

TruSeq™ Custom Amplicon Dx – FFPE QC-kit

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK

Katalognr 20006259: 1–4 användningstillfällen, upp till 48 prover

Avsedd användning

Illumina TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-kit är en uppsättning reagenser som används för att fastställa amplifieringspotentialen för genomiskt DNA (gDNA), vilket extraheras från formalinfixerade och paraffinbäddade (FFPE) prover.

Grundläggande principer

Illumina TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-kittet är avsett för utvärdering av kvaliteten hos prospektiva DNA-prover av FFPE-vävnad, i syfte att fastställa om de kan användas med TruSeq anpassat amplikonkit Dx eller andra biblioteksberedningskit. Kittet använder en kvantitativ PCR-realtidsanalys (qPCR) som kan utföras med standardinstrument. qPCR fastställer amplifieringspotentialen hos DNA som extraherats från FFPE-prover.

Kraven på FFPE gDNA-inmatningen vid biblioteksberedning baseras på den deltakvantitativa cykeln (dCq) som erhålls via kittet. dCq är skillnaden i cykeln då både ett prov och en kontroll få godkänt för ett tröskelvärde. Reagenserna i TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-kitTET amplifierar specifikt upprepade områden i hela genomet. Antalet bibliotek beror på hur mycket amplifierbart gDNA som extraherats från FFPE-prover. Ju högre dCq-värde proverna har, desto lägre är den amplifierbara gDNA-quantiteten, och en större volym inmatat DNA krävs för biblioteksberedning.

Begränsningar

- 1 För *in vitro*-diagnostiskt bruk.

Produktkomponenter

Illumina TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-kit innefattar följande:

- TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-kit (katalognr 20006259)

Reagenser

Reagenser som tillhandahålls

Illumina TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-kit har konfigurerats för bearbetning av 48 prover. Kittet kan användas fyra gånger med 12 prover per användning.

I nedanstående tabeller finns en fullständig lista över reagenser som medföljer i kittet.

TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-kit

Tabell 1 Pre-amplifieringsreagenser i förpackningen

Komponent	Antal	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser	Förvaring
qPCR-masterblandning	2 rör	1 ml	Buffrad vattenlösning innehållande salter, dNTP, DNA-polymeras, passiv referens och grönt fluorescerande färgämne (SYBR)	-25 °C till -15 °C
Primrar för kvalitetskontroll	4 rör	75 µl	Buffrad vattenlösning innehållande oligonukleotider (primrar) för DNA-prov kvalificering	-25 °C till -15 °C

Nödvändiga reagenser – tillhandahålls inte

- 1X TE-buffert (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0)
- Vatten, fritt från RNase/DNase

Förvaring och hantering

- 1 Rumstemperatur definieras som 15 °C till 30 °C.
- 2 Följande reagenser levereras frysta och är stabila när de förvaras vid -25 °C till -15 °C fram tills angivet utgångsdatum:
 - ▶ qPCR-masterblandning
 - ▶ Primrar för kvalitetskontroll
 Reagenserna är stabila i högst sex cykler av frysning/ting som utförs före angivet utgångsdatum.
- 3 Förändringar av reagensernas utseende kan indikera en försämring av materialens kvalitet. Om reagensens fysiska utseende ändras, till exempel märkbara förändringar i reagensfärg eller tydlig grumlighet med mikrobiell kontamination, ska reagensen inte användas.

