

Guía de referencia del ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx™

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

Introducción	3
Primeros pasos	7
Flujo de trabajo del ensayo	21
Preparación de la hoja de muestras de MiSeqDx	22
Hibridación de grupo de oligonucleótidos	26
Eliminación de oligonucleótidos sin ligar	30
Extensión-ligadura de oligonucleótidos ligados	35
Amplificación PCR	37
Limpieza de PCR	42
Normalización de bibliotecas	46
Agrupación de bibliotecas	51
Pasos siguientes	57
Asistencia técnica	

Este documento y su contenido son propiedad 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 ni similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, 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 AL PRODUCTO, LESIONES A LAS PERSONAS, INCLUIDOS LOS USUARIOS Y OTROS, Y DAÑOS A OTRA PROPIEDAD.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA QUE SURJA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE) NI DEL USO DE DICHOS PRODUCTOS FUERA DEL ÁMBITO DE LAS LICENCIAS EXPRESAS ESCRITAS O LOS PERMISOS OTORGADOS POR ILLUMINA EN CONEXIÓN CON LA ADQUISICIÓN DE DICHOS PRODUCTOS POR PARTE DE LOS CLIENTES.

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

© 2012-2014 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina y **MiSeqDx** son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Illumina, Inc. Todas las demás marcas y nombres mencionados en el presente documento pertenecen a sus respectivos propietarios.

AMPure, Beckman y Beckman Coulter son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de Beckman Coulter, Inc.

Introducción

Uso previsto

El Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina es un sistema de diagnóstico *in vitro* de secuenciación selectiva que secuencía de nuevo las regiones codificadoras de proteínas, y los límites de intrones y exones del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (*CFTR*) en el ADN genómico aislado de muestras de sangre humana total periférica recogidas en EDTA K₂. La prueba detecta variantes de nucleótido único, así como pequeñas inserciones y deleciones en la región secuenciada, e identifica, asimismo, dos mutaciones intrónicas profundas y dos deleciones de gran tamaño. La prueba está destinada para su uso en el instrumento MiSeqDx de Illumina.

La prueba se ha diseñado para utilizarla como ayuda en el diagnóstico de personas con síntomas de fibrosis quística. Este ensayo resulta más apropiado cuando el paciente presenta una fibrosis quística atípica o no clásica o cuando otros paneles de mutaciones no han podido identificar las mutaciones causantes. Los resultados de la prueba los debe interpretar un especialista en genética molecular clínica o equivalente certificado y se deben utilizar junto con otra información disponible como, por ejemplo, los síntomas clínicos, otras pruebas diagnósticas y el historial familiar.

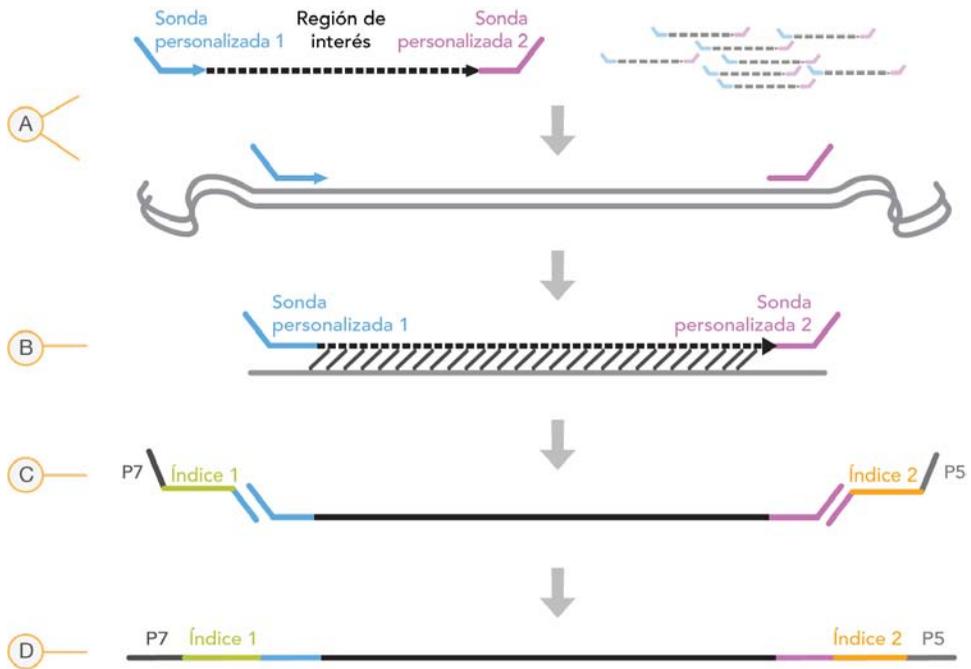
Esta prueba no está indicada para fines de diagnóstico independiente, pruebas diagnósticas de fetos, pruebas previas a implantaciones, el cribado de portadores, el cribado de recién nacidos o el cribado de la población.

Acerca de esta guía

Esta guía de referencia proporciona instrucciones más detalladas, sugerencias de técnicas y útiles consejos para usuarios que han recibido una formación reciente con el objeto de servirle de guía para una ejecución adecuada del protocolo del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx. Se ha concebido para servir de complemento y no con el fin de reemplazar a la información del prospecto.

¿Cómo funciona el ensayo?

Se ha diseñado un par de oligonucleótidos de fibrosis quística para cada amplicón de CFTR. La hibridación de estos oligonucleótidos en ADN genómico se produce en una placa de 96 pocillos, seguida de la extensión y la ligadura para formar las plantillas de ADN que se componen de las regiones de interés flanqueadas por secuencias del cebador universal. Con los cebadores indexados suministrados con el kit, las plantillas de ADN se amplifican mediante PCR, se agrupan en un solo tubo y se secuencian en el instrumento MiSeqDx.



- A Hibridación de sondas de oligonucleótidos personalizados
- B Extensión y ligadura
- C Adición de índices y adaptadores de secuenciación mediante PCR
- D Amplicón final listo para secuenciación con MiSeq

Descripción general del proceso

El proceso del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina se puede resumir en los siguientes pasos:

Creación de una hoja de muestras

En primer lugar, prepare una hoja de muestras, que utilizará MiSeqDx para identificar cada muestra y su correspondiente índice. Para preparar la hoja de muestras, utilice Gestor de la lista de trabajos de Illumina, una aplicación basada en asistente para el registro del ID de la muestra, los índices y otros parámetros aplicables a la placa de 96 pocillos. La hoja de muestras también se utiliza como guía para configurar la placa durante el flujo de trabajo del ensayo.

Preparación de bibliotecas

Prepare las bibliotecas con el protocolo que se detalla en esta guía del usuario.

Secuenciación de muestras en MiSeqDx

El Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx debe secuenciarse en un instrumento MiSeqDx con un experimento "paired-end" de 150 ciclos. Para obtener instrucciones sobre cómo realizar un experimento de secuenciación en MiSeqDx, consulte la *Guía de referencia del instrumento MiSeqDx (n.º de referencia 15038353_ESP)*.

Análisis de datos y secuenciación automatizados

MiSeq Reporter procesa las llamadas de bases que genera el instrumento MiSeqDx. Se trata de un software integrado en el instrumento, que se incorpora a los procesos del instrumento. MiSeq Reporter genera información sobre la alineación y las variantes estructurales. Para obtener más información sobre este software, consulte la *Guía del usuario de MiSeq Reporter (n.º de referencia 15038356_ESP)*.

Herramientas de seguimiento

Illumina proporciona las siguientes herramientas para la orientación y el seguimiento de muestras en el laboratorio:

- ▶ Se puede utilizar el **formulario de seguimiento de laboratorio** para registrar información como, por ejemplo, el nombre del operador, la información de la muestra y del índice, las horas de inicio y detención, los números de los lotes de reactivos, y los códigos de barras.
- ▶ **Gestor de la lista de trabajos de Illumina** se utiliza para crear la hoja de muestras mediante una aplicación basada en asistente. Gestor de la lista de trabajos de Illumina ofrece una función para el registro de parámetros de la placa de muestras, tales como el ID de la muestra, los índices dobles y otras características aplicables al experimento.



NOTA

Puede descargar los documentos del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina anteriores en el sitio web de Illumina en <http://support.illumina.com>. Vaya a la página de asistencia técnica de Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina y haga clic en la ficha **Documentation & Literature** (Documentación y literatura).

Primeros pasos

Esta sección describe el contenido del kit del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina, los consumibles y el equipo utilizados, las recomendaciones de entrada de ADN y las prácticas recomendadas que aplicar durante el protocolo.

Contenido del kit del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx

El kit del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina consta de los siguientes componentes. Almacene los componentes del kit a la temperatura especificada y en las áreas de preamplificación y posamplificación designadas.

Dado que los reactivos de preamplificación y los de posamplificación se suministran juntos, es importante que desembale los reactivos en el área del laboratorio de preamplificación y que, a continuación, traslade los reactivos de posamplificación al área de almacenamiento de posamplificación adecuado.

