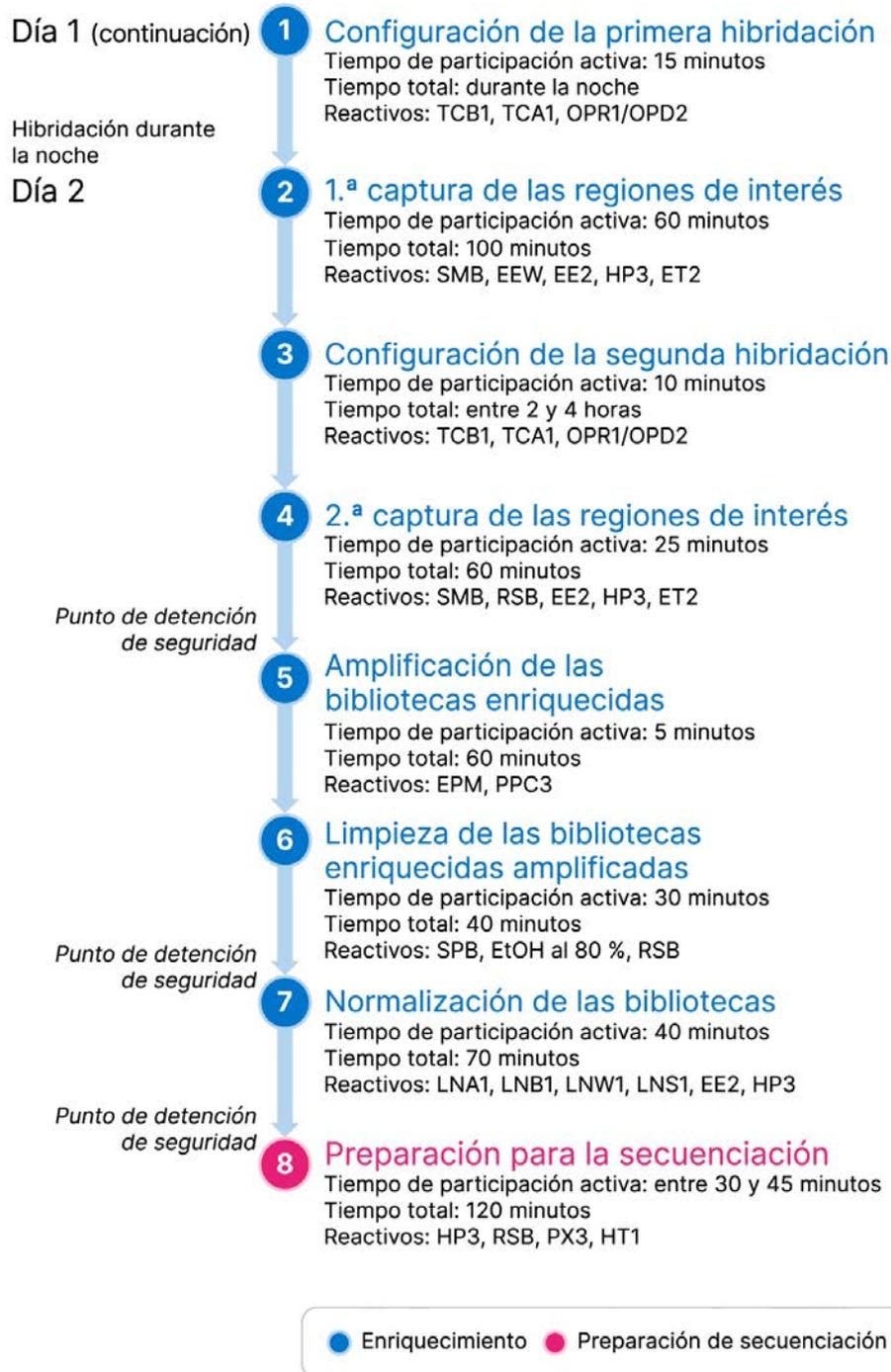
Flujo de trabajo de preparación de librerías

Figura 1 Flujo de trabajo de TSO Comprehensive (Parte 1)



Flujo de trabajo del enriquecimiento

Figura 2 Flujo de trabajo de TSO Comprehensive (Parte 2)



Programación de los termocicladores

- 1 Antes de iniciar el ensayo, guarde los siguientes programas en termocicladores de preamplificación y posamplificación.

Tabla 1 Programas del termociclador de preamplificación

Paso del procedimiento	Nombre del programa	Temperatura de la tapa	Volumen de la reacción	Parámetros del termociclador
Desnaturalización e hibridación de ARN	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C durante 5 minutos • 4 °C durante 1 minuto • 4 °C constantes
Síntesis de la primera cadena del ADNc	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25 °C durante 10 minutos • 42 °C durante 15 minutos • 70 °C durante 15 minutos • 4 °C durante 1 minuto • 4 °C constantes
Síntesis de la segunda cadena del ADNc	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16 °C durante 25 minutos • 4 °C durante 1 minuto • 4 °C constantes

Si la temperatura de la tapa para 2ndSS no puede ajustarse a 30 °C, apague la opción de calentamiento de tapa precalentada.

Tabla 2 Programas del termociclador de posamplificación

Paso del procedimiento	Nombre del programa	Temperatura de la tapa	Volumen de la reacción	Parámetros del termociclador
PCR de índices	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C durante 30 segundos • 15 ciclos de: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C durante 10 segundos • 60 °C durante 30 segundos. • 72 °C durante 30 segundos • 72 °C durante 5 minutos • 10 °C constantes
Realización de la primera hibridación	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C durante 10 minutos • 85 °C durante 2 min y 30 segundos • 75 °C durante 2 min y 30 segundos • 65 °C durante 2 min y 30 segundos • 57 °C constantes de 8 a 24 horas
Realización de la segunda hibridación	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C durante 10 minutos • 85 °C durante 2 min y 30 segundos • 75 °C durante 2 min y 30 segundos • 65 °C durante 2 min y 30 segundos • 57 °C constantes de 1,5 a 4 horas
Amplificación de las librerías enriquecidas	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C durante 30 s • 18 ciclos de: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C durante 10 s • 60 °C durante 30 s. • 72 °C durante 30 s • 72 °C durante 5 min • 10 °C constantes

Introducción de la información sobre el experimento

Local Run Manager es el software utilizado en el instrumento NextSeq 550Dx para configurar un experimento de TSO Comprehensive. Para obtener más información, consulte la *Guía de flujo de trabajo de Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (n.º de documento 200008661)*.

Introduzca la información de configuración del experimento y la muestra directamente en el módulo de análisis de TruSight Oncology Comprehensive.

Ajuste de los parámetros del experimento

- 1 Inicie sesión en Local Run Manager en el instrumento o en un ordenador conectado a la red.
- 2 Seleccione **Create Run** (Crear experimento) y, a continuación, seleccione **TSO Comp (EU)**.
- 3 Introduzca un nombre para el experimento que cumpla los siguientes criterios, de forma que se pueda identificar desde la secuenciación hasta el análisis.
 - ▶ Debe contener de 1 a 40 caracteres.
 - ▶ Solo se permiten caracteres alfanuméricos, guiones o rayas.
 - ▶ Los guiones y las rayas deben ir entre caracteres alfanuméricos.
 - ▶ Debe ser único para todos los experimentos en el instrumento.
- 4 **(Opcional)** Escriba una descripción del experimento que cumpla los siguientes criterios para ayudar a identificar el experimento.
 - ▶ Debe contener de 1 a 150 caracteres.
 - ▶ Solo se permiten caracteres alfanuméricos o espacios.
 - ▶ Los espacios deben ir entre caracteres alfanuméricos.

Definición de las muestras para el experimento

Defina las muestras que se usarán en el experimento por medio de una de las opciones que se proponen a continuación:

- ▶ **Introducir las muestras de forma manual:** use la tabla en blanco que aparece en la pantalla Create Run (Crear experimento).
- ▶ **Importar muestras:** vaya a un archivo externo que tenga un formato de valores separados por comas (*.csv). En la pantalla Create Run (Crear experimento), se ofrece una plantilla que se puede descargar.



PRECAUCIÓN

Las discrepancias entre las muestras y los cebadores de índice generan informes con resultados incorrectos debido a que no se identifican las muestras positivas. Introduzca los ID de las muestras y asigne los índices en Local Run Manager antes de empezar a preparar las librerías. Haga un registro de los ID de las muestras, de la indexación y de la orientación del pocillo de la placa para poder consultar esta información durante la preparación de librerías.



PRECAUCIÓN

Para evitar que se produzcan pérdidas de datos, asegúrese de que la instalación de KB no esté en curso antes de guardar un experimento.

Introducción de las muestras de forma manual

- 1 Introduzca un ID de muestra único en el campo Sample ID (ID de muestra) que cumpla los siguientes criterios. **En primer lugar, se deben añadir todas las muestras control.** Consulte [Muestras control en la página 7](#) para obtener más información.
 - ▶ Debe contener de 1 a 25 caracteres.
 - ▶ Solo se permiten caracteres alfanuméricos, guiones o rayas.
 - ▶ Los guiones y las rayas deben ir entre caracteres alfanuméricos.