Utrustning och material

Nödvändig utrustning och material – tillhandahålls inte

Utrustning och material för pre-amplifiering

- 1 **Bordscentrifug** – En bordscentrifug som placeras i labbområdet för pre-amplifiering eller post-amplifiering. Centrifugen måste uppfylla följande specifikationer:
 - ▶ Kan bibehålla 20 °C
 - ▶ Rymmer en platta med 96 eller 384 brunnar
 - ▶ Kan användas med 5 ml-rör
 - ▶ Uppnår hastigheter på 280 till 2 400 × g
- 2 **Precisionspipetter** – En uppsättning precisionspipetter krävs. Användning av precisionspipetter säkerställer exakt tillförsel av reagens och prov. En- och/eller flerkanaliga pipetter kan användas om de kalibreras regelbundet och har en exakthet som ligger inom 5 % av angiven volym.
- 3 **Förbrukningsmaterial** – Följande förbrukningsmaterial krävs:
 - ▶ Rör om 1,5 ml eller 2 ml
 - ▶ 8-rörremсор och lock
 - ▶ PCR-plattor med 96 eller 384 brunnar som är kompatibla med qPCR-instrument, 0,2 ml, polypropylen eller motsvarande
 - ▶ Lösningsskål, PVC, DNase, fritt från RNase (tråg)
 - ▶ Försegling kompatibel med qPCR-instrument
 - ▶ Aerosolresistent pipettspetsar
- 4 **Mikrocentrifug**

- 5 **Vortexblandare**
- 6 **Kvalitetskontroll-DNA** – Dubbelsträngat humant DNA med hög molekylvikt som finns hos kommersiella leverantörer eller har isolerats från humant blod.

Utrustning och material för post-amplifiering

- 1 **qPCR-termocykel** – Ett kvantitativt PCR-instrument krävs. Instrumentet måste ha ett uppvärmt lock och kunna känna av SYBR-färgämnet (FAM-kanal; exciteringsfilter på ~490 nm och emissionsfilter på ~520 nm).

Varningar och försiktighetsåtgärder



FÖRSIKTIGHET!

Enligt federal lag i USA får denna produkt endast säljas av eller på ordination av läkare eller övrig vårdpersonal som har licens i den delstat där han/hon är verksam och får använda eller ordinera användning av produkten.



VARNING!

Den här uppsättningen med reagenser innehåller potentiellt farliga kemikalier. Personskador kan uppstå vid inandning, intagande, hudkontakt och ögonkontakt. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och en laboratorierock som lämpar sig för den här graden av exponering. Hantera använda reagenser som kemiskt avfall och kassera dem i enlighet med nationella och lokala bestämmelser. Ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet finns i säkerhetsdatabladet (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

- 1 Hantera alla blodprover som om de bekräftats vara smittsamma med humant immunbristvirus (HIV), humant hepatit B-virus (HBV) och annan blodburen smitta (allmänna försiktighetsåtgärder).
- 2 Om proceduren inte följs enligt givna anvisningar kan det leda till felaktiga resultat eller avsevärt försämrade provkvalitet.
- 3 Arbeta enligt vedertagna laboratorierutiner. Använd inte pipetten med munnen. Ät inte, drick inte och rök inte på angivna arbetsområden. Använd engångshandskar och laboratorierockar vid hantering av prover och reagenser i kittet. Tvätta händerna noga efter hantering av prover och reagenser i kittet.
- 4 Använd inte några kitkomponenter efter det utgångsdatum som anges på etiketten på kittets förpackning. Byt inte ut kitkomponenter mot komponenter från olika partier. Observera att kitpartierna anges på etiketten på kittets förpackning.
- 5 Förvara kitkomponenterna vid den angivna temperaturen i avsedda områden för pre-amplifiering och post-amplifiering.
- 6 Undvik att frysa/tina reagenserna i upprepade cykler. Det finns information om antalet användningstillfällen för kittet i *Metodanmärkingar på sidan 4*.
- 7 För att förhindra att prov eller reagens bryts ner ska du säkerställa att alla natriumhypokloritångor har avdunstat helt innan du påbörjar protokollet.
- 8 God laboratoriesed och laboratoriehygien krävs för att förhindra att PCR-produkter kontaminerar reagenser, instrument och prover med genomiskt DNA. PCR-kontamination kan ge upphov till felaktiga och otillförlitliga resultat.
- 9 För att undvika kontamination ska områdena som används före och efter amplifiering ha sin egen utrustning (t.ex. pipetter, pipettspetsar, vortexblandare och centrifug).
- 10 Undvik korskontaminering. Använd nya pipettspetsar mellan prover och mellan dispensering av reagenser. Blanda prover med en pipett och centrifugera plattan när så anges. Vortexblanda inte plattorna. Genom att använda aerosolresistenta spetsar minskar risken för överföring mellan amplikoner och korskontaminering från prov till prov.
- 11 Kvantifieringsmetoderna är beroende av exakta pipetteringsmetoder. Använd inte pipetterna vid volymspecifikationernas extremvärden. Kontrollera att pipetterna har kalibrerats.