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, caja 1

Tabla 1 Reactivos de preamplificación de la caja 1A

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística	1 tubo	600 µl	Solución acuosa tamponada que contiene oligonucleótidos específicos para el gen <i>CFTR</i>	Entre -25 °C y -15 °C
Tampón de hibridación	1 tubo	4,32 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales y formamida	Entre -25 °C y -15 °C

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Mezcla de extensión-ligadura	1 tubo	4,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene una mezcla patentada de ADN polimerasas, ADN ligasa y dNTP	Entre -25 °C y -15 °C
Cebadores de índice C (A503), D (A504) y E (A505)	1 tubo por cebador	192 µl	Cebadores de PCR con secuencias de índice y adaptadores de secuenciación	Entre -25 °C y -15 °C
Cebadores de índice 1 (A701), 2 (A702) y 10 (A710)	1 tubo por cebador	128 µl	Cebadores de PCR con secuencias de índice y adaptadores de secuenciación	Entre -25 °C y -15 °C
Polimerasa de PCR	1 tubo	56 µl	ADN polimerasa patentada	Entre -25 °C y -15 °C
Mezcla maestra de PCR	1 tubo	2,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales y dNTP	Entre -25 °C y -15 °C

Tabla 2 Reactivos de posamplificación de la caja 1B

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Diluyente de normalización de bibliotecas	1 tubo	4,6 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales, 2-mercaptoetanol y formamida	Entre -25 °C y -15 °C
Tampón de dilución de biblioteca	1 tubo	4,5 ml	Solución acuosa tamponada	Entre -25 °C y -15 °C
Control interno PhiX	1 tubo	10 µl	Solución acuosa tamponada que contiene ADN genómico PhiX	Entre -25 °C y -15 °C

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, caja 2

Tabla 3 Reactivos de posamplificación de la caja 2

Componente	Cantidad	Contenido	Almacenamiento
Cartucho de MiSeqDx: Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística	6 cartuchos	Cartucho de un solo uso que contiene reactivos para la generación y secuenciación de grupos para su uso con MiSeqDx, incluidos formamida, 2-mercaptoetanol y DMSO <2 %	Entre -25 °C y -15 °C

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, caja 3

Tabla 4 Reactivos de preamplificación de la caja 3A

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de lavado restrictivo	1 botella	24 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales, 2-mercaptoetanol y formamida	Entre 2 °C y 8 °C
Tampón de lavado universal	1 tubo	4,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales	Entre 2 °C y 8 °C

Tabla 5 Reactivos de posamplificación de la caja 3B

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Bolas de limpieza de PCR	1 tubo	5 ml	Solución acuosa tamponada que contiene bolas paramagnéticas de fase sólida y polietilenglicol	Entre 2 °C y 8 °C

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Lavado de normalización de bibliotecas	2 tubos	4,8 ml	Solución acuosa tamponada que contiene sales, 2-mercaptoetanol y formamida	Entre 2 °C y 8 °C
Bolas de biblioteca	1 tubo	1,2 ml	Solución acuosa tamponada que contiene bolas paramagnéticas de fase sólida	Entre 2 °C y 8 °C
Celda de flujo de MiSeqDx: Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística	6 contenedores	1 celda de flujo	Sustrato de cristal con oligonucleótidos ligados de manera covalente	Entre 2 °C y 8 °C

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, caja 4

Tabla 6 Reactivos de posamplificación de la caja 4

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Solución SBS de MiSeqDx (PR2): Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística	6 botellas	353,1 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 2 °C y 8 °C

Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx, caja 5

Tabla 7 Reactivos de preamplificación de la caja 5

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Placa del filtro	6 placas	N/A	Placa de microtitulación de polipropileno con una membrana de polietersulfona modificada	Entre 15 °C y 30 °C

Tabla 8 Reactivos de posamplificación de la caja 5

Componente	Cantidad	Volumen de llenado	Principios activos	Almacenamiento
Tampón de elución	1 tubo	4,8 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C
Tampón de almacenamiento de biblioteca	1 tubo	3,5 ml	Solución acuosa tamponada	Entre 15 °C y 30 °C

Reactivos necesarios no suministrados

Reactivos de preamplificación

- ▶ NaOH 10 N (preparación a partir de comprimidos o uso de una solución estándar)
- ▶ Tampón TE
- ▶ Agua sin ARNasa ni ADNasa

Reactivos de posamplificación

- ▶ NaOH 10 N (preparación a partir de comprimidos o uso de una solución estándar)
- ▶ Etanol, 200 proof, para biología molecular
- ▶ Tampón TE
- ▶ Agua sin ARNasa ni ADNasa

Materiales y equipo

Materiales y equipo suministrados vendidos por separado

- 1 **Instrumento MiSeqDx**, n.º de catálogo DX-410-1001
- 2 **Kit TruSeq Index Plate Fixture**, n.º de catálogo FC-130-1005
- 3 **Kit TruSeq Index Plate Fixture & Collar**, n.º de catálogo FC-130-1007
- 4 **Tapones de recambio para el adaptador de índices**, n.º de catálogo DX-502-1003

Materiales y equipo necesarios no suministrados

Materiales y equipo de la preamplificación

- 1 **Bloque de calor:** Se precisa un bloque de calor para una placa de 96 pocillos. El bloque de calor debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes: Los bloques de calor con tapas calientes se pueden utilizar.
 - Rango de temperatura: Ambiente de 5 °C a 99 °C
 - Regulación de temperatura: $\pm 0,1$ °C a 37 °C; $\pm 0,4$ °C a 60 °C
- 2 **Incubadora de muestras:** Se precisa una incubadora (horno de hibridación). La incubadora debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - Rango de temperatura: Entre 10 °C y 100 °C
 - Regulación de temperatura: $\pm 0,2$ °C
- 3 **Centrifugadora de sobremesa:** Se precisa una centrifugadora de sobremesa que pueda mantener 20 °C. (Se precisa una centrifugadora independiente en el área de posamplificación). Se admite cualquier centrifugadora de placas que alcance las velocidades indicadas del protocolo (de 280 a 2400 x g).
- 4 **Pipetas de precisión:** Se precisa un conjunto de pipetas de precisión. (Se precisa un conjunto independiente en el área de posamplificación). Se precisa el uso de pipetas de precisión para garantizar la administración precisa de reactivo y muestra. Se pueden utilizar pipetas de un solo canal o multicanal si se calibran con frecuencia y ofrecen precisión del 5 % del volumen indicado.

- 5 **Consumibles:** Se precisan los consumibles siguientes.
 - Placas de PCR con faldones de 96 pocillos de 0,2 ml de polipropileno o equivalente
NOTA: Asegúrese de que la placa de 96 pocillos sea compatible con el soporte magnético.
 - Placas de almacenamiento de 96 pocillos de 0,8 ml (placas MIDI)
 - Recipiente de solución de PVC sin ADNasa ni ARNasa (cubeta)
 - Sello de película de aluminio adhesiva
 - Sello para placas de PCR adecuado
 - Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles

Materiales y equipo de la posamplificación

- 1 **Ciclador térmico:** Se precisa un ciclador térmico. El ciclador térmico debe tener una tapa caliente y cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - Rango de control de temperatura: Entre 4 °C y 99 °C
 - Precisión de control: $\pm 0,25$ °C de 35 °C a 99 °C
- 2 **Agitador de microplacas:** Se precisa un agitador de microplacas en el área de posamplificación del laboratorio. El agitador de placas debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - Velocidad de mezcla máx.: 3000 rpm
 - Rango de velocidad de mezcla: De 200 a 3000 rpm
- 3 **Centrifugadora de sobremesa:** Se precisa una centrifugadora de sobremesa que pueda mantener 20 °C. (Se precisa una centrifugadora independiente en el área de preamplificación). Se admite cualquier centrifugadora de placas que alcance las velocidades indicadas del protocolo (de 280 a 2400 x g).
- 4 **Bloque de calor:** Se precisa un bloque de calor para tubos. El bloque de calor debe cumplir con las especificaciones de rendimiento siguientes:
 - Rango de temperatura: Ambiente de 5 °C a 99 °C
 - Regulación de temperatura: $\pm 0,1$ °C a 37 °C; $\pm 0,4$ °C a 60 °C
- 5 **Soporte magnético:** Se precisa un soporte magnético para una placa de 96 pocillos. Se obtiene un mejor resultado cuando los imanes se encuentran en un lado del soporte y no en la parte inferior.

- 6 **Pipetas de precisión:** Se precisa un conjunto de pipetas de precisión. (Se precisa un conjunto independiente en el área de preamplificación). Se precisa el uso de pipetas de precisión para garantizar la administración precisa de reactivo y muestra. Se pueden utilizar pipetas de un solo canal o multicanal si se calibran con frecuencia y ofrecen precisión del 5 % del volumen indicado.
- 7 **Consumibles:** Se precisan los consumibles siguientes.
 - Placas de PCR con faldones de 96 pocillos de 0,2 ml de polipropileno o equivalente
 - Placas de almacenamiento de 96 pocillos de 0,8 ml (placas MIDI)
NOTA: Asegúrese de que la placa de 96 pocillos sea compatible con el soporte magnético.
 - Tubos cónicos de 15 ml
 - Tubos de microcentrífuga Eppendorf (recomendados con cierre de rosca)
 - Gradillas de ocho tubos de PCR
 - Recipientes de solución de PVC sin ADNasa ni ARNasa (cubeta)
 - Sellos de película de aluminio adhesiva
 - Sellos adhesivos para placas
 - Puntas de pipeta resistentes a los aerosoles

Prevención de contaminación de productos de PCR

El proceso de PCR se suele utilizar en el laboratorio para amplificar secuencias de ADN específicas. A menos que se siga una higiene de laboratorio adecuada, los productos de PCR pueden contaminar los reactivos, los instrumentos y las muestras de ADN genómico, lo que se traduce en unos resultados imprecisos y poco fiables. La contaminación de productos de PCR puede detener los procesos de laboratorio y retrasar de forma significativa las operaciones normales.

Asegúrese de que el laboratorio esté convenientemente preparado para reducir el riesgo de contaminación de productos de PCR:

- ▶ **Separación física de áreas de preamplificación y posamplificación**
 - Separe físicamente el espacio del laboratorio en el que se realizan los procesos de preamplificación (extracción, cuantificación y normalización de ADN) del espacio del laboratorio en el que se realizan los procesos de posamplificación.
 - No utilice nunca el mismo fregadero para limpiar las cubetas de preamplificación y de posamplificación.

- No utilice nunca el mismo sistema de purificación de agua en los procesos de preamplificación y posamplificación.
- Almacene todos los suministros utilizados en los protocolos del área de preamplificación y transféralos al área de posamplificación, según resulte necesario.
- ▶ **Equipo y suministros específicos**
 - Utilice conjuntos completos e independientes de equipos y suministros (pipetas, centrifugadoras, hornos, bloques de calor, etc.) en los procesos de laboratorio de preamplificación y posamplificación, y no los intercambie nunca entre procesos.
 - Emplee áreas de almacenamiento independientes (congeladores y frigoríficos) para consumibles de preamplificación y de posamplificación.