- 2 **(Opcional)** Introduzca una descripción de la muestra que cumpla los siguientes criterios en el campo Sample Description (Descripción de la muestra).
 - ▶ Debe contener de 1 a 50 caracteres.
 - ▶ Solo se permiten caracteres alfanuméricos, rayas, guiones o espacios.
 - ▶ Los espacios, los guiones y las rayas deben ir entre caracteres alfanuméricos.
- 3 Seleccione un índice para la librería de ADN y/o la librería de ARN preparada a partir de la muestra. Asegúrese de que las muestras de ARN y ADN están en columnas separadas. El campo DNA i7+i5 Sequence (Secuencia i7+i5 de ADN) se rellena automáticamente después de seleccionar un ID de índice de ADN. El campo RNA i7+i5 Sequence (Secuencia i7+i5 de ARN) se rellena automáticamente después de seleccionar un ID de índice de ARN. Además de este resumen, consulte *TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive)* (n.º de documento 200007789) para obtener información sobre la selección de ID de índices.
 - ▶ Para una librería de muestras de ADN, seleccione un ID de índice único (índices UPxx o CPxx) de la lista desplegable de ID de índices de ADN.
 - ▶ Para una librería de muestras de ARN, seleccione un ID de índice único (solo UPxx) de la lista desplegable de ID de índices de ARN.
 - ▶ Si hay un total de tres librerías en el experimento, siga las instrucciones de selección de índice que se encuentran en *TruSight Oncology Comprehensive Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive)* (n.º de documento 200007789).
- 4 Use el campo Tumor Type (Tipo de tumor) para asignar un tipo de tumor a cada muestra, mediante la selección del tipo de tumor más específico disponible. Consulte [Selección de un tipo de tumor en la página 7](#).
- 5 Use el campo Tumor Type (Tipo de tumor) para asignar uno de los siguientes tipos de control a cada control. Consulte [Muestras control en la página 7](#).
 - DNA External Control (Control externo de ADN)
 - RNA External Control (Control externo de ARN)
 - DNA No-Template Control (Control negativo de ADN)
 - RNA No-Template Control (Control negativo de ARN)

Si utiliza el consumible Prefix DNA Control, el tipo de control es DNA External Control (Control externo de ADN). Si utiliza el consumible Prefix RNA Control, el tipo de control es RNA External Control (Control externo de ARN).
- 6 Asigne un sexo.
- 7 **[Opcional]** Seleccione **Export to CSV** (Exportar a CSV) para exportar la información de la muestra a un archivo externo.
- 8 Revise la información en la pantalla Create Run (Crear experimento). Si la información no es la adecuada, los resultados se pueden ver afectados.
- 9 Seleccione **Save Run** (Guardar experimento).

Importación de las muestras

- 1 Seleccione **Import CSV** (Importar CSV) y busque la ubicación del archivo que contiene la información de la muestra. Se pueden importar dos tipos de archivo.
 - Seleccione **Download CSV** (Descargar CSV) en la pantalla Create Run (Crear experimento) para descargar una nueva plantilla de información de la muestra. El archivo CSV contiene los títulos y el formato de columna necesarios para la importación. Introduzca en cada columna la información relativa a las muestras del experimento. Para la columna Tumor Type (Tipo de tumor), introduzca el término del tipo de tumor o el código asociado (consulte [Descarga de tipos de tumor en la página 1](#)). El campo Tumor Type (Tipo de tumor) también se usa para designar muestras como controles (consulte [Muestras control en la página 7](#)).
 - Utilice un archivo o una información de muestra exportada del módulo de análisis de TruSight Oncology Comprehensive mediante la función Export to CSV (Exportar a CSV).
- 2 En la pantalla Create Run (Crear experimento), revise la información importada. Si la información no es la adecuada, los resultados se pueden ver afectados.

- 3 **[Opcional]** Seleccione **Export to CSV** (Exportar a CSV) para exportar la información de la muestra a un archivo externo.
- 4 Seleccione **Save Run** (Guardar experimento).

Muestras control

TSO Comprehensive requiere el uso de Panel Control. Al designar una muestra como control, se cambia automáticamente el sexo de la muestra a Unknown (Desconocido). Para designar una muestra como control, seleccione uno de los cuatro tipos de control del campo Tumor Type (Tipo de tumor): DNA External Control (Control externo de ADN) (Control positivo de ADN), DNA No-Template Control (Control negativo de ADN), RNA External Control (Control externo de ARN) (Control positivo de ARN) o RNA No-Template Control (Control negativo de ARN). Consulte [Selección de un tipo de tumor en la página 7](#) para obtener más información sobre los ajustes de los tipos de tumores para todos los tipos de muestras durante la configuración del experimento.

Solo puede especificarse un tipo de control para cada experimento. Solo puede especificarse una librería de ADN para un DNA External Control (Control externo de ADN) o un DNA No-Template Control (Control negativo de ADN). Solo puede especificarse una librería de ARN para un RNA External Control (Control externo de ARN) o un RNA No-Template Control (Control negativo de ARN). Las librerías designadas como DNA No-Template Control (Control negativo de ADN) o RNA No-Template Control (Control negativo de ARN) no se descuentan del número máximo de librerías en un experimento.

Selección de un tipo de tumor

Es preciso especificar un tipo de tumor para cada muestra. Salvo por los tipos de control, los tipos de tumor disponibles proceden de la Knowledge Base (KB) (Base de conocimiento) instalada y pueden cambiar con las versiones actualizadas de la KB.

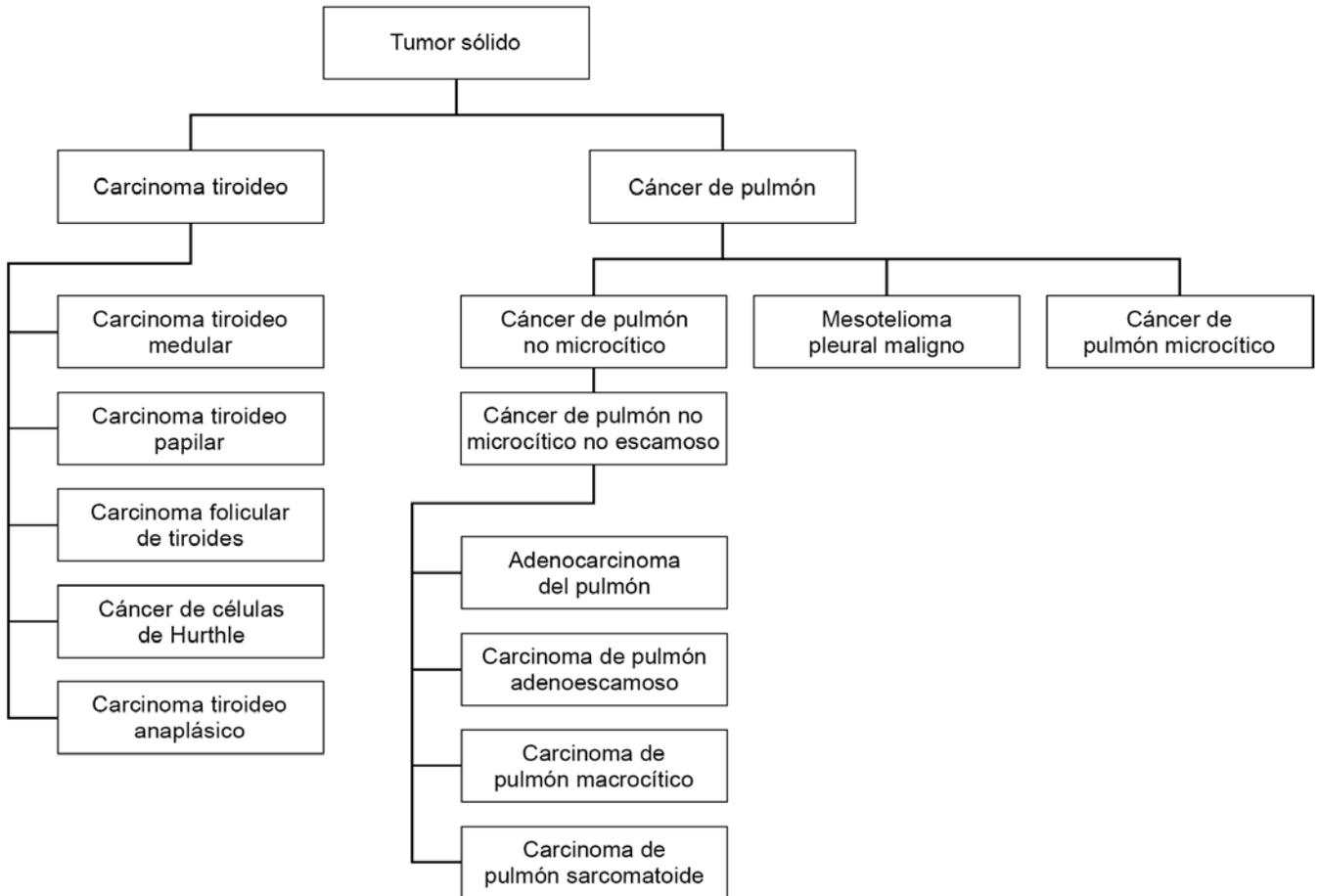


PRECAUCIÓN

Seleccionar un tipo de tumor incorrecto puede generar resultados incorrectos. Para evitar que se produzcan fallos durante el análisis, trate de encontrar una solución para los avisos que aparecen a la hora de especificar los tipos de tumor.

Los términos de los tipos de tumores forman parte de una ontología con una clasificación jerárquica de enfermedades en la KB que se construye como un conjunto de relaciones principal-secundario. Por ejemplo, el término "cáncer de pulmón no microcítico" es un término secundario de "cáncer de pulmón", puesto que el cáncer de pulmón no microcítico es un tipo de cáncer de pulmón. La [Figura 3](#) representa un subconjunto de un ejemplo de ontología de la enfermedad, mostrando el tumor sólido como término raíz y los términos asociados al cáncer de pulmón y el cáncer de tiroides (no se muestran otros tipos de tumores). Un término conectado mediante relaciones principal-secundario con términos de un nivel inferior se denomina antecesor. Los términos conectados a un nivel inferior son descendientes del término antecesor. Por ejemplo, el cáncer de pulmón es un antecesor del adenocarcinoma de pulmón y el cáncer de pulmón microcítico y el carcinoma tiroideo medular es un descendiente tanto del carcinoma tiroideo como del tumor sólido.

Figura 3 Subconjunto de una ontología de la enfermedad ilustrativa



El tipo de tumor seleccionado para una muestra de un paciente afecta:

- ▶ A qué usos previstos para pruebas diagnósticas de acompañamiento se evalúan en la muestra. Solo se evaluarán las muestras de pacientes con un tipo de tumor que sea una coincidencia exacta o un descendiente del tipo de tumor para el uso previsto de una prueba diagnóstica de acompañamiento para esa especificación.
- ▶ A qué variantes del perfil tumoral se incluyen en el informe de TSO Comprehensive.

En las siguientes instrucciones se describe el proceso para seleccionar un tipo de tumor mediante la pantalla Create Run (Crear experimento). El tipo de tumor también se puede ajustar importando un archivo CSV que contenga un tipo de tumor (consulte [Importación de las muestras en la página 6](#)).