Akronymer

Tabell 2 Akronymer för TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-kit

Akronym	Benämning
NTC	Reagenskontroll utan mall (No Template Control)
qPCR	Kvantitativ polymeraskedjereaktion (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

Insamling, transport och förvaring av prover

Följande villkor måste uppfyllas vid hantering av tumörvävnad och DNA som extraherats från vävnaden.

- 1 Tumörvävnad ska vara formalinfixerad och paraffinbäddad.
- 2 Extraherat gDNA ska förvaras mellan 2 °C och 8 °C i högst 28 dagar eller förvaras fryst mellan –15 °C och –25 °C i högst 161 dagar.
- 3 Frysta gDNA-prover är hållbara i två cykler av frysning/tining.

DNA-extrahering

Illumina rekommenderar kolumnbaserade DNA-extraheringskit med dubbla mängden proteinas K, proteinas K-inkuberingar över natten med omrörning och slutlig eluering i en volym på minst 30 µl. Pärlbaserade extraheringsmetoder och metoder som endast använder lysering av råa cellextrakt rekommenderas ej för användning med dessa reagenser.



OBS!

Ingen negativ effekt på kittets resultat observerades på FFPE-vävnad när spår av paraffiniseringslösning, paraffinax, xylene, etanol, proteinas K, tvättlösningar, hemoglobin eller nekrotisk vävnad förekom.

Metodanmärkningar

- 1 Satsen kan användas upp till fyra gånger om färre än 96 prover screenas.
- 2 Illumina kräver att en negativ kontroll (reagenskontroll utan mall) inkluderas vid varje användning.
- 3 Kvalificera DNA:t med Illumina TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-kit enligt beskrivningen i [Bruksanvisning](#). Biblioteksavkastningen och sekvenseringsresultatet är beroende av provernas kvalitet, så som den uppmäts med TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC-kit.

Bruksanvisning

Förberedelser

- 1 Låt kvalitetskontroll-DNA, primrar för kvalitetskontroll, qPCR-masterblandning och gDNA uppnå rumstemperatur.
- 2 Vortexblanda primrama för kvalitetskontroll kraftfullt och centrifugera rören en kort stund för att samla upp vätska.
- 3 Vänd kvalitetskontroll-DNA, gDNA och qPCR-masterblandning tio gånger och centrifugera rören en kort stund för att samla upp vätska.
- 4 Lägg alla rören på is och skydda qPCR-masterblandningen från ljus.
- 5 Fastställ qPCR-reaktionsblandningens plattlayout (använd [Bild 1 på sidan 5](#) som vägledning).