Dado que los reactivos de preamplificación y los de posamplificación se suministran juntos, es importante que los desembale en el área del laboratorio de preamplificación, y que, a continuación, traslade los reactivos de posamplificación al área de almacenamiento de posamplificación adecuado.

Procedimientos de laboratorio de preamplificación y posamplificación

Para evitar la contaminación de productos de PCR, resulta importante establecer los procedimientos de laboratorio y seguir las prácticas recomendadas. Ilumina recomienda realizar una limpieza diaria y semanal de las áreas de laboratorio con hipocloruro sódico al 0,5 % (lejía al 10 %).



PRECAUCIÓN

Para evitar la degradación de las muestras o los reactivos, asegúrese de que se hayan disipado por completo todos los vapores de la solución de limpieza antes de comenzar cualquier proceso.

Limpieza diaria del área de preamplificación

Una limpieza diaria del área de preamplificación con una solución de hipocloruro sódico al 0,5 % (lejía al 10 %) ayuda a eliminar producto de PCR que se ha introducido en el área de preamplificación.

Identifique las áreas de preamplificación que constituyan el mayor riesgo de contaminación y límpielas con una solución de hipocloruro sódico al 0,5 % (lejía al 10 %) antes de comenzar cualquier proceso de preamplificación. Las áreas de alto riesgo pueden ser, entre otros, los siguientes componentes:

- ▶ Partes superiores de las mesas
- ▶ Mangos de puertas
- ▶ Mangos de las puertas de los refrigeradores o los congeladores
- ▶ Ratón del ordenador
- ▶ Teclados

Limpieza diaria del área de posamplificación

Si se reduce la cantidad de producto de PCR en el área de posamplificación, se contribuye a reducir el riesgo de contaminación en el área de preamplificación. La limpieza diaria del área de posamplificación con una solución de hipocloruro sódico al 0,5 % (lejía al 10 %) ayuda a lograrlo.

Identifique las áreas de posamplificación que constituyan el mayor riesgo de contaminación y límpielas con una solución de hipocloruro sódico al 0,5 % (lejía al 10 %) todos los días. Las áreas de alto riesgo pueden ser, entre otros, los siguientes componentes:

- ▶ Cicladores térmicos
- ▶ Espacio de la mesa utilizado para procesar ADN amplificado
- ▶ Mangos de puertas
- ▶ Mangos de las puertas de los refrigeradores o los congeladores
- ▶ Ratón del ordenador
- ▶ Teclados

Limpieza semanal de todas las áreas del laboratorio

Una vez a la semana, realice una limpieza profunda de las áreas de preamplificación y posamplificación con una solución de hipocloruro sódico al 0,5 % (lejía al 10 %).

- ▶ Limpie todas las partes superiores de las mesas y las superficies del laboratorio.
- ▶ Limpie todos los instrumentos que no se limpien diariamente.
- ▶ Limpie bien el suelo del laboratorio.
- ▶ Asegúrese de haber formado correctamente al personal responsable de la limpieza semanal sobre la prevención de la contaminación de productos de PCR.

Elementos que caen al suelo

El suelo está contaminado con producto de PCR que se transfiere a los zapatos de las personas que proceden del área de posamplificación; por lo tanto, cualquier elemento

que caiga al suelo debe tratarse como un objeto contaminado.

- ▶ Los elementos desechables que se han caído al suelo, tales como tubos vacíos, puntas de pipetas, guantes y perchas de batas de laboratorio, deben desecharse.
- ▶ Los artículos no desechables que se caigan al suelo, como las pipetas o un contenedor de muestras importante, deben limpiarse concienzudamente de manera inmediata con una solución de hipocloruro sódico al 0,5 % (lejía al 10 %) para evitar la contaminación de productos de PCR.
- ▶ Limpie cualquier superficie del laboratorio que haya entrado en contacto con el elemento contaminado. Las personas que manipulen cualquier objeto, desechable o no, que haya caído al suelo siempre deberán desechar los guantes que estén utilizando y utilizar unos nuevos.

Precauciones

Siga estas recomendaciones a la hora de preparar bibliotecas para la secuenciación con este protocolo.

Garantía de la homogeneidad

- ▶ **Utilice pipetas multicanal:** Para garantizar la homogeneidad entre las muestras, utilice una pipeta multicanal siempre que sea posible. Calibre las pipetas con regularidad.
- ▶ **Coherencia para preparaciones de muestras de menor tamaño:** Cada tubo de reactivo que se suministra con el kit contiene volumen suficiente para generar resultados utilizando pipetas manuales y cubetas de reactivos conforme a las técnicas de laboratorio estándar. Para garantizar la administración del volumen de reactivo pertinente, pipetee un único reactivo en cada pocillo o pipetee con una pipeta multicanal en una gradilla de ocho tubos de PCR.

Manipulación de bolas magnéticas

- ▶ **Utilice a temperatura ambiente:** Deje que las bolas alcancen la temperatura ambiente antes de su utilización.
- ▶ **Agite hasta que esté bien suspendido:** Inmediatamente antes de su uso, agite las bolas hasta que estén bien suspendidas y el color sea homogéneo.
- ▶ **Mezcle las muestras completamente:** Después de añadir las bolas a las muestras, mezcle pipeteando arriba y abajo diez veces. Ilumina también recomienda utilizar un agitador para mezclar bien las muestras.

- ▶ **Permita la máxima ligadura:** Para obtener unos resultados óptimos, incube las mezclas de bolas/muestras a temperatura ambiente durante todo el período que se indique en el protocolo.
- ▶ **Aspire lentamente la solución aclarada:** Después de colocar la placa en el soporte magnético, espere a que la solución se aclare antes de continuar. Mantenga la placa en el soporte magnético cuando aspire lentamente la solución aclarada y evite alterar las bolas apartadas.

Procedimientos para evitar la contaminación cruzada

- ▶ **Cambie las puntas entre las dispensaciones de reactivos y muestras:** Utilice siempre puntas de pipetas nuevas entre las dispensaciones de reactivos y de muestras.
- ▶ **Mezcle las placas según se indique:** Mezcle las muestras con una pipeta multicanal y centrifugue la placa cuando se indique. No agite las placas.
- ▶ **Utilice puntas resistentes a los aerosoles:** Al utilizar puntas resistentes a los aerosoles se reduce el riesgo de contaminación cruzada entre muestras y de restos de amplicones.

Lavado con etanol al 80 % durante el paso de limpieza de PCR

- ▶ **Prepare etanol nuevo al 80 %:** Prepare siempre etanol nuevo al 80 % para los pasos de lavado. El etanol puede absorber agua del aire y afectar a los resultados.
- ▶ **Retire todo el etanol de los pocillos:** Asegúrese de extraer todo el etanol del fondo de los pocillos, ya que pueden contener contaminantes residuales. Utilice una pipeta multicanal P20 para retirar el etanol residual y acelerar el secado.
- ▶ **Permita una evaporación completa:** Emplee al menos cinco minutos para el secado fuera del soporte magnético a temperatura ambiente para una evaporación completa. Los restos de etanol pueden afectar al rendimiento de las reacciones posteriores.

Requisitos de entrada de ADN

- ▶ El protocolo Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina requiere 250 ng de ADN genómico. Illumina recomienda encarecidamente la cuantificación del material genómico de inicio.

- ▶ **Cuantificación de ADN de entrada:** Cuantifique el material genómico de inicio con ayuda de métodos de espectrometría UV basados en lecturas de densidad óptica A260/A280.
- ▶ **Valoración de calidad de ADN:** Las mediciones de absorbancia a 260 nm se suelen utilizar para cuantificar el ADN. El índice de absorbancia entre 260 nm y 280 nm se utiliza como indicador de la pureza de una muestra. Este protocolo está optimizado para un ADN con unos valores de índice de absorbancia superiores a 1,5.

Controles de calidad

- ▶ Las prácticas recomendadas de laboratorio indican que se incluya una muestra de ADN de control positivo y una muestra de control negativo (sin plantilla) en cada experimento.
- ▶ La muestra de ADN de control positivo debe contar con unas características bien definidas y con una mutación del gen CFTR conocida.
- ▶ Illumina también recomienda incluir un control salvaje en cada experimento.

Acrónimos

Tabla 9 Acrónimos del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina

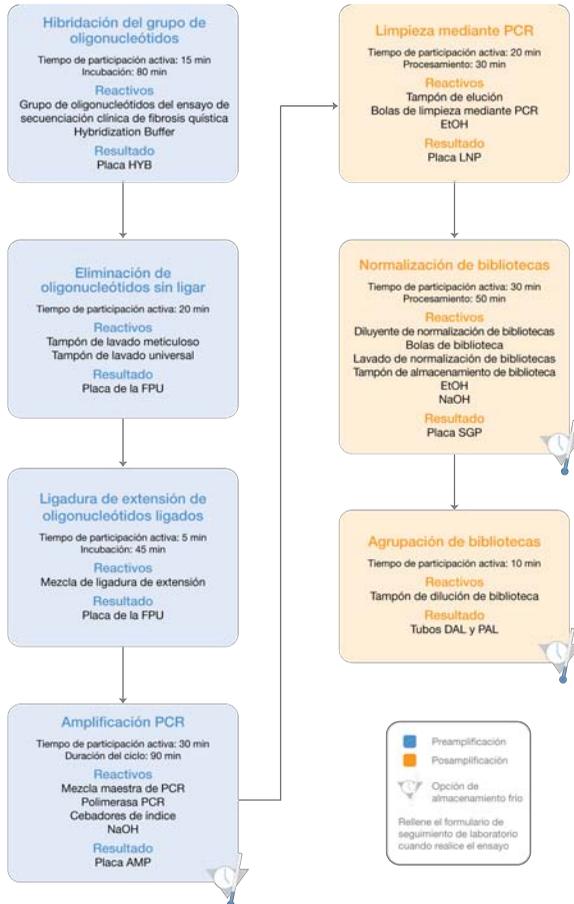
Acrónimo	Definición
AMP	Placa de amplificación
CLP	Placa de limpieza
DAL	Biblioteca de amplicones diluida
FPU	Unidad de la placa del filtro
HYB	Placa de hibridación
LNP	Placa de normalización de bibliotecas
NTC	Control de plantilla negativo

Acónimo	Definición
PAL	Biblioteca de amplicones agrupados
POS	Control positivo
SGP	Placa de almacenamiento

Flujo de trabajo del ensayo

En el siguiente diagrama se muestra el flujo de trabajo del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina. Los puntos de detención segura se marcan entre los pasos.