- 1 Visualice los tipos de tumor disponibles; para ello, haga doble clic en la celda Tumor Type (Tipo de tumor) en la fila de la muestra. Los tipos de tumor disponibles se muestran en una lista jerárquica organizada por orden alfabético.
El campo Tumor Type (Tipo de tumor) también se utiliza para designar un tipo de control para las muestras de control (consulte [Muestras control en la página 7](#)).
- 2 Ubique y seleccione el tipo de tumor; para ello, haga una búsqueda en la lista o use la barra de búsqueda de la parte superior de la ventana Tumor Type (Tipo de tumor).

Preparación de los pasos del protocolo

- 1 Descontamine a fondo las áreas de trabajo con una solución de limpieza que inhiba la ARNasa/ADNasa.

**PRECAUCIÓN**

Todos los procedimientos del flujo de trabajo requieren un entorno sin ARNasa/ADNasa.

- 2 Ajuste los programas del termociclador de preamplificación. Consulte *Programación de los termocicladores en la página 4*.
- 3 Siga las instrucciones del fabricante para configurar el ultrasonicador.
- 4 Si únicamente va a procesar muestras de ADN, pase directamente a *Fragmentación del ADNg en la página 13*.
- 5 Retire los controles de ARN del almacenamiento.
- 6 Retire los tubos de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 3 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (n.º de referencia 20031127)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
EPH3	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Desnaturalización e hibridación de ARN
FSM	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Síntesis de la primera cadena del ADNc
RVT	Entre -25 °C y -15 °C	Mantenga en hielo.	Síntesis de la primera cadena del ADNc
SSM	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Síntesis de la segunda cadena del ADNc

Tabla 4 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (n.º de referencia 20031119)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
SPB (etiqueta verde claro)	Entre 2 °C y 8 °C	Déjelo a temperatura ambiente durante 30 minutos.	Limpieza del ADNc
RSB	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Limpieza del ADNc

Desnaturalización e hibridación de ARN

Preparación

- 1 Prepare los siguientes reactivos.
 - ▶ EPH3: aparte.
 - ▶ FSM: agite en vórtex para mezclar. Centrifugue brevemente y, a continuación, pipetee para mezclar. Inspeccione en busca de precipitados. Si los hay, pipetee para mezclar hasta que los precipitados se disuelvan.
 - ▶ RVT: centrifugue brevemente y, a continuación, pipetee para mezclar. Mantenga en hielo.

NOTA RVT es una solución viscosa. Pipetee siempre lentamente para evitar que se formen burbujas.

- 2 En un tubo de microcentrífuga, combine los siguientes volúmenes para preparar una mezcla maestra de FSM+RVT.

Tabla 5 Mezcla maestra de FSM+RVT

Componente de la mezcla maestra	3 muestras de ARN (µl)	8 muestras de ARN (µl)	16 muestras de ARN (µl)	24 muestras de ARN (µl)
FSM	27	72	144	216
RVT	3	8	16	24

En esta tabla se incluye el excedente de volumen. Consulte la sección Manipulación de reactivos en *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (n.º de documento 200007789)* para obtener información sobre los cálculos.

- 3 Pipetee diez veces para mezclar.
- 4 Ponga la mezcla maestra de FSM+RVT en hielo hasta la *Síntesis de la primera cadena del ADNc en la página 10*.

Procedimiento

- 1 Descongele las muestras de ARN extraídas y los controles de ARN en hielo.
Procese los controles de ARN como muestras para el resto del protocolo.
Consulte *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive (EU))* (n.º de documento 200007789) para cuantificar las muestras.
- 2 Pipetee cada muestra de ARN 10 veces para mezclar.
- 3 Use agua sin ARNasa/ADNasa para preparar 40 ng de cada muestra de ARN en un volumen final de 8,5 µl (4,7 ng/µl).
Para los controles de ARN, use la concentración proporcionada en la etiqueta del tubo.
- 4 Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como CF (Fragmentos de ADNc).
- 5 Añada 8,5 µl de cada muestra de ARN a un único pocillo de la placa de PCR de CF.
- 6 Asegúrese de que el diseño de la placa de muestras y los índices para cada muestra coinciden con el experimento planeado en Local Run Manager durante la configuración del experimento.
- 7 Agite en vórtex la EPH3 para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 8 Añada 8,5 µl de EPH3 en cada pocillo de muestra.
- 9 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de CF.



PRECAUCIÓN

Asegúrese de sellar los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.

- 10 Agite a 1200 rpm durante 1 minuto.
- 11 Centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
- 12 Colóquela en el termociclador y ejecute el programa LQ-RNA.
Consulte *Programación de los termocicladores en la página 4*.
- 13 Cuando las muestras alcancen los 4 °C, manténgalas un minuto y, a continuación, pase inmediatamente al siguiente paso.

Síntesis de la primera cadena del ADNc

Procedimiento

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Retire la placa de PCR de CF del termociclador.
- 2 Pipetee 5 veces para mezclar la mezcla maestra de FSM+RVT.
- 3 Añada 8 µl de mezcla maestra de FSM+RVT a cada pocillo de la muestra.
- 4 Pipetee para mezclar 5 veces.
- 5 Deseche la mezcla maestra de FSM+RVT restante.
- 6 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de CF.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
- 7 Agite a 1200 rpm durante 1 minuto.
- 8 Centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
- 9 Colóquela en un termociclador y ejecute el programa 1stSS.
Consulte *Programación de los termocicladores en la página 4*.
- 10 Cuando las muestras alcancen los 4 °C, pase inmediatamente al siguiente paso.
Las muestras de primera cadena pueden mantenerse a 4 °C durante un periodo máximo de 5 minutos.

Síntesis de la segunda cadena del ADNc

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Prepare el siguiente reactivo.
 - ▶ SSM: invierta 10 veces para mezclar. Centrifugue brevemente.

Procedimiento

- 1 Retire la placa de PCR de CF del termociclador.
- 2 Añada 25 µl de SSM a cada pocillo de muestra.
- 3 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de CF.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
- 4 Agite a 1200 rpm durante 1 minuto.
- 5 Centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
- 6 Colóquela en un termociclador y ejecute el programa 2ndSS.
Consulte *Programación de los termocicladores en la página 4*.
- 7 Cuando las muestras alcancen los 4 °C, manténgalas un minuto y, a continuación, pase inmediatamente al siguiente paso.

Limpieza del ADNc

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Prepare los siguientes reactivos.
 - ▶ SPB: asegúrese de que las bolas están a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 - ▶ RSB: apártelo para usarlo en el procedimiento.
- 2 Prepare EtOH al 80 % nuevo en un tubo cónico de 15 ml o 50 ml.

Reactivo	3 muestras	8 muestras	16 muestras	24 muestras
Alcohol de etanol al 100 % puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Agua sin ARNasa/ADNasa	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- 3 Agite en vórtex EtOH al 80 % nuevo para mezclar.
- 4 Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como BIND1 (Unión de ADNc).
- 5 Cúbrela y apártela.
- 6 Configure el imán.

Procedimiento

Unión

- 1 Retire la placa de PCR de CF del termociclador.
- 2 Agite en vórtex las SPB durante 1 minuto para volver a suspender las bolas.
- 3 Justo después, añada 90 µl de SPB a cada pocillo de muestra para la placa MIDI de BIND1.
Si se usa una cubeta para dispensar SPB, incluya un factor de excedente de 1,05 al alicuotar suficiente material por muestra. Deseche el material restante una vez que se haya añadido las SPB a cada pocillo de la muestra.
- 4 Transfiera el volumen íntegro (50 µl) de cada muestra de la placa de PCR de CF al pocillo correspondiente de la placa MIDI de BIND1.
- 5 Deseche la placa de PCR de CF vacía.
- 6 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BIND1.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 7 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- 8 Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 9 Coloque la placa MIDI de BIND1 en un soporte magnético durante 5 minutos.

- 10 Use una pipeta P200 ajustada en 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo de muestra sin alterar el pellet de bolas.

Lavado

- 1 Lave las bolas de la siguiente manera.
 - a Mantenga en el soporte magnético y añada 200 µl de EtOH al 80 % nuevo a cada pocillo.
 - b Espere 30 segundos.
 - c Retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo.
- 2 Lave las bolas una **segunda** vez.
- 3 Retire los residuos de EtOH de cada pocillo.
Use una pipeta P20 con puntas finas.
- 4 Deseche el EtOH al 80 % sin usar.

Elución

- 1 Retire la placa MIDI de BIND1 del soporte magnético.
- 2 Invierta el RSB o agítelo en vórtex para mezclar.
- 3 Añada 22 µl de RSB a cada pocillo de muestra.
- 4 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BIND1.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 5 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- 6 Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 7 Colóquela en un soporte magnético durante 2 minutos.
- 8 Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como PCF (Fragmentos de ADNc purificados).
Si se va a detener en el **PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD** en la página 12, use una placa de PCR.
- 9 Transfiera 20 µl de eluido de cada pocillo de muestra de la placa MIDI de BIND1 al pocillo correspondiente de la placa de PCF.
- 10 Deseche la placa MIDI de BIND1 vacía.
- 11 Añada 30 µl de RSB a cada pocillo de muestra de la placa de PCF.
- 12 Pipeta para mezclar 10 veces.
- 13 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCF y consérvela en hielo.
- 14 Vuelva a almacenar la EPH3, FSM, RVT y SSM.
- 15 Si está procesando muestras obtenidas únicamente de ARN (ADNc), y no se va a detener en el punto de detención de seguridad, pase a **Reparación de extremos y adición de cola de A (A-Tailing)** en la página 15.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si debe detener el procedimiento, centrifugue la placa de PCR de PCF a 280 × g durante 1 minuto y almacénela entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 7 días.

Fecha y hora de detención _____

Preparación de los pasos del protocolo

- 1 Retire los controles de ADN del almacenamiento.
- 2 Retire el tubo de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 6 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (n.º de referencia 20031119)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
TEB	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Fragmentación del ADNg

Fragmentación del ADNg

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Asegúrese de seguir las recomendaciones en *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive (EU))* (n.º de documento 200007789) para cuantificar las muestras.
- 2 Prepare el siguiente reactivo.
 - ▶ Invierta el TEB o agítelo en vórtex para mezclar.