Förfarande

- Förbered kvalitetskontroll-DNA genom att välja ett av följande alternativ:
 - ▶ **[Alternativ 1] gDNA som finns i handeln** – Späd DNA:t baserat på koncentrationen som tillhandahålls av leverantören. Bered minst 50 µl kvalitetskontroll-DNA som nyligen späts ut till 0,25 ng/µl med hjälp av 1X TE-buffert.
 - ▶ **[Alternativ 2] Extraherat gDNA** – Fastställ koncentrationen med en spektrofotometer och 1X TE-buffert som tomt prov. Mät gDNA-provet i tre omgångar. % CV måste vara mindre än eller lika med 20 %. Upprepa provavläsningen om % CV är högre än 20 %. Förbered minst 50 µl kvalitetskontroll-DNA som nyligen späts ut till 0,25 ng/µl med hjälp av 1X TE-buffert.
- Fastställ qPCR-reaktionsblandningens plattlayout (**Bild 1**). Testa kontroll-DNA, NTC och varje prov-gDNA i tre omgångar. Beräkna antalet brunnar på följande sätt:
 - ▶ Totalt antal brunnar = 3 × [1 (kontroll-DNA) + 1 (NTC) + antal gDNA-prover]
- Kombinera 148,5 µl 1X TE-buffert och 1,5 µl prov-gDNA i en PCR 8-rörremsa för att späda provet 100 gånger.
- Använd en P200-pipett med flera kanaler inställd på 100 µl och pipettera upp och ned tio gånger för att blanda spädningsarna.
- För över 30 µl av 0,25 ng/µl utspädd kontroll-DNA till en oanvänd brunn på PCR 8-rörremsan.

Bild 1 Förslag på qPCR-plattlayout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Prov 1	Prov 1	Prov 1	Prov 9	Prov 9	Prov 9						
B	Prov 2	Prov 2	Prov 2	Prov 10	Prov 10	Prov 10						
C	Prov 3	Prov 3	Prov 3	Prov 11	Prov 11	Prov 11						
D	Prov 4	Prov 4	Prov 4	Prov 12	Prov 12	Prov 12						
E	Prov 5	Prov 5	Prov 5	Prov 13	Prov 13	Prov 13						
F	Prov 6	Prov 6	Prov 6	Prov 14	Prov 14	Prov 14						
G	Prov 7	Prov 7	Prov 7	Kontroll-DNA	Kontroll-DNA	Kontroll-DNA						
H	Prov 8	Prov 8	Prov 8	NTC	NTC	NTC						

- Tillsätt 150 µl 1X TE-buffert i en annan oanvänd brunn för användning som NTC.
- Stäng 8-rörremsorna och centrifugera en kort stund för att samla upp vätskan.
- Förbered en tillräcklig kvantitet av qPCR-reaktionsblandning för ett plattformat med 384 eller 96 brunnar baserat på det antal reaktioner som fastställdes i steg 2. I **Tabell 3** anges volymerna av respektive komponent för en enskilda reaktion. Inkludera extra volym för pipetteringsfel.

Tabell 3 qPCR-reaktionsblandning

Komponent i reaktionsblandning	384-brunnsvol. (µl)	96-brunnsvol. (µl)
qPCR-masterblandning	5	10
Primrar för kvalitetskontroll	0,8	1,6
Vatten	2,2	4,4

Komponent i reaktionsblandning	384-brunnsvol. (µl)	96-brunnsvol. (µl)
Vol. reaktionsblandning per brunn	8	16
Prov	2	4
Total reaktionsvolym per brunn	10	20

- 9 Blanda reaktionsblandningen försiktigt, men ordentligt. Centrifugera en kort stund för att samla upp vätskan. Placera reaktionsblandningen på is och skydda den från ljus tills den ska användas.
- 10 Alikvotera reaktionsblandningen i ett tråg eller en 8-rörremsa som hjälp vid dispenseringen med flerkanalspipett.
- 11 Tillsätt 8 µl (format med 384 brunnar) eller 16 µl (format med 96 brunnar) qPCR-reaktionsblandning i varje provbrunn på qPCR-plattan.

**FÖRSIKTIGHET!**

Var nogra när du pipetterar – små variationer påverkar analysen.

- 12 Tillsätt 2 µl (format med 384 brunnar) eller 4 µl (format med 96 brunnar) 0,25 ng/µl-spädning av kontroll-DNA, gDNA-provspädning eller 1X TE-buffert i varje brunn på plattan (se [Bild 1](#) för förslag).

**FÖRSIKTIGHET!**

Var nogra när du pipetterar – små variationer påverkar analysen.