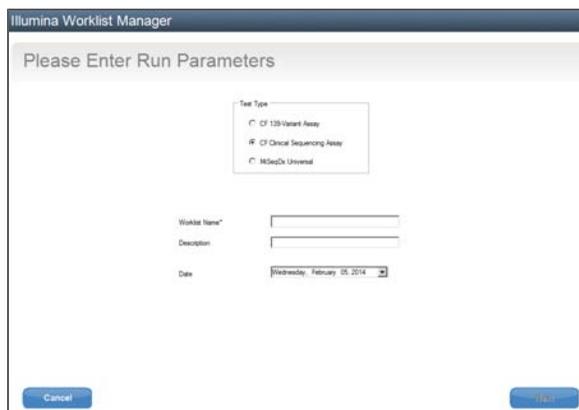
Figura 1 Flujo de trabajo del Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina



Preparación de la hoja de muestras de MiSeqDx

- 1 En la pantalla Welcome (Bienvenida) del Gestor de la lista de trabajos de Illumina (IWM), seleccione **Create Worklist** (Crear lista de trabajo). Se abre la pantalla Enter Run Parameters (Introducir parámetros del experimento).

Figura 2 Pantalla Enter Run Parameters (Introducir parámetros del experimento) del Gestor de la lista de trabajos de Illumina



The screenshot shows a window titled "Illumina Worklist Manager" with a subtitle "Please Enter Run Parameters". Inside the window, there is a "Test Type" section with three radio button options: "CF 150-Vialset Assay", "CF Clinical Sequencing Assay" (which is selected), and "MiSeqDx Universal". Below this, there are three input fields: "Worklist Name*", "Description", and "Date". The "Date" field is set to "Wednesday, February 05, 2014". At the bottom of the window, there are two buttons: "Cancel" on the left and "OK" on the right.

- 2 En el campo Test Type (Tipo de prueba), seleccione **Ensayo de secuenciación clínica de FQ**.
- 3 En el campo Worklist Name (Nombre de la lista de trabajo), introduzca un nombre para la hoja de muestras. Este campo es obligatorio.
 - Si se usa el ID alfanumérico del código de barras del cartucho de reactivo para el nombre de la hoja de muestras, Software operativo de MiSeq (MOS) encontrará la hoja de muestras automáticamente. El ID del código de barras se encuentra en la etiqueta del cartucho de reactivo, justo debajo del código de barras.
 - Si se asigna otro nombre a la hoja de muestras, se puede usar el botón **Browse** (Examinar) de Software operativo de MiSeq (MOS) para localizar la hoja de muestras correspondiente.
- 4 **[Opcional]** Escriba una descripción para identificar el experimento.

- 5 Asegúrese de que la fecha coincida con la fecha de inicio del experimento. La fecha actual se muestra de forma predeterminada.
- 6 Seleccione **Next** (Siguiete). Se abre la pantalla Enter Sample Information (Introducir información de muestras).

Figura 3 Pantalla Enter Sample Information (Introducir información de muestras) del Gestor de la lista de trabajos de Illumina

Sample ID	Sample Name	Index 1 (I1)	Index 2 (I2)	Control	Description
A01		A701	A503		
A02		A701	A504		
A03		A701	A505		
A04		A702	A503		
A05		A702	A504		
A06		A702	A505		
A07		A710	A503		
A08		A710	A504		

Introducción de información de la muestra

- 1 En la ficha Table (Tabla) o Plate (Placa), introduzca la siguiente información de cada pocillo de muestra:
 - a **Sample ID** (ID de muestra): Introduzca un ID de muestra único. El ID de muestra se utiliza para realizar el seguimiento de la muestra desde la preparación hasta la secuenciación y el análisis. Aunque el ID suele ser un código de barras, se acepta cualquier valor.
 - b **Index 1 (Índice 1) e Index 2 (Índice 2)**: Especifique el adaptador de índices que se utilizará para cada lectura del índice. Illumina recomienda utilizar combinaciones que den como resultado, al menos, una base A o C (rojo) y, al menos, una base G o T (verde) en cada ciclo.

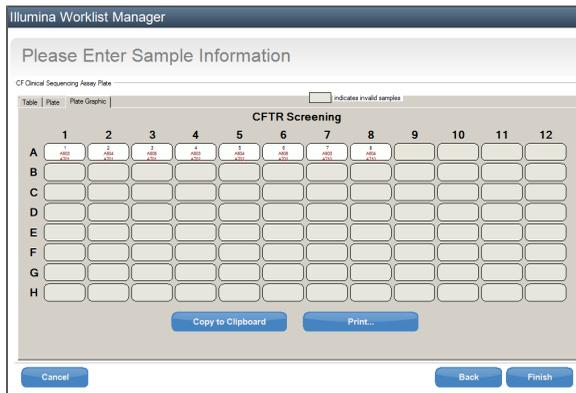


NOTA

Consulte *Producción de muestras y representación de índices* en la página 24 para obtener ayuda a la hora de elegir los índices apropiados.

- 2 [Opcional] Para registrar información más detallada sobre las muestras, introduzca un nombre y una descripción de la muestra.
- 3 [Opcional] Para identificar controles en la placa, seleccione Negative (Negativo) o Positive (Positivo) en el menú desplegable **Control** (Control).
- 4 Vaya a la ficha Plate Graphic (Gráfico de placa) y utilice la opción **Copy to Clipboard** (Copiar al portapapeles) o **Print** (Imprimir) para capturar una imagen de la placa de muestras.

Figura 4 Ficha Plate Graphic (Gráfico de placa) del Gestor de la lista de trabajos de Illumina



- 5 Seleccione **Finish** (Finalizar).

Producción de muestras y representación de índices

Para el Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística MiSeqDx de Illumina, la producción de muestras por experimento de MiSeqDx es de ocho muestras. Los cebadores de índice utilizados durante la amplificación PCR se deben elegir en función del rendimiento final de muestras que se desee con el fin de garantizar la diversidad de la secuencia de índice.

MiSeqDx utiliza un LED verde para secuenciar bases G/T y un LED rojo para secuenciar bases A/C. En cada ciclo, se debe leer, al menos, uno de los dos nucleótidos de cada canal de color para garantizar un registro adecuado. Resulta importante mantener el equilibrio de colores de cada base de la lectura de índice que es objeto de secuenciación, ya que, de lo contrario, se podría producir un error de registro durante la secuenciación de la lectura del índice.

Utilice el siguiente conjunto mínimo de índices con equilibrio de color para los experimentos de secuenciación de ocho muestras:

Tabla 10 Combinaciones de cebadores de índice para experimentos de secuenciación de ocho muestras

	Cebador de índice 1 (A701)	Cebador de índice 2 (A702)	Cebador de índice 10 (A710)
Cebador de índice C (A503)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Cebador de índice D (A504)	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
Cebador de índice E (A505)	Muestra 7	Muestra 8	--

Si no se dispone de seis muestras únicas (excluidos los controles positivos y negativos), es aceptable llenar el experimento con duplicados de cualquier muestra de ADN genómico humano.

Hibridación de grupo de oligonucleótidos

Durante este paso, el grupo de oligonucleótidos de la fibrosis quística que contiene oligonucleótidos ascendentes y descendentes específicos del gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) se hibrida en muestras de ADN genómico.



ADVERTENCIA

Este conjunto de reactivos contiene formamida, una amida alifática que es una toxina reproductiva probable. Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse lesiones. Deseche los contenedores y los contenidos no utilizados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad de este kit en support.illumina.com/sds.ilmn.

Tiempo estimado

- ▶ Duración total: 1 hora 35 minutos
- ▶ Tiempo de participación activa: 15 minutos

Consumibles

Artículo	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística	1 tubo	Entre -25 °C y -15 °C	Illumina
Tampón de hibridación	1 tubo	Entre -25 °C y -15 °C	Illumina
ADN genómico (se recomienda 50 ng/μl)	5 μl	Entre -25 °C y -15 °C	Usuario
Placa de PCR con faldones de 96 pocillos	1 placa	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Artículo	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Sello de película de aluminio adhesiva	2 juntas	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Cubetas estériles	Según sea necesario	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- 1 Retire el Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística, el Tampón de hibridación, las muestras de ADN genómico y la muestra de control positivo de su almacenamiento a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C y descongélelos a temperatura ambiente.
- 2 Agite el Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística y el Tampón de hibridación con fuerza para asegurarse de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo y, a continuación, centrifugue brevemente los tubos para recoger el líquido.



NOTA

Antes de utilizar el Tampón de hibridación, sujete el tubo delante de una luz e inspecciónelo visualmente para asegurarse de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo.

- 3 Caliente un bloque de calor de 96 pocillos a 95 °C.
- 4 Precaliente una incubadora a 37 °C para prepararse para el paso de extensión-ligadura.
- 5 Cree la placa de muestras de acuerdo con el gráfico de placa impreso con el IWM. Verifique la ubicación de las coincidencias de controles positivos y negativos. Ilumina recomienda procesar las muestras en lotes no inferiores a ocho.



NOTA

El uso de controles permite al servicio de asistencia técnica de Illumina proporcionar una asistencia eficaz para la solución de problemas. El servicio de asistencia técnica de Illumina no proporcionará asistencia a menos que estas reacciones de control estuvieran incluidas en el análisis.

Procedimiento

- 1 Asigne la etiqueta "**HYB_Plate_ID**" (HYB_Placa_ID) a una nueva placa de PCR de 96 pocillos.
- 2 Añada 5 µl de muestra o control a 50 ng/µl (250 ng total) en los pocillos correspondientes de la placa **HYB**. Siga la disposición de placas generada para una selección correcta de los pocillos.



NOTA

Verifique que la disposición de muestras de ADN y las posiciones de controles positivos y negativos coincidan con el gráfico de la placa.