Procedimiento

Preparación de la placa

- 1 Seleccione una de las siguientes tres opciones para preparar la placa.
 - ▶ **Opción n.º 1:** procese las muestras de ADNg de forma simultánea con las muestras de ADNc en la placa MIDI de PCF.
 - a Etiquete la placa MIDI de PCF como LP (Preparación de librerías).
 - b Colóquela en hielo y apártela para su uso en *Transferencia de ADN fragmentado en la página 14*.
 - ▶ **Opción n.º 2:** procese las muestras de ADNg de forma simultánea con las muestras de ADNc y la placa de PCR de PCF se congela.
 - a Descongele la placa de PCR de PCF a temperatura ambiente.
 - b Centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
 - c Pipetee 10 veces para mezclar.
 - d Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como LP (Preparación de librerías).
 - e Transfiera los 50 µl de cada muestra de la placa de PCR de PCF al pocillo correspondiente de la placa MIDI de LP.
 - f Deseche la placa de PCR de PCF.
 - g Aplique sello adhesivo para placas y colóquela en hielo hasta la *Transferencia de ADN fragmentado en la página 14*.
 - ▶ **Opción n.º 3:** procese solamente las muestras de ADNg.
 - a Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como LP (Preparación de librerías).
 - b Si se va a detener en el *PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD en la página 14*, use una placa de PCR.
 - c Cúbrela y apártela para su uso en *Transferencia de ADN fragmentado en la página 14*.

Dilución del ADNg

- 1 Descongele las muestras de ADNg y los controles de ADN a temperatura ambiente.
Procese los controles de ADN como muestras para el resto del protocolo.
- 2 Pipetee cada muestra de ADNg 10 veces para mezclar.
- 3 Centrifugue el tubo brevemente para recoger las gotas.
- 4 Invierta el TEB o agítelo en vórtex para mezclar.
- 5 Use el TEB para preparar 40 ng de cada muestra de ADNg en un volumen final de 52 µl (0,77 ng/µl).
El ensayo requiere una concentración de extracción mínima de 3,33 ng/µl, para permitir al menos 40 µl de TEB del volumen de 52 µl. Para los controles de ADN, use la concentración proporcionada en la etiqueta del tubo. Para prevenir la pérdida de muestras, no pipetee menos de 2 µl de muestra en esta dilución.

Fragmentación

- 1 Añada 52 µl de cada muestra de ADNg a un pocillo separado del tubo del ultrasonicador.
- 2 Registre la orientación de la tira.
- 3 Fragmente el ADNg en fragmentos con un ultrasonicador.

Transferencia de ADN fragmentado

- 1 Asegúrese de que el diseño de la placa de muestras y los índices para cada muestra coinciden con el experimento planeado en Local Run Manager durante la configuración del experimento.
- 2 Siga las instrucciones del fabricante del ultrasonicador para recubrir la muestra.
Para algunos tipos de tubo de ultrasonicador, la centrifugación puede ser necesaria para consolidar la muestra en el tubo.
- 3 Para cada muestra de ADNg fragmentado, use una pipeta p20 con puntas finas para realizar 3 transferencias de 16,7 µl a un pocillo vacío de la placa MIDI de LP.
- 4 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de LP.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si debe detener el procedimiento, aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de LP y centrifugue a 280 × g durante 1 minuto. Almacénela a una temperatura entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 7 días.

Fecha y hora de detención _____

Preparación de los pasos del protocolo

- 1 Prepare un cubo de hielo.
- 2 Retire el tubo de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 7 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (n.º de referencia 20031118)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
ERA1-A	Entre -25 °C y -15 °C	Mantenga en hielo.	Reparación de extremos y adición de cola de A (A-Tailing)
ERA1-B	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Reparación de extremos y adición de cola de A (A-Tailing)
ALB1	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Ligación de adaptadores
LIG3	Entre -25 °C y -15 °C	Mantenga en hielo.	Ligación de adaptadores
SUA1 (tapa azul)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Ligación de adaptadores
UMI (tapa blanca)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Ligación de adaptadores
STL	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Ligación de adaptadores
EPM	Entre -25 °C y -15 °C	Mantenga en hielo.	PCR de índices

Tabla 8 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031119)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
SPB (etiqueta verde claro)	Entre 2 °C y 8 °C	Déjelo a temperatura ambiente durante 30 minutos.	Limpieza de ligación
RSB	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Limpieza de ligación

Tabla 9 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (n.º de referencia 20031120)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
UPxx	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele los tubos de cebador de índice apropiados a temperatura ambiente.	PCR de índices

Tabla 10 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (n.º de referencia 20031126)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
CPxx	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele los tubos de cebador de índice apropiados a temperatura ambiente.	PCR de índices

Reparación de extremos y adición de cola de A (A-Tailing)

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Precaliente 2 incubadoras de micromuestras con insertos de termobloque MIDI de la siguiente manera.
 - ▶ Precaliente una incubadora de micromuestras a 30 °C.
 - ▶ Precaliente una incubadora de micromuestras a 72 °C.
- 2 Prepare los siguientes reactivos.
 - ▶ ERA1-A: centrifugue brevemente y, a continuación, pipetee para mezclar. Mantenga en hielo.
 - ▶ ERA1-B: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente. Inspeccione en busca de precipitados. Si los hay, caliente el tubo a 37 °C y, a continuación, pipetee para mezclar hasta que los precipitados se disuelvan.
- 3 Prepare la mezcla maestra de ERA1 en un tubo de microcentrífuga.

Tabla 11 Mezcla maestra de ERA1

Componente de la mezcla maestra	3 librerías	8 librerías	16 librerías	24 librerías	48 librerías
ERA1-B	26 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	10 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

En esta tabla se incluye el excedente de volumen. Consulte la sección Manipulación de reactivos en *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive (EU))* (n.º de documento 200007789) para obtener información sobre los cálculos.

- 4 Pipetee lentamente 10 veces para mezclar, centrifugue brevemente y, a continuación, coloque la mezcla maestra de ERA1 en hielo.
- 5 Seleccione la opción apropiada de las dos opciones siguientes para preparar la placa.
 - ▶ **Opción n.º 1:** si las mezclas están en la placa MIDI.
 - a Vuelva a etiquetar la placa MIDI como LP2 (Preparación de librerías 2). Si algunas muestras se encuentran en placas MIDI separadas, mueva todas las muestras a pocillos separados de la misma placa MIDI de acuerdo con el diseño de la placa.
 - ▶ **Opción n.º 2:** si la placa está congelada.
 - a Descongele la placa de PCR de PCF o la placa de PCR de LP a temperatura ambiente.
 - b Centrifugue la placa a 280 × g durante 1 minuto.
 - c Pipetee 10 veces para mezclar.
 - d Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como LP2 (Preparación de librerías 2).
 - e Transfiera los 50 µl de cada muestra de la placa de PCR de PCF o la placa de PCR de LP al pocillo correspondiente de la placa MIDI de LP2.

- f Deseche la placa de PCR de PCF o la placa de PCR de LP.

Procedimiento

- 1 Añada 10 µl de mezcla maestra de ERA1 a cada pocillo de muestra en la placa MIDI de LP2.
- 2 Deseche la mezcla maestra de ERA1 restante.
- 3 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de LP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
- 4 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- 5 Incube en la incubadora de micromuestras precalentada a 30 °C durante 30 minutos.
- 6 Realice una transferencia a una segunda incubadora de micromuestras precalentada e incube a 72 °C durante 20 minutos.
- 7 Coloque la placa MIDI de LP2 en hielo durante 5 minutos.

Ligación de adaptadores

Este proceso liga los adaptadores a los extremos de los fragmentos de ADNc y/o ADNg.

El ensayo TSO Comprehensive incluye adaptadores SUA1 y adaptadores UMI.

- ▶ Use los adaptadores SUA1 con las muestras de ARN.
- ▶ Use los adaptadores UMI con las muestras de ADN.

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Prepare los siguientes reactivos.
 - ▶ ALB1: agite en vórtex durante 10 segundos como mínimo para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ LIG3: centrifugue brevemente y, a continuación, pipetee para mezclar. Mantenga en hielo.
 - ▶ SUA1: agite en vórtex durante 10 segundos como mínimo para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ UMI: agite en vórtex durante 10 segundos como mínimo para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ STL: apártelo para usarlo en el procedimiento.

Procedimiento

- 1 Retire del hielo la placa MIDI de LP2.
- 2 Añada 60 µl de ALB1 a cada pocillo de muestra de la placa MIDI de LP2; asegúrese de pipetear lentamente.
- 3 Añada 5 µl de LIG3 a cada pocillo de muestra.
- 4 Añada los adaptadores.
 - No** combine entre sí tipos diferentes de adaptadores.
 - **Pocillos de muestras de ARN:** 10 µl de SUA1 (tapa azul) a cada muestra derivada de ARN.
 - **Pocillos de muestras de ADN:** 10 µl de UMI (tapa blanca) a cada muestra derivada de ADN.
- 5 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de LP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 6 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- 7 Incube a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 8 Agite en vórtex el STL para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 9 Añada 5 µl de STL a cada pocillo de muestra de la placa MIDI de LP2.
- 10 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de LP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
- 11 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.

Limpieza de ligación

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Prepare los siguientes reactivos.
 - ▶ SPB: asegúrese de que las bolas están a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 - ▶ RSB: apártelo para usarlo en el procedimiento.
- 2 Prepare EtOH al 80 % nuevo en un tubo cónico de 15 ml o 50 ml.

Reactivo	3 librerías	8 librerías	16 librerías	24 librerías	48 librerías
Alcohol de etanol al 100 % puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Agua sin ARNasa/ADNasa	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Agite en vórtex EtOH al 80 % nuevo para mezclar.
- 4 Configure el imán.

Procedimiento

Unión

- 1 Agite en vórtex las SPB durante 1 minuto para volver a suspender las bolas.
- 2 Justo después, añada 112 µl de SPB a cada pocillo de muestra en la placa MIDI de LP2.
Si se usa una cubeta para dispensar SPB, incluya un factor de excedente de 1,05 al alicuotar suficiente material por muestra. Deseche el material restante una vez que se haya añadido las SPB a cada pocillo de la muestra.
- 3 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de LP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 4 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- 5 Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 6 Coloque la placa MIDI de LP2 en el soporte magnético durante 10 minutos.
- 7 Use una pipeta P200 ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo de muestra sin alterar el pellet de bolas.