- 13 Använd en P20-flerkanalspipett inställd på halva den totala reaktionsvolymen (5 µl för en platta med 384 brunnar eller 10 µl för en platta med 96 brunnar), pipettera långsamt upp och ned tre gånger för att blanda.
- 14 Försegla plattan med en optiskt genomskinlig försegling. Var försiktig så att kortkontaminering och fläckar på förseglingens yta undviks.
- 15 Centrifugera plattan på 1 000 g vid 20 °C i 1 minut.
- 16 Kontrollera att det inte finns damm eller vätska på förseglingen och plattan, placera plattan i rätt riktning i qPCR-instrumentet och stäng sedan locket och kör följande termiska qPCR-profil (med ett uppvärmt lock):
 - ▶ 50 °C i 2 minuter
 - ▶ 95 °C i 10 minuter
 - ▶ 40 cykler i:
 - ▶ 95 °C i 30 sekunder
 - ▶ 57 °C i 30 sekunder
 - ▶ 72 °C i 30 sekunder
- 17 Bekräfta att instrumentet tar bilder efter 72 °C-steget i steg 16.
- 18 Räkna ut triplikatreaktionernas genomsnittliga Cq-värde för kontroll-DNA, NTC och varje prov. Behandla avvikande värden så som beskrivs i [Kvalitetskontrollprocedurer på sidan 7](#).
- 19 Subtrahera kontroll-DNA:ts genomsnittliga Cq-värde från varje provs genomsnittliga Cq-värde (provets genomsnittliga Cq-värde minus kontroll-DNA:ts genomsnittliga Cq-värde) för att få dCq-värdet för varje prov. Registrera dCq-värdena, alla replikat som undantagits och provets spädningsfaktorer. För prover med dCq ≤ -1,5 späder du provet 16 gånger och upprepar dCq-mätningen tills värdet är > -1,5. Vid biblioteksberedning med hjälp av TSCA Kit Dx följer du provspädningsanvisningarna för rätt grupp:
 - ▶ -1,5 < dCq ≤ -0,5, späd provet åtta gånger
 - ▶ -0,5 < dCq ≤ 0,5, späd provet fyra gånger
 - ▶ 0,5 < dCq ≤ 1,5, späd provet två gånger
 - ▶ 1,5 < dCq ≤ 4, använd ett prov som ej späts ut
 - ▶ dCq > 4, använd inte provet

SÄKER STOPPUNKT

dCq-värdena är giltiga i 28 dagar om DNA-proverna förvaras i 2 °C till 8 °C, och de är giltiga i 161 dagar om DNA-proverna förvaras i -25 °C till -15 °C.

Kvalitetskontrollprocedurer

- Ett kvalitetskontroll-DNA och en negativ kontroll (ingen mall) ingår i varje qPCR-kvalificeringskörning. Mallen för kvalitetskontroll-DNA används för att normalisera qPCR-data.
- Efter det sista steget analyserar qPCR-instrumentet kvantifierade prover. Om amplifiering av NTC sker högst tio cykler efter kvalitetskontroll-DNA:ts amplifiering är proverna troligen kontaminerade och testet måste upprepas.
- Kontrollera att kvalitetskontroll-DNA:t ger förväntade amplifieringskurvor. Amplifiering av kvalitetskontroll-DNA vid ett Cq på cirka 15–22 cykler. Exkludera replikat från en triplikatgrupp som skiljer sig från resten av gruppen med > 0,5 Cq.
- Exkludera replikat som uppvisar onormala amplifieringskurvor. Minst två av tre replikat ska ingå i det slutgiltiga beräkningsresultatet för ett enskilt prov eller så måste kvalificeringsprocessen upprepas för dessa prover.
- Om replikat har tagits bort från fyra eller fler prover per körning om tio prov upprepar du kvalificeringsprocessen för alla provena.