- 3 Con una pipeta multicanal, añada 5 µl de Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística en todos los pocillos que contienen ADN genómico. Cambie las puntas después de cada columna para evitar la contaminación cruzada.
- 4 Con una pipeta multicanal, añada 40 µl de Tampón de hibridación en cada muestra de la placa **HYB**. Pipetee con cuidado arriba y abajo entre tres y cinco veces para mezclar. Cambie las puntas después de cada columna para evitar la contaminación cruzada.



NOTA

Asegúrese de que se hayan disuelto todos los cristales y precipitados en el Tampón de hibridación.



NOTA

No mezcle Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística y Tampón de hibridación para el almacenamiento. Al combinarse, Grupo de oligonucleótidos del ensayo de secuenciación clínica de fibrosis quística se vuelve inestable incluso si se almacena congelado.

- 5 Selle la placa **HYB** con una película de aluminio adhesiva y asegure la junta con un rodillo de goma o una cuña de sellado.
- 6 Centrifugue a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 7 Coloque la placa **HYB** en el bloque precalentado a 95 °C e incúbela durante un minuto.

- 8 Reduzca la temperatura del bloque precalentado a 40 °C y sígalo incubando hasta que el bloque de calor alcance los 40 °C. El tiempo de reducción es de unos 80 minutos.

**NOTA**

Durante la incubación, la temperatura del bloque de calor desciende gradualmente de 95 °C a 40 °C. Ese proceso suele demorarse unos 80 minutos. Esta refrigeración gradual es fundamental para una correcta hibridación; por lo tanto, no se recomiendan los cicladores térmicos para PCR con refrigeración activa (por ejemplo, efecto Peltier o refrigeración termoeléctrica) para este proceso.

**PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD**

Cuando el bloque de calor alcanza 40 °C, la placa **HYB** permanece estable a 40 °C durante dos horas.

Eliminación de oligonucleótidos sin ligar

Este proceso elimina oligonucleótidos sin ligar del ADN genómico con un filtro con capacidad de selección de tamaño. Dos pasos de lavado con el Tampón de lavado restrictivo garantizan una eliminación completa de los oligonucleótidos sin ligar. Un tercer paso de lavado con el Tampón de lavado universal elimina el Tampón de lavado restrictivo residual y prepara las muestras para el paso de extensión-ligadura.



ADVERTENCIA

Este conjunto de reactivos contiene formamida, una amida alifática que es una toxina reproductiva probable. Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse lesiones. Deseche los contenedores y los contenidos no utilizados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona.

Para obtener más información, consulte las hojas de datos de seguridad de este kit en support.illumina.com/sds.ilmn.

Tiempo estimado

- ▶ Duración total: 20 minutos
- ▶ Tiempo de participación activa: 20 minutos

Consumibles

Artículo	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Mezcla de extensión-ligadura	1 tubo	Entre -25 °C y -15 °C	Illumina
Tampón de lavado restrictivo	1 botella	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina
Tampón de lavado universal	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illumina
Placa del filtro	1 placa	Entre 15 °C y 30 °C	Illumina

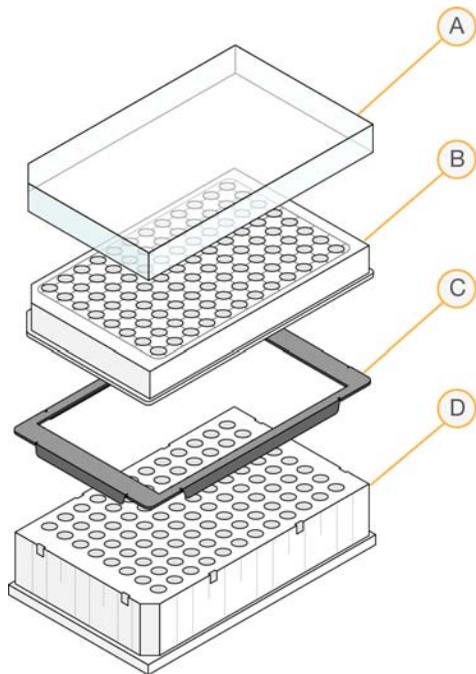
Artículo	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Collar adaptador	1 placa	Entre 15 °C y 30 °C	Ilumina
Placa MIDI	1 placa	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Cubetas	Según sea necesario	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- 1 Retire la Mezcla de extensión-ligadura de su almacenamiento a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C y descongele a temperatura ambiente. Mezcla de extensión-ligadura se utiliza en el paso de extensión-ligadura y tarda, aproximadamente, 20 minutos en descongelarse.
- 2 Retire el Tampón de lavado restrictivo y el Tampón de lavado universal de su almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y resérvelos a temperatura ambiente.

- 3 Monte el conjunto de la unidad de la placa del filtro (**FPU**) en el orden siguiente (desde la parte superior hasta la parte inferior):

Figura 5 Conjunto de la unidad de la placa del filtro



- A Tapa
- B Placa del filtro
- C Collar adaptador
- D Placa MIDI

- 4 Asigne la etiqueta "**FPU_Plate_ID**" (FPU_Placa_ID) a la placa del filtro. El ID de la placa debe coincidir con el ID utilizado para la placa **HYB**.
- 5 Realice un lavado previo a la membrana de la placa del filtro como se indica a continuación:
 - a Con una pipeta multicanal, añada 45 μ l de Tampón de lavado restrictivo en cada pocillo.
 - b Cubra la placa **FPU** con la tapa de la placa del filtro y déjela cubierta durante cada paso del centrifugado.

- c Centrifugue la **FPU** a $2400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco minutos.

Procedimiento

- 1 Al finalizar la hibridación, confirme que el bloque de calor se haya enfriado hasta los $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mientras la placa **HYB** todavía está en el bloque de calor, refuerce el sello con un rodillo de goma o una cuña de sellado. Si no se alcanzan los $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 80 minutos, siga con la incubación hasta que el bloque de calor se haya enfriado hasta los $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 2 Retire la placa **HYB** del bloque de calor y centrifugue a $1000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un minuto para recoger la condensación.
- 3 Con una pipeta multicanal con configuración de pipeteo a $60\text{ }\mu\text{l}$, transfiera el volumen íntegro de cada muestra al centro de los pocillos de prelavado correspondientes de la placa del filtro. Cambie las puntas después de cada columna para evitar la contaminación cruzada.
- 4 Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a $2400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco minutos.
- 5 Lave la placa del filtro como se indica a continuación:
 - a Con una pipeta multicanal, añada $45\text{ }\mu\text{l}$ de Tampón de lavado restrictivo en cada pocillo de muestra.
Si tiene cuidado de evitar la contaminación cruzada, no es necesario cambiar las puntas entre columnas.
 - b Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a $2400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco minutos.
- 6 Repita el lavado como se indica a continuación:
 - a Con una pipeta multicanal, añada $45\text{ }\mu\text{l}$ de Tampón de lavado restrictivo en cada pocillo de muestra.
Si tiene cuidado de evitar la contaminación cruzada, no es necesario cambiar las puntas entre columnas.
 - b Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a $2400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco minutos.
 - c Si el tampón de lavado no se drena completamente, vuelva a centrifugar la placa del filtro a $2400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante cinco minutos.

- 7 Deseche todo el flujo (que contiene formamida) recogido hasta este punto en un contenedor de residuos peligrosos adecuado y, a continuación, vuelva a montar la **FPU**. Se puede volver a utilizar la misma placa MIDI para el resto del proceso de preamplificación.
- 8 Con una pipeta multicanal, añada 45 μ l de Tampón de lavado universal en cada pocillo de muestra.
Si tiene cuidado de evitar la contaminación cruzada, no es necesario cambiar las puntas entre columnas.
- 9 Cubra la placa del filtro con la tapa y centrifugue a $2400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante diez minutos.



NOTA

Asegúrese de que se haya drenado todo el líquido tras el centrifugado. Repita el centrifugado en caso necesario. El tampón de lavado residual puede inhibir las reacciones enzimáticas posteriores.

Extensión-ligadura de oligonucleótidos ligados

Este proceso conecta los oligonucleótidos ascendentes y descendentes hibridados. Una ADN polimerasa se extiende desde el oligonucleótido ascendente hasta la región objetivo. Después se produce la ligadura al extremo 5' del oligonucleótido descendente mediante una ADN ligasa. Esto conlleva la formación de productos que contienen las regiones de interés objetivo flanqueadas por las secuencias necesarias para la amplificación.

Tiempo estimado

- ▶ Duración total: 50 minutos
- ▶ Tiempo de participación activa: 5 minutos

Consumibles

Artículo	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Mezcla de extensión-ligadura	1 tubo	Entre -25 °C y -15 °C	Illustra
Sello de película de aluminio adhesiva	1 sello	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Cubetas	Según sea necesario	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Procedimiento

- 1 Con una pipeta multicanal, añada 45 µl de Mezcla de extensión-ligadura en cada pocillo de muestra de la placa del filtro. La reacción de extensión-ligadura se produce en la membrana de la placa del filtro.
Si tiene cuidado de evitar la contaminación cruzada, no es necesario cambiar las puntas entre columnas.

- 2 Selle la placa del filtro con película de aluminio adhesiva y, a continuación, cúbrala con la tapa para asegurar la película durante la incubación.
- 3 Incube todo el conjunto de la **FPU** en la incubadora precalentada a 37 °C durante 45 minutos.
- 4 Mientras la placa de la **FPU** se incuba, prepare la placa AMP tal y como se describe en la sección siguiente.

Amplificación PCR

En este paso, los productos de extensión-ligadura se amplifican con cebadores que añaden secuencias de índice para el multiplexado de muestras, así como los adaptadores comunes necesarios para la generación de grupos.