Lavado

- 1 Lave las bolas de la siguiente manera.
 - a Mantenga en el soporte magnético y añada 200 µl de EtOH al 80 % nuevo a cada pocillo de muestra.
 - b Espere 30 segundos.
 - c Retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo sin alterar el pellet de bolas.
- 2 Lave las bolas una **segunda** vez.
- 3 Retire los residuos de EtOH de cada pocillo.
Use una pipeta P20 con puntas finas.
- 4 Deseche el EtOH al 80 % sin usar.

Elución

- 1 Retire la placa MIDI de LP2 del soporte magnético.
- 2 Invierta el RSB o agítelo en vórtex para mezclar.
- 3 Añada 27,5 µl de RSB a cada pocillo de muestra.
- 4 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de LP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 5 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.

- 6 Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 7 Colóquela en un soporte magnético durante 2 minutos.
- 8 Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como LS (Muestras de librerías).
- 9 Transfiera 25 µl de cada eluido de la placa MIDI de LP2 al pocillo correspondiente de la placa de PCR de LS.
- 10 Deseche la placa MIDI de LP2 vacía.
- 11 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de LS.

PCR de índices

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Prepare los siguientes reactivos.
 - ▶ EPM: mantenga en hielo.
 - ▶ UPxx: agite en vórtex para mezclar y centrifugue brevemente. UPxx es el cebador de índice seleccionado en la pantalla Create Run (Crear experimento) del software Local Run Manager durante la configuración del experimento.
 - ▶ CPxx: agite en vórtex para mezclar y centrifugue brevemente. CPxx es el cebador de índice seleccionado en la pantalla Create Run (Crear experimento) del software Local Run Manager durante la configuración del experimento.
- 2 Asegúrese de que los índices para cada muestra coinciden con el experimento planeado en Local Run Manager durante la configuración del experimento. Asegúrese de seguir las instrucciones en lo que respecta a la selección de índices en *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive (EU))* (n.º de documento 200007789).



PRECAUCIÓN

Las discrepancias entre las muestras y los cebadores de indexación generan informes con resultados incorrectos debido a que no se identifican las muestras positivas.

Procedimiento

- 1 Añada 5 µl del cebador de índice apropiado (UPxx o CPxx) en el pocillo de muestra correspondiente de la placa de PCR de LS de acuerdo con los índices seleccionados en la pantalla Create Run (Crear experimento) del software Local Run Manager durante la configuración del experimento.



PRECAUCIÓN

Manipule y abra solamente un tubo de cebador de índice a la vez. Tape cada tubo de índice inmediatamente después de su uso. No combine cebadores de índice entre sí.

- 2 Agite en vórtex la EPM para mezclar durante 5 segundos y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 3 Añada 20 µl de EPM a cada pocillo de muestra.
- 4 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de LS.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
- 5 Agite a 1200 rpm durante 1 minuto.
- 6 Vuelva a almacenar los reactivos de preamplificación.



PRECAUCIÓN

Ejecute todos los pasos sucesivos en un área de posamplificación para evitar el arrastre del producto de amplificación.

- 7 Centrifugue la placa de PCR de LS a 280 × g durante 1 minuto.
- 8 Colóquela en el termociclador preprogramado de posamplificación y ejecute el programa I-PCR.
Consulte *Programación de los termocicladores en la página 4*.

NOTA Si continúa con la *Configuración de la primera hibridación en la página 19*, siga las instrucciones de descongelación para los reactivos de Preparación de los pasos del protocolo.

- 9 Una vez finalizado el programa I-PCR, centrifugue la placa de PCR de LS a 280 x g durante 1 minuto.
- 10 Vuelva a etiquetar la placa como ALS (Amplified Library Samples, Muestras de librerías amplificadas).

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si debe detener el procedimiento, selle la placa de PCR de ALS a entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 30 días.

Fecha y hora de detención _____

Preparación de los pasos del protocolo

- 1 Asegúrese de ajustar los programas del termociclador de posamplificación. Consulte *Programación de los termocicladores en la página 4*.
- 2 Retire el tubo de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 12 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031123)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
TCB1	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Configuración de la primera hibridación

Tabla 13 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20031121)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
TCA1	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la primera hibridación

Tabla 14 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n.º de referencia 20031122)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
OPR1 (tapa roja)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la primera hibridación
OPD2 (tapa blanca)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la primera hibridación

Configuración de la primera hibridación

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Prepare los siguientes reactivos.
 - ▶ TCB1: caliente el tubo a 37 °C durante 5 minutos. Agite en vórtex durante 10 segundos para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ TCA1: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ OPR1: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ OPD2: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 2 Si la placa de PCR de ALS estaba almacenada, descongéla a temperatura ambiente y, a continuación, centrifugue a 280 x g durante 1 minuto. A continuación, pipetee para mezclar.
- 3 Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como HYB1 (Hibridación 1).

Procedimiento

- 1 Transfiera 20 µl de cada librería de ADNc y/o ADNg de la placa de PCR de ALS al pocillo correspondiente en la placa de PCR HYB1.

- 2 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de ALS y apártela. Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 3 Inspeccione si hay precipitados en el TCB1. Si los hay, caliente nuevamente el tubo y agite en vórtex el tubo hasta que se disuelvan los cristales.
- 4 Añada 15 µl de TCB1 a cada pocillo de la librería en la placa de PCR HYB1.
- 5 Añada 10 µl de TCA1 a cada pocillo de la librería en la placa de PCR HYB1.
- 6 Añada las sondas.
No combine entre sí tipos diferentes de sondas.
 - ▶ **Pocillos de librería de ARN:** 5 µl de OPR1 a cada librería obtenida del ARN.
 - ▶ **Pocillos de librería de ADN:** 5 µl de OPD2 a cada librería obtenida del ADN.
- 7 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR HYB1.



PRECAUCIÓN

Asegúrese de sellar los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.

- 8 Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
- 9 Colóquela en el termociclador y ejecute el programa HYB1.
 Consulte *Programación de los termocicladores en la página 4*.
- 10 Hibride a 57 °C durante un mínimo de 8 horas a un máximo de 24 horas.
- 11 Vuelva a almacenar los reactivos de hibridación.
- 12 Almacene la placa de PCR de ALS a entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 30 días.

Preparación de los pasos del protocolo

- 1 Al inicio del día 2, retire el tubo de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 15 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031123)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
SMB (etiqueta azul oscuro)	Entre 2 °C y 8 °C	Déjelo a temperatura ambiente durante 30 minutos.	1.ª captura de las regiones de interés 2.ª captura de las regiones de interés
ET2	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	1.ª captura de las regiones de interés 2.ª captura de las regiones de interés
HP3	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	1.ª captura de las regiones de interés 2.ª captura de las regiones de interés Normalización de las librerías
TCB1	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Configuración de la segunda hibridación
RSB	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	2.ª captura de las regiones de interés Limpieza de las librerías enriquecidas amplificadas

Tabla 16 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20031121)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
EE2	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	1.ª captura de las regiones de interés 2.ª captura de las regiones de interés Normalización de las librerías
EEW	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	1.ª captura de las regiones de interés
TCA1	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la segunda hibridación

Tabla 17 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n.º de referencia 20031122)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
OPR1 (tapa roja)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la segunda hibridación
OPD2 (tapa blanca)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Configuración de la segunda hibridación

1.ª captura de las regiones de interés

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Precaliente una incubadora de micromuestras con un fragmento de bloque de calor MIDI a 57 °C.
- 2 Prepare los siguientes reactivos.
 - ▶ EEW: agite en vórtex para mezclar durante 1 minuto.
 - ▶ EE2: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ HP3: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ SMB: asegúrese de que las bolas están a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 - ▶ Asegúrese de usar **SMB** para este procedimiento, no SPB.
 - ▶ ET2: apártelo para usarlo en el procedimiento.
- 3 Prepare una mezcla de elución de EE2+HP3 nueva en un tubo de microcentrifuga.

Tabla 18 Mezcla de elución de EE2+HP3 para 1.ª captura de las regiones de interés

Componente de la mezcla de elución	3 librerías	8 librerías	16 librerías	24 librerías	48 librerías
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

En esta tabla se incluye el excedente de volumen. Consulte la sección Manipulación de reactivos en *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive (EU))* (n.º de documento 200007789) para obtener información sobre los cálculos.

- 4 Agite en vórtex la mezcla de elución de EE2+HP3 y, a continuación, centrifugue brevemente. Apártela para el paso *Elución*.
- 5 Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como CAP1 (Captura 1).
- 6 Configure el imán.

Procedimiento

Unión

- 1 Retire la placa de PCR de HYB1 del termociclador.
- 2 Centrifugue la placa de PCR de HYB1 a 280 × g durante 1 minuto.
- 3 Agite en vórtex las SMB durante 1 minuto para volver a suspender las bolas.
- 4 Justo después, añada 150 µl de SMB a cada pocillo de la librería para la placa MIDI de CAP1.
Si se usa una cubeta para dispensar SPB, incluya un factor de excedente de 1,15 al alicuotar suficiente material por muestra. Deseche el material restante una vez que se haya añadido las SMB a cada pocillo de la muestra.
- 5 Ajuste la pipeta a 50 µl y transfiera el volumen íntegro de cada librería de la placa de PCR de HYB1 al pocillo correspondiente en la placa MIDI de CAP1.
- 6 Deseche la placa de PCR de HYB1 vacía.
- 7 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP1.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
- 8 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- 9 Incube en la incubadora de micromuestras precalentada a 57 °C durante 25 minutos.

- 10 Colóquela en un soporte magnético durante 2 minutos.
- 11 Mientras mantiene la placa MIDI de CAP1 en el soporte magnético, use una pipeta P200 ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante sin alterar el pellet de bolas.

**PRECAUCIÓN**

Justo después, continúe con el paso siguiente (*Lavado*). No deje que el pellet de bolas se asiente durante un periodo de tiempo prolongado sin que haya líquido presente.

Lavado

- 1 Lave las bolas de la siguiente manera.
 - a Retire la placa MIDI de CAP1 del soporte magnético.
 - b Añada 200 µl de EEW a cada pocillo.
 - c Ajuste el volumen de la pipeta a 150 µl y pipetee para mezclar un mínimo de 10 veces. Asegúrese de que las bolas estén resuspendidas.