Prestandaegenskaper

I **Tabell 4** visas Cq-värden för gDNA vid 0,25 ng/μl från fem kommersiella leverantörer (B, C, P, R och T) eller som extraherats från ett helblodsprov. NIST-referensmaterial med samma koncentration visas för jämförelse. Cq-värdena kommer från tre oberoende operatörer och tre oberoende qPCR-plattformar (A, B och S). Resultatet visar den genomsnittliga standardavvikelsen (\pm). Instrument B visar en konsekvent Cq-ökning i förhållande till instrument A och S. Prover som normaliserats med kvalitetskontroll-DNA uppvisade enhetliga dCq-värden oavsett instrument (data visas ej).

Tabell 4 Cq-värden för kvalitetskontroll-DNA som fåtts från leverantörer eller extraherats från blod

qPCR-instrument	NIST man 2372	Leverantör B	Leverantör C	Leverantör P	Leverantör R	Leverantör T	Extraherat
Instrument A	18,87 +/- 0,07	19,14 +/- 0,14	18,79 +/- 0,13	19,11 +/- 0,17	19,07 +/- 0,12	19,03 +/- 0,17	18,78 +/- 0,07
Instrument B	20,47 +/- 0,09	20,75 +/- 0,12	20,43 +/- 0,12	20,71 +/- 0,19	20,71 +/- 0,06	20,69 +/- 0,15	20,46 +/- 0,09
Instrument S	19,06 +/- 0,10	19,39 +/- 0,13	18,99 +/- 0,14	19,29 +/- 0,16	19,31 +/- 0,10	19,24 +/- 0,15	19,08 +/- 0,16

Patent och varumärken

Dokumentet och dess innehåll tillhör Illumina, Inc. och dess dotterbolag ("Illumina") och är endast avsett för användning enligt avtal i samband med kundens bruk av produkterna som beskrivs häri. Allt annat bruk är förbjudet. Dokumentet och dess innehåll får ej användas eller distribueras i något annat syfte och/eller återges, delges eller reproduceras på något vis utan föregående skriftligt tillstånd från Illumina. I och med detta dokument överläter Illumina inte någon licens som hör till dess patent, varumärke eller upphovsrätt, eller i enlighet med rättspraxis eller liknande tredjepartsrättigheter.

Instruktionerna i detta dokument ska följas till punkt och pricka av kvalificerad och lämpligt utbildad personal för att säkerställa rätt och säker produktanvändning i enlighet med beskrivning häri. Hela innehållet i dokumentet ska läsas och förstås i sin helhet innan produkten (produkterna) används.

UNDERLÅTENHET ATT LÄSA OCH FÖLJA ALLA INSTRUKTIONER HÄRI I SIN HELHET KAN MEDFÖRA SKADA PÅ PRODUKTEN/PRODUKTERNA, PERSONSKADA, INKLUSIVE SKADA PÅ ANVÄNDAREN/ANVÄNDARNA ELLER ANDRA PERSONER SAMT SKADA PÅ ANNAN EGENDOM, OCH LEDER TILL ATT EVENTUELL GARANTI FÖR PRODUKTEN/PRODUKTERNA BLIR OGILTIG. ILLUMINA KAN INTE ÅLÄGGAS NÅGOT ANSVAR SOM UPPKOMMER GENOM FELAKTIG ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA SOM BESKRIVS HÄRI (INKLUSIVE DELAR DÄRI ELLER PROGRAM).

© 2021 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

Alla varumärken tillhör Illumina, Inc. eller respektive ägare. Specifik varumärkesinformation finns på www.illumina.com/company/legal.html.

AMPure, Beckman och Beckman Coulter är varumärken eller registrerade varumärken som tillhör Beckman Coulter, Inc.

Kontaktinformation



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (utanför Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Nederländerna

Australisk sponsor

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

Märkning av produkter

En fullständig lista över symbolerna på produktens förpackning och etiketter finns i symbolförklaringen på support.illumina.com, under fliken *Documentation and Literature* (Dokumentation och litteratur) för respektive produkt.