Tiempo estimado

- ▶ Duración total: Aproximadamente 90 minutos
- ▶ Tiempo de participación activa: 30 minutos

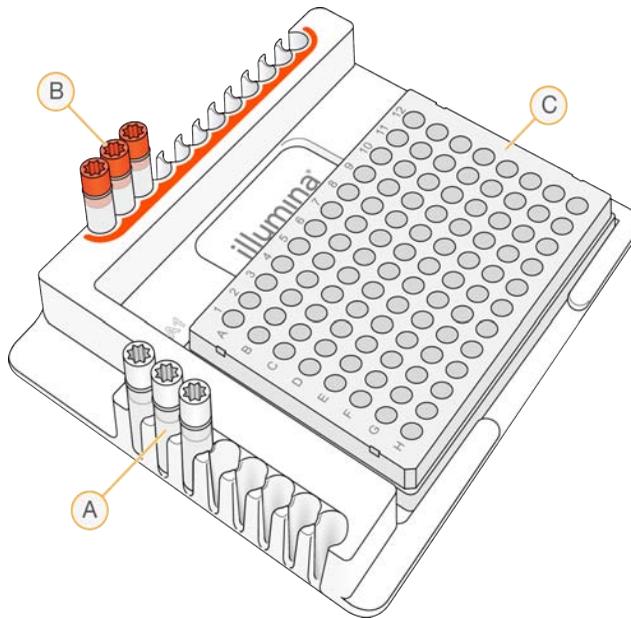
Consumibles

Artículo	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Mezcla maestra de PCR	1 tubo	Entre -25 °C y -15 °C	Illumina
Cebadores de índice C (A503), D (A504) y E (A505)	1 tubo por cebador	Entre -25 °C y -15 °C	Illumina
Cebadores de índice 1 (A701), 2 (A702) y 10 (A710)	1 tubo por cebador	Entre -25 °C y -15 °C	Illumina
Polimerasa de PCR	1 tubo	Entre -25 °C y -15 °C	Illumina
Sello para placas de PCR adecuado	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
NaOH 0,05 N, recién preparado	Según sea necesario	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placa de PCR con faldones de 96 pocillos	1 placa	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Cubetas	Según sea necesario	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación

- 1 Prepare NaOH 0,05 N nuevo añadiendo 25 μl de NaOH 10 N a 4975 μl de agua estéril.
- 2 Determine los cebadores de índice que se deben utilizar de acuerdo con la impresión del gráfico de la placa de Gestor de la lista de trabajos de Illumina.
- 3 Retire la Mezcla maestra de PCR y los cebadores de índice adecuados de su almacenamiento a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, y descongélelos en una mesa a temperatura ambiente.
Espere unos 20 minutos hasta que los reactivos se descongelen.
- 4 Cuando los cebadores de índice estén completamente descongelados, agite cada tubo para mezclarlo y centrifúguelos brevemente en una microcentrifugadora. Utilice tubos Eppendorf de 1,7 ml como adaptadores para la microcentrifugadora.
- 5 Coloque los cebadores en una gradilla de acuerdo con la siguiente disposición:
 - a Disponga los tubos de cebadores Cebadores de índice C (A503), D (A504) y E (A505) (tapones blancos y solución clara) en posición vertical alineados por filas de la A a la H.
 - b Disponga los tubos de cebadores Cebadores de índice 1 (A701), 2 (A702) y 10 (A710) (tapones naranjas y solución amarilla) en posición horizontal alineados por columnas de la 1 a la 12.

Figura 6 Fijación de la placa de índices



- A Cebadores de índice C (A503), D (A504) y E (A505) (tapones blancos)
- B Cebadores de índice 1 (A701), 2 (A702) y 10 (A710) (tapones naranjas)
- C Placa AMP

- 6 Asigne la etiqueta "AMP" (placa de amplificación) a una nueva placa de PCR de 96 pocillos.
- 7 Añada cebadores de índice a la placa AMP de acuerdo con la hoja de muestras siguiente:
 - a Con una pipeta multicanal, añada 4 μ l de cebadores de índice C (A503), D (A504) y E (A505) (solución clara) a los pocillos correspondientes en una columna de la placa AMP. No es necesario cambiar las puntas entre columnas.
 - b Para evitar la contaminación cruzada entre índices, deseche los tapones blancos originales y coloque tapones blancos nuevos.
 - c Con una pipeta multicanal, añada 4 μ l de cebadores de índice 1 (A701), 2 (A702) y 10 (A710) (solución amarilla) a los pocillos correspondientes en una

fila de la placa **AMP**. *Se deben cambiar las puntas después de cada fila para evitar la contaminación cruzada entre índices.*

- d Para evitar la contaminación cruzada entre índices, deseche los tapones *naranjas* originales y coloque tapones *naranjas* nuevos. Retire todos los tubos de cebadores de índice del área de trabajo.
- 8 Prepare la solución de trabajo de PCR de Mezcla maestra de PCR/Polimerasa de PCR tal y como se indica a continuación:
 - a Añada 5,6 μl de Polimerasa de PCR a 280 μl de Mezcla maestra de PCR.
 - b Invierta la solución de trabajo de PCR preparada 20 veces para mezclarla.En la siguiente sección, añadirá la solución de trabajo a la placa **AMP**. La solución de trabajo de PCR permanece estable a temperatura ambiente durante 10 minutos.



NOTA

Añada siempre Polimerasa de PCR a Mezcla maestra de PCR justo antes de su uso. Nunca almacene la solución de trabajo de PCR combinada.

Procedimiento

- 1 Tras finalizar la reacción de extensión-ligadura de 45 minutos, retire la **FPU** de la incubadora. Retire el sello de película de aluminio y sustitúyalo por la tapa de la placa del filtro.
Se recomienda retirar el sello de película de aluminio antes del centrifugado para garantizar el drenaje óptimo del sobrenadante de la reacción en la placa de residuos.
- 2 Centrifugue la **FPU** a $2400 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante dos minutos.
- 3 Con una pipeta multicanal, añada 25 μl de NaOH 0,05 N en cada pocillo de muestra de la placa del filtro. Asegúrese de que las puntas de las pipetas entren en contacto con la membrana y, a continuación, pipetee NaOH arriba y abajo cinco o seis veces. Debe cambiar las puntas tras cada columna.
- 4 Cubra e incuba la placa del filtro a temperatura ambiente durante cinco minutos.
- 5 Mientras la placa del filtro se incubaba, utilice una pipeta multicanal para transferir 22 μl de la solución de trabajo de PCR a cada pocillo de la placa **AMP** que contiene cebadores de índice. Cambie las puntas entre muestras.

- 6 Transfiera muestras eluidas desde el filtro hasta la placa AMP como se indica a continuación:
 - a Configure una pipeta multicanal P20 a 20 µl.
 - b Pipetee las muestras en la primera columna de la placa del filtro arriba y abajo cinco o seis veces.
 - c Transfiera 20 µl desde la placa del filtro a la columna correspondiente de la placa **AMP**.
 - d Pipetee con cuidado arriba y abajo cinco o seis veces para combinar bien el ADN con la solución de trabajo de PCR.



NOTA

Incline ligeramente la placa **FPU** para garantizar una aspiración completa y evitar la formación de burbujas de aire.

- e Transfiera las columnas restantes desde la placa del filtro a la placa **AMP** de una manera similar. *Se deben cambiar las puntas después de cada columna para evitar la contaminación cruzada entre índices y muestras.*
 - f Una vez transferidas todas las muestras, se puede desechar la placa **MIDI** de recogida de residuos de la **FPU**. El collar adaptador metálico se debe limpiar y guardar para su uso en el futuro.
- 7 Cubra la placa **AMP** con el sello para placas adecuado y asegúrela con un rodillo de goma.
- 8 Centrifugue a 1000 × g a 20 °C durante un minuto.
- 9 Transfiera la placa **AMP** al área de posamplificación.
- 10 Realice el proceso de PCR siguiendo este programa en un ciclador térmico:
 - 95 °C durante 3 minutos
 - 25 ciclos de:
 - 95 °C durante 30 segundos
 - 62 °C durante 30 segundos
 - 72 °C durante 60 segundos
 - 72 °C durante 5 minutos
 - Mantenga la temperatura a 10 °C



PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si no se procede de manera inmediata a la limpieza de PCR, la placa **AMP** puede permanecer en el ciclador térmico toda la noche o se puede almacenar a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta 48 horas.

Limpieza de PCR

Este proceso utiliza las Bolas de limpieza de PCR para purificar los productos de PCR de los demás componentes de las reacciones.

Tiempo estimado

- ▶ Duración total: 50 minutos
- ▶ Tiempo de participación activa: 20 minutos

Consumibles

Artículo	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Tampón de elución	1 tubo	Entre 15 °C y 30 °C	Ilumina
Bolas de limpieza de PCR	400 µl por cada ocho muestras	Entre 2 °C y 8 °C	Ilumina
Etanol al 80 %, recién preparado	5 ml por cada ocho muestras	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placas MIDI de 96 pocillos	2	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sello adhesivo para placas	Según sea necesario	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Cubetas	Según sea necesario	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación



NOTA

Consulte la sección **Precauciones** al inicio del presente protocolo en relación con la manipulación de bolas magnéticas y el lavado con etanol al 80 % durante la limpieza de PCR.

- 1 Deje que Bolas de limpieza de PCR alcance la temperatura ambiente.

- 2 Prepare una solución nueva con etanol al 80 % a partir de una solución de etanol absoluta.

**NOTA**

Para el procedimiento de lavado, prepare siempre una solución nueva con etanol al 80 %. El etanol puede absorber agua del aire y repercutir en los resultados.

Procedimiento

- 1 Centrifugue la placa AMP a $1000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un minuto para recoger la condensación.
- 2 Asigne la etiqueta "**CLP_Plate_ID**" (CLP_Placa_ID) a una nueva placa MIDI.
- 3 Invierta las Bolas de limpieza de PCR 10 veces. Agite con vigor y, a continuación, vuelva a invertir 10 veces.
- 4 Inspeccione visualmente la solución para garantizar que las bolas están bien resuspendidas.
- 5 Con una pipeta multicanal, añada $45\text{ }\mu\text{l}$ de Bolas de limpieza de PCR en cada pocillo de la placa **CLP**.
- 6 Con una pipeta multicanal con configuración de pipeteo a $60\text{ }\mu\text{l}$, transfiera todo el producto de PCR de la placa AMP a la placa **CLP**. Cambie las puntas entre muestras.
- 7 Selle la placa **CLP** con un sello adhesivo para placas.
- 8 Agite la placa **CLP** en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante dos minutos.
- 9 Incube a temperatura ambiente (de $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$) sin agitar durante 10 minutos.
- 10 Coloque la placa en un soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
- 11 Con la placa **CLP** en el soporte magnético y una pipeta multicanal con configuración de pipeteo a $100\text{ }\mu\text{l}$, extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante. Cambie las puntas entre muestras.