**PRECAUCIÓN**

Asegúrese de que no haya pellets de bolas presentes; para ello, aspire con cuidado toda la solución de bolas del pocillo en la punta. A continuación, inspeccione la parte inferior de cada pocillo de un pellet. Inclina la punta de la pipeta hacia el pellet de bolas durante los pasos de lavado para liberar el pellet. Asegúrese de que el pellet de bolas está completamente dentro de la solución. La solución debe ser de color marrón oscuro y presentar una consistencia homogénea.

- d Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP1.
 - e Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
 - f Agite a 1800 rpm durante 4 minutos.
 - g Incube en una incubadora de micromuestras a 57 °C durante 5 minutos.
 - h Colóquela en un soporte magnético durante 2 minutos.
 - i Manténgala en el soporte magnético y retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo sin alterar el pellet de bolas.
- 2 Lave las bolas una **segunda** vez.
 - 3 Lave las bolas una **tercera** vez.
 - 4 Retire los residuos de sobrenadante de cada pocillo.
Use una pipeta P20 con puntas finas.

Elución

- 1 Retire la placa MIDI de CAP1 del soporte magnético.
- 2 Agite en vórtex la mezcla de elución de EE2+HP3 nueva y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 3 Con cuidado, añada 17 µl de mezcla de elución de EE2+HP3 a cada pocillo de la librería en la placa MIDI de CAP1.
- 4 Deseche la mezcla de elución de EE2+HP3 restante.
- 5 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP1.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 6 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- 7 Colóquela en un soporte magnético durante 2 minutos.
- 8 Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como ELU1 (Elución 1).
- 9 Agite ET2 en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 10 Añada 5 µl de ET2 a cada pocillo de la librería correspondiente en la nueva placa de PCR de ELU1.
- 11 Transfiera con cuidado 15 µl de eluido de cada pocillo de la librería de la placa MIDI de CAP1 al pocillo correspondiente en la placa de PCR de ELU1.

- 12 Deseche la placa MIDI de CAP1 vacía.
- 13 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de ELU1.
- 14 Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
- 15 Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
- 16 Vuelva a almacenar el EEW.

Configuración de la segunda hibridación

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Prepare los siguientes reactivos.
 - ▶ TCB1: caliente el tubo a 37 °C durante 5 minutos. Agite en vórtex durante 10 segundos para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ TCA1: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ OPR1: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ OPD2: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

Procedimiento

- 1 Inspeccione si hay precipitados en el TCB1. Si los hay, caliente nuevamente el tubo y agite en vórtex hasta que se disuelvan los cristales.
- 2 Añada 15 µl de TCB1 a cada pocillo de la librería en la placa de PCR de ELU1.
- 3 Añada 10 µl de TCA1 a cada pocillo de la librería.
- 4 Añada las sondas.
 - No** combine entre sí tipos diferentes de sondas.
 - ▶ **Pocillos de librería de ARN:** 5 µl de OPR1 a cada librería obtenida del ARN.
 - ▶ **Pocillos de librería de ADN:** 5 µl de OPD2 a cada librería obtenida del ADN.
- 5 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de ELU1.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
- 6 Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
- 7 Colóquela en un termociclador y ejecute el programa HYB2.
Consulte *Programación de los termocicladores en la página 4*.
- 8 Hibride a 57 °C para un mínimo de 1,5 horas a un máximo de 4 horas.
- 9 Vuelva a almacenar los TCA1, el TCB1, OPR1 y el OPD2.

2.^a captura de las regiones de interés

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Precaliente una incubadora de micromuestras con el fragmento de bloque de calor MIDI a 57 °C.
- 2 Prepare los siguientes reactivos.
 - ▶ EE2: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ HP3: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ SMB: asegúrese de que las bolas están a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 - ▶ Asegúrese de usar **SMB** para este procedimiento, no SPB.
 - ▶ RSB: apártelo para usarlo en el procedimiento.
 - ▶ ET2: apártelo para usarlo en el procedimiento.
- 3 Prepare una mezcla de elución de EE2+HP3 nueva en un tubo de microcentrífuga.

Tabla 19 Mezcla de elución de EE2+HP3 para 2.ª captura de las regiones de interés

Componente de la mezcla de elución	3 librerías	8 librerías	16 librerías	24 librerías	48 librerías
EE2	85,5 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	4,5 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

En esta tabla se incluye el excedente de volumen. Consulte la sección Manipulación de reactivos en *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive (EU))* (n.º de documento 200007789) para obtener información sobre los cálculos.

- 4 Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente. Apártela para el paso **Elución**.
- 5 Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como CAP2 (Captura 2).
- 6 Configure el imán.

Procedimiento

Unión

- 1 Retire la placa de PCR de ELU1 del termociclador.
- 2 Centrifugue la placa de PCR de ELU1 a 280 × g durante 1 minuto.
- 3 Agite en vórtex las SMB durante 1 minuto para volver a suspender las bolas.
- 4 Justo después, añada 150 µl de SMB a cada pocillo de la librería para la placa MIDI de CAP2.
Si se usa una cubeta para dispensar SPB, incluya un factor de excedente de 1,15 al alicuotar suficiente material por muestra. Deseche el material restante una vez que se haya añadido las SMB a cada pocillo de la muestra.
- 5 Ajuste la pipeta a 50 µl y transfiera el volumen íntegro de cada librería de la placa de PCR de ELU1 al pocillo correspondiente de la placa MIDI de CAP2.
- 6 Deseche la placa de PCR de ELU1 vacía.
- 7 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
- 8 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- 9 Incube en una incubadora de micromuestra a 57 °C durante 25 minutos.

NOTA Si continúa con la **Amplificación de las librerías enriquecidas en la página 25**, siga las instrucciones de descongelación para los reactivos en la sección Preparación de los pasos del protocolo.

- 10 Colóquela en un soporte magnético durante 2 minutos.
- 11 Mantenga la placa MIDI de CAP2 en el soporte magnético y use una pipeta P200 ajustada a 200 µl para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo de la librería sin alterar el pellet de bolas.



PRECAUCIÓN

Justo después, continúe con el paso siguiente (**Lavado**). No deje que el pellet de bolas se asiente durante un periodo de tiempo prolongado sin que haya líquido presente.

Lavado

- 1 Retire la placa MIDI de CAP2 del soporte magnético.
- 2 Invierta el RSB o agítelo en vórtex para mezclar.
- 3 Añada 200 µl de RSB a cada pocillo.
- 4 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 5 Agite a 1800 rpm durante 4 minutos.
- 6 Colóquela en el soporte magnético durante 2 minutos.
- 7 Mantenga la placa MIDI de CAP2 en el soporte magnético y retire y deseche todo el sobrenadante sin alterar el pellet de bolas.

- 8 Retire los residuos de sobrenadante de cada pocillo.
Use una pipeta P20 con puntas finas.

Elución

- 1 Retire la placa MIDI de CAP2 del soporte magnético.
- 2 Agite en vórtex la mezcla de elución de EE2+HP3 nueva y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 3 Añada 22 µl de mezcla de elución de EE2+HP3 a cada pocillo de la librería en la placa MIDI de CAP2.
- 4 Deseche la mezcla de elución de EE2+HP3 restante.
- 5 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de CAP2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 6 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- 7 Colóquela en un soporte magnético durante 2 minutos.
- 8 Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como ELU2 (Elución 2).
- 9 Agite ET2 en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 10 Añada 5 µl de ET2 en cada pocillo de la librería correspondiente en la nueva placa de PCR de ELU2.
- 11 Transfiera con cuidado 20 µl de eluido de cada pocillo de la librería de la placa MIDI de CAP2 al pocillo correspondiente en la placa de PCR de ELU2.
- 12 Deseche la placa MIDI de CAP2 vacía.
- 13 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de ELU2.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
- 14 Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
- 15 Vuelva a almacenar las SMB, la EE2, el HP3 y ET2.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si debe detener el procedimiento, centrifugue la placa de PCR de ELU2 a 280 × g durante 1 minuto y almacénela entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 7 días. Vuelva a almacenar el RSB.

Fecha y hora de detención _____

Preparación de los pasos del protocolo

- 1 Prepare un cubo de hielo.
- 2 Retire el tubo de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 20 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20031121)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
PPC3	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Amplificación de las librerías enriquecidas
EPM	Entre -25 °C y -15 °C	Mantenga en hielo.	Amplificación de las librerías enriquecidas

Tabla 21 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031123)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
SPB (etiqueta verde claro)	Entre 2 °C y 8 °C	Déjelo a temperatura ambiente durante 30 minutos.	Limpieza de las librerías enriquecidas amplificadas
RSB	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Limpieza de las librerías enriquecidas amplificadas Preparación para la secuenciación

Amplificación de las librerías enriquecidas

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Si la placa de ELU2 estaba almacenada, descongéla a temperatura ambiente y, a continuación, centrifúgala a 280 × g durante 1 minuto.

Procedimiento

- 1 Agite en vórtex la PPC3 para mezclar y, a continuación, centrifúgala brevemente.
- 2 Añada 5 µl de PPC3 en cada pocillo de librería de la placa de PCR de ELU2.
- 3 Agite en vórtex la EPM durante 5 segundos y, a continuación, centrifúgala brevemente.
- 4 Añada 20 µl de EPM a cada pocillo de librería.
- 5 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de ELU2.
Selle los bordes y los pocillos completamente para evitar que se produzca evaporación.
- 6 Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
- 7 Colóquela en un termociclador y ejecute el programa EL-PCR.
Consulte *Programación de los termocicladores en la página 4*.

NOTA Si continúa con la *Normalización de las librerías en la página 28*, siga las instrucciones de descongelación en la sección "Preparación de pasos del protocolo".

- 8 Vuelva a almacenar la PPC3 y EPM.

Limpieza de las librerías enriquecidas amplificadas

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Prepare los siguientes reactivos.
- ▶ SPB: asegúrese de que las bolas están a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 - ▶ Asegúrese de usar **SPB** para este procedimiento, no SMB.
 - ▶ RSB: apártelo para usarlo en el procedimiento.
- 2 Prepare etanol al 80 % nuevo en un tubo cónico de 15 ml o 50 ml.

Reactivo	3 librerías	8 librerías	16 librerías	24 librerías	48 librerías
Alcohol de etanol al 100 % puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Agua sin ARNasa/ADNasa	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- 3 Agite en vórtex EtOH al 80 % nuevo para mezclar.
- 4 Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como BIND2 (Limpieza de placa de unión).
- 5 Configure el imán.

Procedimiento

Unión

- 1 Retire la placa de PCR de ELU2 del termociclador.
- 2 Centrifúgala a 280 × g durante 1 minuto.
- 3 Agite en vórtex las SPB durante 1 minuto para volver a suspender las bolas.
- 4 Justo después, añada 110 µl de SPB a cada pocillo de la librería para la placa MIDI de BIND2.
- 5 Transfiera 50 µl de cada librería de la placa de PCR de ELU2 al pocillo correspondiente de la placa MIDI de BIND2.
- 6 Deseche la placa de PCR de ELU2 vacía.
- 7 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BIND2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 8 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.

- 9 Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 10 Coloque la placa en un soporte magnético durante 5 minutos.
- 11 Use una pipeta P200 ajustada en 200 µl para retirar y desechar **todo** el sobrenadante de cada pocillo de la librería sin alterar el pellet de bolas.

Lavado

- 1 Lave las bolas de la siguiente manera.
 - a Mantenga en el soporte magnético y añada 200 µl de EtOH al 80 % nuevo a cada pocillo.
 - b Espere 30 segundos.
 - c Retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo de muestra sin alterar el pellet de bolas.
- 2 Lave las bolas una **segunda** vez.
- 3 Retire los residuos de EtOH de cada pocillo.
Use una pipeta P20 con puntas finas.
- 4 Deseche el EtOH al 80 % sin usar.

Elución

- 1 Retire la placa MIDI de BIND2 del soporte magnético.
- 2 Invierta el RSB o agítelo en vórtex para mezclarlo.
- 3 Añada 32 µl de RSB a cada pocillo de la librería.
- 4 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BIND2.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 5 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- 6 Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 7 Colóquela en un soporte magnético durante 2 minutos.
- 8 Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como PL (Librerías purificadas).
- 9 Transfiera 30 µl de cada eluido de la placa MIDI de BIND2 al pocillo correspondiente de la placa de PCR de PL.
- 10 Deseche la placa MIDI de BIND2 vacía.
- 11 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de PL .
- 12 Vuelva a almacenar las SPB.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si debe detener el procedimiento, centrifugue la placa de PCR de PL a 280 × g durante 1 minuto y almacénela entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 30 días. Vuelva a almacenar el RSB.

Fecha y hora de detención _____

Preparación de los pasos del protocolo

- 1 Retire el tubo de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 22 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20031121)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
LNA1	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Normalización de las librerías
EE2	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente.	Normalización de las librerías

Tabla 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031123)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
LNB1	Entre 2 °C y 8 °C	Déjelo a temperatura ambiente durante 30 minutos.	Normalización de las librerías
HP3	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Normalización de las librerías Preparación para la secuenciación
LNW1	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Normalización de las librerías
LNS1	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Normalización de las librerías

- 2 Si ese mismo día va a continuar con la *Preparación para la secuenciación en la página 30*, siga las instrucciones de descongelación en la sección Preparación de pasos del protocolo.

Normalización de las librerías

Preparación

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Prepare los siguientes reactivos.
- ▶ LNB1: asegúrese de que las bolas están a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 - ▶ LNA1: agite en vórtex para mezclar.
 - ▶ EE2: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ HP3: agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 - ▶ LNW1: agite en vórtex para mezclar. Apártelo para usarlo en el procedimiento.
 - ▶ LNS1: agite en vórtex para mezclar. Apártelo para usarlo en el procedimiento.
- 2 Agite en vórtex las LNB1 durante 1 minuto para volver a suspender las bolas. Invierta el tubo de LNB1 para asegurarse de que todas las bolas se han resuspendido.
- 3 Con ayuda de un P1000 ajustado a 800 µl, pipetee LNB1 hacia arriba y hacia abajo 10 veces para garantizar la resuspensión.
- 4 Justo después, prepare una mezcla maestra de LNA1+LNB1 nueva en un tubo cónico.



PRECAUCIÓN

Resuspenda completamente el pellet de bolas LNB1 en la parte inferior del tubo para evitar que se produzca una densidad de grupos inestable.

Tabla 24 Mezcla maestra de LNA1+LNB1

Componente de la mezcla maestra	3 librerías	8 librerías	16 librerías	24 librerías	48 librerías
LNA1	229 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	41 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

En esta tabla se incluye el excedente de volumen. Consulte la sección Manipulación de reactivos en *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (n.º de documento 200007789)* para obtener información sobre los cálculos.

- 5 Agite en vórtex la mezcla maestra de LNA1+LNB1. Apártela para el paso de *Unión*.
- 6 Prepare una mezcla de elución de EE2+HP3 nueva en un tubo de microcentrifuga.

Tabla 25 Mezcla de elución de EE2+HP3 para normalizar librerías

Componente de la mezcla de elución	3 librerías	8 librerías	16 librerías	24 librerías	48 librerías
EE2	114 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	6 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

En esta tabla se incluye el excedente de volumen. Consulte la sección Manipulación de reactivos en *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive (EU))* (n.º de documento 200007789) para obtener información sobre los cálculos.

- 7 Agite en vórtex la mezcla de elución y, a continuación, centrifugue brevemente. Apártela para el paso **Elución**.
- 8 Si la placa de PCR de PL estaba almacenada, descongélela a temperatura ambiente, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto y, a continuación, pipetee para mezclar.
- 9 Etiquete una nueva placa MIDI de 96 pocillos como BBN (normalización basada en bolas).
- 10 Configure el imán.

Procedimiento

Unión

- 1 Agite en vórtex la mezcla maestra de LNA1+LNB1.
- 2 Justo después, añada 45 µl de mezcla maestra de LNA1+LNB1 a cada pocillo de la librería de la placa MIDI de BBN.
- 3 Deseche la mezcla maestra de LNA1+LNB1 restante.
- 4 Añada 20 µl de cada librería de la placa de PCR de PL en el pocillo correspondiente de la placa MIDI de BBN.
- 5 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BBN.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 6 Agite a 1800 rpm durante 30 minutos.
- 7 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de PL y vuelva a almacenarla.
- 8 Coloque la placa en un soporte magnético durante 2 minutos.
- 9 Manténgala en un soporte magnético y utilice una pipeta P200 para retirar y desechar todo el sobrenadante de cada pocillo sin alterar el pellet de bolas.

Lavado

- 1 Lave las bolas de la siguiente manera.
 - a Retire la placa MIDI de BBN del soporte magnético.
 - b Añada 45 µl de LNW1 a cada pocillo de la librería.
 - c Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BBN.
 - d Selle los bordes y los pocillos completamente.
 - e Agite a 1800 rpm durante 5 minutos.
 - f Colóquela en un soporte magnético durante 2 minutos.
 - g Retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo sin alterar el pellet de bolas.
- 2 Lave las bolas una **segunda** vez.
- 3 Retire los residuos de sobrenadante de cada pocillo.
Use una pipeta P20 con puntas finas.

Elución

- 1 Retire la placa MIDI de BBN del soporte magnético.
- 2 Agite en vórtex la mezcla de elución de EE2+HP3 nueva y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 3 Añada 32 µl de solución de EE2+HP3 a cada pocillo de la librería de la placa MIDI de BBN.
- 4 Deseche la mezcla de elución restante.
- 5 Aplique sello adhesivo para placas en la placa MIDI de BBN.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 6 Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- 7 Colóquela en un soporte magnético durante 2 minutos.
- 8 Etiquete una nueva placa de PCR de 96 pocillos como NL (Librerías normalizadas).
- 9 Transfiera con cuidado 30 µl de eluido de cada pocillo de la librería de la placa MIDI de BBN al pocillo correspondiente en la placa de PCR de NL.

**PRECAUCIÓN**

Si se aspiran las bolas con las puntas de las pipetas, dispense las bolas en la placa con el soporte magnético y espere hasta que el líquido se vuelva transparente (aproximadamente 2 minutos) antes de pasar al siguiente paso del procedimiento.

- 10 Deseche la placa MIDI de BBN vacía.
- 11 Agite en vórtex el LNS1 para mezclar.
- 12 Añada 30 µl de LNS1 en cada pocillo de la librería en la nueva placa de PCR de NL.
- 13 Pipetee para mezclar 5 veces.
- 14 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de NL.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 15 Vuelva a almacenar las LNB1, los LNA1, la EE2, el LNW1 y LNS1.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si debe detener el procedimiento, centrifugue la placa de PCR de NL a 280 × g durante 1 minuto y almacénela entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 30 días.

Fecha y hora de detención _____

Preparación de los pasos del protocolo

Empiece la preparación de los consumibles de secuenciación a partir de NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (n.º de referencia 20028871) como mínimo una hora antes de su uso.

- 1 Retire el tampón de dilución de librerías (HT1) del almacenamiento entre -25 °C y -15 °C, descongele a temperatura ambiente y, a continuación, póngalo en hielo.
- 2 Siga las instrucciones de preparación de la *Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument* (n.º de documento 100000009513) para obtener información sobre otros consumibles del kit.
 - ▶ NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - ▶ NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
 - ▶ NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
- 3 Retire el tubo de reactivos de la caja y siga las instrucciones de descongelación.

Tabla 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n.º de referencia 20031121)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
Control interno PhiX (PhiX)	Entre -25 °C y -15 °C	Descongele a temperatura ambiente. Mantenga en hielo.	Preparación para la secuenciación

Tabla 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n.º de referencia 20031123)

Reactivo	Almacenamiento	Instrucciones de descongelación	Paso del protocolo
HP3	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Preparación para la secuenciación
RSB (etiqueta rosa)	Entre 2 °C y 8 °C	Deje que alcance la temperatura ambiente.	Preparación para la secuenciación

Preparación para la secuenciación**Preparación**

Fecha y hora de inicio _____

- 1 Revise las guías para el número de librerías y la selección de índices en *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Package Insert (Instrucciones de uso de TruSight Oncology Comprehensive (EU)) (n.º de documento 200007789)*.
- 2 Etiquete un tubo de microcentrífuga como dHP3 (HP3 diluido).
- 3 Etiquete un tubo de microcentrífuga como dPhiX (PhiX diluido).
- 4 Precaliente un termobloque 96 °C para los tubos de microcentrífuga.
- 5 Prepare un cubo de hielo.