**NOTA**

En caso de aspirar bolas con las puntas sin darse cuenta, coloque las bolas

de nuevo en la placa, deje reposar la placa sobre el soporte magnético durante dos minutos y confirme que el sobrenadante se distingue con claridad.

- 12 Con la placa **CLP** en el soporte magnético, lave las bolas con etanol al 80 % recién preparado tal y como se indica a continuación:
 - a Con una pipeta multicanal, añada 200 μ l de etanol al 80 % recién preparado en cada pocillo de muestra. Si tiene cuidado de evitar la contaminación cruzada, no es necesario cambiar las puntas. En este momento, no debe resuspender las bolas.
 - b Incube la placa en el soporte magnético durante un mínimo de 30 segundos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
 - c Extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante.
- 13 Con la placa **CLP** en el soporte magnético, realice un segundo lavado con etanol como se indica a continuación:
 - a Con una pipeta multicanal, añada 200 μ l de etanol al 80 % recién preparado en cada pocillo de muestra.
 - b Incube la placa en el soporte magnético durante un mínimo de 30 segundos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
 - c Extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante.
- 14 Utilice una pipeta multicanal P20 con configuración de pipeteo a 20 μ l para extraer el exceso de etanol.
- 15 Retire la placa **CLP** del soporte magnético y deje secar las bolas durante 10 minutos.
- 16 Con una pipeta multicanal, añada 30 μ l de Tampón de elución en cada muestra y, a continuación, agite brevemente.
Si tiene cuidado de evitar la contaminación cruzada, no es necesario cambiar las puntas.
- 17 Selle la placa con un sello adhesivo para placas.
- 18 Agite la placa **CLP** en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante dos minutos.



NOTA

Asegúrese de que todas las muestras estén resuspendidas por completo. Si hay muestras cuyas bolas no están completamente resuspendidas, pipetee con cuidado arriba y abajo para resuspender las bolas y repita los dos pasos anteriores.

- 19 Incube a temperatura ambiente (de 15 °C a 30 °C) durante dos minutos.
- 20 Coloque la placa **CLP** en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
- 21 Asigne la etiqueta "**LNP_Plate_ID**" (LNP_Placa_ID) a una nueva placa MIDI.
- 22 Con una pipeta multicanal P20 y puntas finas, transfiera con cuidado 20 µl del sobrenadante de la placa **CLP** a la placa **LNP**. Cambie las puntas entre muestras para evitar la contaminación cruzada.

**NOTA**

En caso de aspirar bolas con las puntas sin darse cuenta, coloque las bolas de nuevo en la placa, deje reposar la placa sobre el soporte magnético durante dos minutos y confirme que el sobrenadante se distingue con claridad.

- 23 **[Opcional]** Transfiera los 10 µl de sobrenadante restante de la placa **CLP** a una nueva placa y asigne una etiqueta a la placa que incluya un nombre de experimento y la fecha. Almacene la placa a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C hasta la finalización del experimento de secuenciación y el análisis de los datos. Los productos de PCR limpios se pueden utilizar con fines de solución de problemas en caso de que se produzcan fallos en las muestras.
- 24 Si se detiene en este punto, selle la placa **LNP** con un sello adhesivo para placas y, a continuación, centrifugue a 1000 × g a 20 °C durante un minuto para garantizar que todo el sobrenadante esté en el fondo del pocillo.

**PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD**

Tras la limpieza de PCR, la placa permanece estable hasta tres horas a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C.

Normalización de bibliotecas

Este proceso normaliza la cantidad de cada biblioteca para garantizar una representación de bibliotecas equitativa en la muestra agrupada.

Tiempo estimado

- ▶ Duración total: 1 hora 20 minutos
- ▶ Tiempo de participación activa: 30 minutos

Consumibles

Artículo	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Diluyente de normalización de bibliotecas	1 tubo	Entre -25 °C y -15 °C	Illustrina
Bolas de biblioteca	1 tubo	Entre 2 °C y 8 °C	Illustrina
Lavado de normalización de bibliotecas	2 tubos	Entre 2 °C y 8 °C	Illustrina
Tampón de almacenamiento de biblioteca	1 tubo	Entre 15 °C y 30 °C	Illustrina
NaOH 0,1 N, recién preparado	2 ml por cada 48 muestras	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Placa de PCR con faldones de 96 pocillos	1 placa	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tubo cónico de 15 ml	1 tubo	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Sello adhesivo para placas	Según sea necesario	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario



ADVERTENCIA

Este conjunto de reactivos contiene formamida, una amida alifática que es una toxina reproductiva probable. Evite su inhalación o ingestión, o el contacto con la piel o los ojos, pues podrían producirse lesiones. Deseche los contenedores y los contenidos no utilizados de acuerdo con las normativas de seguridad oficiales de su zona.

Para obtener más información, consulte la hoja de datos de seguridad de este kit en support.illumina.com/sds.ilmn.

Preparación

- 1 Prepare NaOH 0,1 N nuevo añadiendo 30 µl de NaOH 10 N a 2970 µl de agua estéril.
- 2 Retire el Diluyente de normalización de bibliotecas de su almacenamiento a una temperatura de entre -25 °C y -15 °C y deje que alcance la temperatura ambiente. Utilice un baño de agua a una temperatura de entre 20 °C y 25 °C según sea necesario.



NOTA

Diluyente de normalización de bibliotecas puede formar precipitados o cristales visibles. Antes de su uso, agite con vigor y, a continuación, sujete el tubo delante de una luz e inspecciónelo visualmente para asegurarse de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo.

- 3 Retire las Bolas de biblioteca y el Lavado de normalización de bibliotecas de su almacenamiento a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C y deje que alcancen la temperatura ambiente. Utilice un baño de agua a una temperatura de entre 20 °C y 25 °C según sea necesario.
- 4 Agite las Bolas de biblioteca con vigor durante un minuto invirtiéndolas de manera intermitente hasta que las bolas se resuspendan y no quede pellet en el fondo del tubo cuando este se invierte.

Procedimiento

- 1 Añada 394 µl de Diluyente de normalización de bibliotecas en un tubo nuevo de 1,5 ml.

- 2 Utilice una pipeta P1000 con configuración de pipeteo a 1000 μl para resuspender las Bolas de biblioteca completamente pipeteando arriba y abajo 10 veces.



NOTA

Resulta muy importante resuspender completamente el pellet de las bolas de la biblioteca del fondo del tubo. Si utiliza una P1000, se asegurará de que las bolas queden resuspendidas de manera homogénea y de que no quede masa de bolas en el fondo del tubo. Esto resulta fundamental para lograr una densidad de grupos homogénea en la celda de flujo.

- 3 Pipetee 72 μl de Bolas de biblioteca en el tubo que contiene Diluyente de normalización de bibliotecas. Dé la vuelta al tubo entre 15 y 20 veces para mezclar bien el contenido.



NOTA

Para resuspender completamente las bolas en el paso 2, se precisa una pipeta P1000 con configuración de pipeteo a 1000 μl . Mezcle solo las cantidades necesarias de Diluyente de normalización de bibliotecas y Bolas de biblioteca para el ensayo en curso. Debe almacenar los restos de Diluyente de normalización de bibliotecas y Bolas de biblioteca por separado a las temperaturas recomendadas respectivas. Para preservar la estabilidad, no se deben congelar las bolas de Bolas de biblioteca ni mezclarlas con Diluyente de normalización de bibliotecas si no se van a utilizar de manera inmediata.

- 4 Con una pipeta multicanal, añada 45 μl de la solución de trabajo Diluyente de normalización de bibliotecas/Bolas de biblioteca combinada en cada pocillo de la placa LNP que contiene bibliotecas. Si tiene cuidado de evitar la contaminación cruzada, no es necesario cambiar las puntas entre columnas.
- 5 Selle la placa LNP con un sello adhesivo para placas.
- 6 Agite la placa LNP en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante 30 minutos.



NOTA

Esta incubación de 30 minutos es fundamental para garantizar una normalización de bibliotecas adecuada. Las incubaciones superiores o inferiores a 30 minutos pueden afectar a la representación de bibliotecas y la densidad de grupos.

- 7 Coloque la placa en un soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.

- 8 Con la placa **LNP** en el soporte magnético, utilice una pipeta multicanal con configuración de pipeteo a 80 μ l para extraer y desechar con cuidado el sobrenadante en un contenedor de residuos peligrosos adecuado.

**NOTA**

En caso de aspirar bolas con las puntas sin darse cuenta, coloque las bolas de nuevo en la placa y deje reposar la placa durante dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.

- 9 Retire la placa **LNP** del soporte magnético y lave las bolas con Lavado de normalización de bibliotecas como se indica a continuación:
 - a Con una pipeta multicanal, añada 45 μ l de Lavado de normalización de bibliotecas en cada pocillo de muestra.
Si tiene cuidado de evitar la contaminación cruzada, no es necesario cambiar las puntas entre columnas.
 - b Selle la placa **LNP** con un sello adhesivo para placas.
 - c Agite la placa **LNP** en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante cinco minutos.
 - d Coloque la placa en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos o hasta que el sobrenadante se distinga con claridad.
 - e Extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante en un contenedor de residuos peligrosos adecuado.
- 10 Retire la placa **LNP** del soporte magnético y repita el lavado con Lavado de normalización de bibliotecas como se indica a continuación:
 - a Con una pipeta multicanal, añada 45 μ l de Lavado de normalización de bibliotecas en cada pocillo.
Si tiene cuidado de evitar la contaminación cruzada, no es necesario cambiar las puntas entre columnas.
 - b Selle la placa **LNP** con un sello adhesivo para placas.
 - c Agite la placa **LNP** en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante cinco minutos.
 - d Coloque la placa en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos.
 - e Extraiga y deseche con cuidado el sobrenadante en un contenedor de residuos peligrosos adecuado.
- 11 Utilice una pipeta multicanal P20 con configuración de pipeteo a 20 μ l para extraer el exceso de Lavado de normalización de bibliotecas.