Desnaturalización y dilución de control PhiX

- 1 Agite en vórtex el HP3 para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 2 Combine los volúmenes siguientes en el tubo de microcentrífuga dHP3.
 - ▶ 10 µl de HP3
 - ▶ 190 µl de agua sin ARNasa/ADNasa
- 3 Agite en vórtex el dHP3 para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 4 Invierta el RSB o agítelo en vórtex para mezclar.
- 5 Agite en vórtex el control PhiX para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 6 Combine los volúmenes siguientes en el tubo de microcentrífuga dPhiX.
 - ▶ RSB de 8 µl
 - ▶ Control PhiX de 2 µl
- 7 Añada 10 µl de dHP3 al tubo dPhiX.
- 8 Deseche el tubo dHP3.
- 9 Agite en vórtex el tubo dPhiX para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 10 Incube el dPhiX a temperatura ambiente durante 5 minutos para desnaturalizar.
- 11 Agite en vórtex el HT1 para mezclar.
- 12 Justo después, añada 980 µl de HT1 enfriado previamente al dPhiX.
- 13 Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 14 Coloque el dPhiX en hielo hasta el uso en la preparación para la segunda dilución.
La concentración final es un dPhiX de 20 pM.
- 15 Vuelva a almacenar el PhiX, HP3 y RSB.

Agrupación y desnaturalización de librerías

- 1 Si la placa de PCR de NL estaba almacenada, descongélela a temperatura ambiente y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
- 2 Con ayuda de una pipeta multicanal ajustada a 30 µl, pipetee-mezcle con cuidado las librerías en la placa de PCR de NL 5 veces.
Use puntas nuevas para cada librería.



PRECAUCIÓN

Asegúrese de mezclar bien las librerías para un rendimiento óptimo.

- 3 Seleccione una de las siguientes opciones para agrupar, desnaturalizar y diluir las librerías.
 - ▶ **Opción n.º 1:** secuencie las librerías obtenidas de las muestras de ARN y las muestras de ADN simultáneamente. Consulte *Opción n.º 1: librerías de ADN y ARN juntas en la página 31*.
 - ▶ **Opción n.º 2:** secuencie las librerías obtenidas solamente de las muestras de ADN. Consulte *Opción n.º 2: librerías de ADN solo en la página 32*.
 - ▶ **Opción n.º 3:** secuencie las librerías obtenidas solamente de las muestras de ARN. Consulte *Opción n.º 3: librerías de ARN solo en la página 33*.

Opción n.º 1: librerías de ADN y ARN juntas

- 1 Etiquete un tubo de microcentrífuga como PRL (Librerías de ARN agrupadas).
- 2 Etiquete un tubo de microcentrífuga como PDL (Librerías de ADN agrupadas).

- 3 Transfiera 10 µl de cada librería de ARN normalizada (ADNc) desde la placa de NL hasta el tubo PRL.
No agrupe dos librerías con el mismo cebador de índice.
- 4 Transfiera 10 µl de cada librería de ADN normalizada desde la placa de NL hasta el tubo PDL.
No agrupe dos librerías con el mismo cebador de índice.
- 5 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de NL.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 6 Agite en vórtex cada tubo PRL y PDL para mezclar.
- 7 Centrifugue brevemente los tubos PRL y PDL.
- 8 Incube los tubos PRL y PDL en un bloque de calor a 96 °C durante 2 minutos.
- 9 Coloque el PRL y el PDL en hielo durante 5 minutos.
- 10 Agite en vórtex los tubos PRL y PDL para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 11 Vuelva a poner en hielo los tubos PRL y PDL.

Preparación de la primera dilución

- 1 Etiquete un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml como DIL1 (Dilución 1).
- 2 Transfiera 20 µl de PDL al tubo DIL1 vacío.
- 3 Añada 5 µl de PRL a DIL1.
- 4 Deseche los tubos PDL y PRL.
- 5 Añada 475 µl de HT1 preenfriado al tubo DIL1 (Dilución 1:20).
- 6 Agite en vórtex el tubo DIL1 para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

Preparación de la segunda dilución

- 1 Etiquete un tubo de microcentrífuga de 2,0 ml como DIL2 (Dilución 2).
- 2 Transfiera 40 µl de DIL1 al tubo DIL2 vacío.
- 3 Deseche el tubo DIL1.
- 4 Añada 1660 µl de HT1 preenfriado al tubo DIL2 (Dilución 1:850).
- 5 Agite en vórtex un dPhiX de 20 pM preparado para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 6 Añada 2,5 µl de dPhiX de 20 pM preparado al tubo DIL2.
- 7 Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 8 Cargue 1300 µl de DIL2 en el NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) descongelado
Para obtener más información, consulte la *Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (n.º de documento 100000009513)*.
- 9 Deseche el tubo DIL2.
- 10 Centrifugue la placa de PCR de NL a 280 x g durante 1 minuto y almacénela entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 30 días.
- 11 Proceda a realizar la secuenciación.
Para obtener más información, consulte la *Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (n.º de documento 100000009513)*.

Opción n.º 2: librerías de ADN solo

- 1 Etiquete un tubo de microcentrífuga como PDL (Librerías de ADN agrupadas).
- 2 Transfiera 10 µl de cada librería de ADN normalizada desde la placa de NL hasta el tubo PDL.
No agrupe dos librerías con el mismo cebador de índice.
- 3 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de NL.
Selle los bordes y los pocillos completamente.
- 4 Agite en vórtex el tubo PDL para mezclar.
- 5 Centrifugue brevemente el tubo PDL.
- 6 Incube el tubo PDL en un bloque de calor a 96 °C durante 2 minutos.
- 7 Coloque el PDL en hielo durante 5 minutos.
- 8 Agite en vórtex el tubo PDL para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

- 9 Vuelva a poner en hielo el tubo PDL.

Preparación de la primera dilución

- 1 Etiquete un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml como DIL1 (Dilución 1).
 2 Transfiera 10 µl de PDL al tubo DIL1 vacío.
 3 Deseche el tubo PDL.
 4 Añada 190 µl de HT1 preenfriado al tubo DIL1 (Dilución 1:20).
 5 Agite en vórtex el DIL1 para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

Preparación de la segunda dilución

- 1 Etiquete un tubo de microcentrífuga de 2,0 ml como DIL2 (Dilución 2).
 2 Transfiera 40 µl de DIL1 al tubo DIL2 vacío.
 3 Deseche el tubo DIL1.
 4 Añada 1660 µl de HT1 preenfriado al tubo DIL2 (Dilución 1:850).
 5 Agite en vórtex dPhiX de 20 pM preparado y, a continuación, centrifugue brevemente.
 6 Añada 2,5 µl de dPhiX de 20 pM preparado al tubo DIL2.
 7 Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 8 Cargue 1300 µl de DIL2 en el NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) descongelado.
 Para obtener más información, consulte la *Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (n.º de documento 100000009513)*.
 9 Deseche el tubo DIL2.
 10 Centrifugue la placa de PCR de NL a 280 x g durante 1 minuto y, a continuación, almacénela entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 30 días.
 11 Proceda a realizar la secuenciación.
 Para obtener más información, consulte la *Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (n.º de documento 100000009513)*.

Opción n.º 3: librerías de ARN solo

- 1 Etiquete un tubo de microcentrífuga como PRL (Librerías de ARN agrupadas).
 2 Transfiera 10 µl de cada librería de ARN normalizada (ADNc) desde la placa de NL hasta el tubo PRL.
 No agrupe dos librerías con el mismo cebador de índice.
 3 Aplique sello adhesivo para placas en la placa de PCR de NL.
 Selle los bordes y los pocillos completamente.
 4 Agite en vórtex el tubo PRL para mezclar.
 5 Centrifugue brevemente el tubo PRL.
 6 Incube el tubo PRL en un bloque de calor a 96 °C durante 2 minutos.
 7 Coloque el PRL en hielo durante 5 minutos.
 8 Agite en vórtex el tubo PRL para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
 9 Vuelva a poner en hielo el tubo PRL.

Preparación de la primera dilución

- 1 Etiquete un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml como DIL1 (Dilución 1).
 2 Transfiera 10 µl de PRL al tubo DIL1 vacío.
 3 Deseche el tubo PRL.
 4 Añada 190 µl de HT1 preenfriado al tubo DIL1 (Dilución 1:20).
 5 Agite en vórtex el DIL1 para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.

Preparación de la segunda dilución

- 1 Etiquete un tubo de microcentrífuga de 2,0 ml como DIL2 (Dilución 2).
 2 Transfiera 40 µl de DIL1 al tubo DIL2 vacío.

- 3 Deseche el tubo DIL1.
- 4 Añada 1646 µl de HT1 preenfriado al tubo DIL2 (Dilución 1:843).
- 5 Agite en vórtex dPhiX de 20 pM preparado y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 6 Añada 16,7 µl de dPhiX de 20 pM preparado al tubo DIL2.
- 7 Agite en vórtex para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
- 8 Cargue 1300 µl de DIL2 en el NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) descongelado.
Para obtener más información, consulte la *Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (n.º de documento 100000009513)*.
- 9 Deseche el tubo DIL2.
- 10 Centrifugue la placa de PCR de NL a 280 × g durante 1 minuto y almacénela entre -25 °C y -15 °C durante un periodo máximo de 30 días.
- 11 Proceda a realizar la secuenciación.
Para obtener más información, consulte la *Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (n.º de documento 100000009513)*.

Patentes y marcas comerciales

Este documento y su contenido son propiedad exclusiva de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor o similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en este de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES PERSONALES, INCLUIDOS LOS USUARIOS U OTRAS PERSONAS Y DAÑOS EN OTROS BIENES Y QUEDARÁ ANULADA TODA GARANTÍA APLICABLE AL PRODUCTO.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA DERIVADA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE).

© 2022 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Para obtener información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Información de contacto



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 (EE. UU.)
+ 1 800 809 ILMN (4566)
+ 1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Países Bajos

Etiquetado de productos

Consulte la clave de símbolos de su kit en support.illumina.com para acceder a una referencia completa de símbolos que podrían aparecer en etiquetas y envases de productos.