- 12 Retire la placa **LNP** del soporte magnético y añada 30 μ l de NaOH 0,1 N en cada pocillo para eluir la muestra.
- 13 Selle la placa **LNP** con un sello adhesivo para placas.
- 14 Agite la placa **LNP** en un agitador de microplacas a 1800 rpm durante cinco minutos.
- 15 Durante los cinco minutos de elución, asigne la etiqueta "**SGP_Plate_ID**" (**SGP_Plate_ID**) a una nueva placa de PCR de 96 pocillos.
- 16 Añada 30 μ l de Tampón de almacenamiento de biblioteca a cada pocillo que se debe utilizar en la placa **SGP**.
- 17 Tras la elución de cinco minutos, asegúrese de que todas las muestras de la placa **LNP** estén resuspendidas por completo. Si las muestras no están completamente resuspendidas, pipetee con cuidado las muestras arriba y abajo o golpee ligeramente la placa contra la mesa para resuspender las bolas y, a continuación, agite cinco minutos más.
- 18 Coloque la placa **LNP** en el soporte magnético durante un mínimo de dos minutos.
- 19 Con una pipeta multicanal con configuración de pipeteo a 30 μ l, transfiera el sobrenadante de la placa **LNP** a la placa **SGP**. Pipetee con cuidado arriba y abajo cinco veces para mezclar.



NOTA

En caso de aspirar bolas con las puntas sin darse cuenta, coloque las bolas de nuevo en la placa, deje reposar la placa sobre el soporte magnético durante dos minutos y confirme que el sobrenadante se distingue con claridad.

- 20 Selle la placa **SGP** con un sello adhesivo para placas y, a continuación, centrifugue a 1000 \times g a 20 $^{\circ}$ C durante un minuto.



PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si no se procede de manera inmediata a la agrupación de bibliotecas y la consiguiente secuenciación en MiSeqDx, almacene la placa **SGP** sellada a una temperatura de entre -25 $^{\circ}$ C y -15 $^{\circ}$ C hasta tres días.

Agrupación de bibliotecas

En la preparación para la secuenciación y la generación de grupos, se combinan volúmenes iguales de bibliotecas normalizadas, diluidas en tampón de hibridación y desnaturalizadas mediante calor antes de su secuenciación en el instrumento MiSeqDx. PhiX se utiliza como control interno para la secuenciación.

Tiempo estimado

- ▶ Duración total: 10 minutos
- ▶ Tiempo de participación activa: 10 minutos

Consumibles

Artículo	Cantidad	Almacenamiento	Suministrado por
Tampón de dilución de biblioteca	1 tubo	Entre -25 °C y -15 °C	Illumina
Control interno PhiX de 10 nM	2 µl	Entre -25 °C y -15 °C	Illumina
NaOH 0,1 N, recién preparado	1 ml	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
1 tampón TE	8 µl	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Tubos Eppendorf (se recomienda con tapón roscado)	2 tubos	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Gradilla de ocho tubos de PCR	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario
Hielera de 2,5 l	1	Entre 15 °C y 30 °C	Usuario

Preparación para agrupación de bibliotecas

- 1 Caliente un bloque de calor apto para tubos de centrifuga de 1,5 ml a 96 °C.
- 2 En una hielera, prepare un baño de agua con hielo. Enfríe el Tampón de dilución de biblioteca en el baño de agua con hielo.
- 3 Empiece a descongelar el cartucho de reactivo de MiSeqDx.

Preparación de una dilución nueva de NaOH



PRECAUCIÓN

El uso de una solución nueva de NaOH diluida es esencial para desnaturalizar completamente las muestras para la generación de grupos en MiSeqDx.

Para desnaturalizar las muestras, prepare 1 ml de NaOH 0,1 N. La preparación de un volumen de 1 ml evita que los pequeños errores de pipeteo afecten a la concentración final de NaOH.

- 1 Combine los volúmenes siguientes en un tubo de microcentrifuga:
 - Agua sin ARNasa ni ADNasa (900 μ l)
 - Preparado de NaOH 1,0 N (100 μ l)
- 2 Invierta el tubo varias veces para mezclar.

Desnaturalización y dilución de Control interno PhiX

- 1 Combine los siguientes volúmenes para diluir la biblioteca Control interno PhiX a 2 nM:
 - Biblioteca Control interno PhiX de 10 nM (2 μ l)
 - 1 tampón TE (8 μ l)
- 2 Combine los siguientes volúmenes de biblioteca Control interno PhiX de 2 nM y NaOH 0,1 N en un tubo de microcentrifuga para que dé como resultado una biblioteca Control interno PhiX de 1 nM:
 - Biblioteca Control interno PhiX de 2 nM (10 μ l)
 - NaOH 0,1 N (10 μ l)

- 3 Agite brevemente para mezclar la solución de la biblioteca Control interno PhiX de 1 nM.
- 4 Centrifugue la solución de plantilla a $280 \times g$ a 20°C durante un minuto.
- 5 Incúbela durante 4,5 minutos a temperatura ambiente para desnaturalizar la biblioteca Control interno PhiX en cadenas individuales.
- 6 Añada el siguiente volumen de Tampón de dilución de biblioteca previamente refrigerado en el tubo que contiene la biblioteca Control interno PhiX desnaturalizada para obtener una biblioteca Control interno PhiX de 20 pM.
 - Biblioteca Control interno PhiX desnaturalizada (20 μl)
 - Tampón de dilución de biblioteca enfriado previamente (980 μl)



NOTA

Puede almacenar la biblioteca Control interno PhiX de 20 pM desnaturalizada hasta tres semanas a una temperatura de entre -25°C y -15°C como alícuotas de un solo uso. Después de tres semanas, los números de grupos tienden a disminuir.

Preparación del cartucho de reactivo

Las instrucciones siguientes describen cómo descongelar el cartucho de reactivo con un baño de agua a temperatura ambiente. Este método conlleva aproximadamente una hora.

- 1 Extraiga el cartucho de reactivo almacenado a una temperatura de entre -25°C y -15°C .
- 2 Sumerja el cartucho de reactivo en un baño de agua con suficiente agua desionizada a temperatura ambiente como para sumergir la base del cartucho de reactivo hasta la línea de agua impresa en este. Tenga en cuenta que el agua no debe sobrepasar la línea de nivel máximo de agua.

Figura 7 Línea de nivel máximo de agua



- 3 Descongele el cartucho de reactivo en el baño de agua a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora o hasta que se haya descongelado por completo.
- 4 Saque el cartucho del baño de agua y dé unos suaves toques en la mesa para que el agua salga de la base del cartucho. Seque la base del cartucho. Asegúrese de que no haya salpicaduras de agua en la parte superior del cartucho de reactivo.

Inspección del cartucho de reactivo

- 1 Invierta el cartucho de reactivo diez veces para mezclar los reactivos descongelados y, a continuación, compruebe visualmente que todas las posiciones estén descongeladas.



NOTA

Es esencial que los reactivos del cartucho estén completamente descongelados y mezclados para garantizar una correcta secuenciación.

- 2 Inspeccione visualmente el reactivo de la posición 1 para asegurarse de que se haya mezclado completamente y no presente precipitados.
- 3 Golpee suavemente el cartucho en la mesa para reducir las burbujas de aire en los reactivos.



NOTA

Los tubos del dispensador de MiSeqDx acceden al fondo de cada depósito para aspirar los reactivos, de modo que resulta importante que estos no presenten burbujas de aire.

- 4 Coloque el cartucho de reactivo en hielo o almacénelo a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C (hasta seis horas) hasta que esté listo para configurar el experimento. Para obtener unos resultados óptimos, proceda directamente con la carga de la muestra y la configuración del experimento.

Preparación de muestras para secuenciación

- 1 Deje que el Tampón de dilución de biblioteca alcance la temperatura ambiente. Agite el Tampón de dilución de biblioteca y asegúrese de que todos los precipitados se hayan disuelto por completo.
- 2 Si la placa **SGP** se ha almacenado congelada, descongélela a temperatura ambiente.

- 3 Centrifugue la placa **SGP** a $1000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un minuto para recoger la condensación.
- 4 Asigne la etiqueta "**PAL_Plate_ID**" (**PAL_Placa_ID**) a un tubo Eppendorf nuevo.
- 5 Si la placa **SGP** se ha almacenado congelada, con una pipeta multicanal P200 con configuración de pipeteo a $40\text{ }\mu\text{l}$, mezcle cada biblioteca que se deba secuenciar pipeteando arriba y abajo entre tres y cinco veces. Cambie las puntas entre muestras.
- 6 Transfiera $5\text{ }\mu\text{l}$ de cada biblioteca que se deba secuenciar de la placa **SGP** a una gradilla de ocho tubos de PCR. Selle la placa **SGP** con un sello adhesivo para placas y resérvela.

**NOTA**

Tras su uso, almacene la placa **SGP** sellada a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. La placa **SGP** sellada permanece estable hasta tres días.

- 7 Combine y transfiera el contenido de la gradilla de ocho tubos de PCR al tubo **PAL**. Mezcle bien el tubo **PAL** agitándolo.
- 8 Asigne la etiqueta "**DAL_Plate_ID**" (**DAL_Placa_ID**) a un tubo Eppendorf nuevo.
- 9 Añada $585\text{ }\mu\text{l}$ de Tampón de dilución de biblioteca en el tubo **DAL**.
- 10 Añada $6\text{ }\mu\text{l}$ de 20 pM de Control interno PhiX en el tubo **DAL**. Con la misma punta, pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar una transferencia completa.
- 11 Transfiera $9\text{ }\mu\text{l}$ de **PAL** al tubo **DAL** que contiene Tampón de dilución de biblioteca. Con la misma punta, pipetee arriba y abajo entre tres y cinco veces para enjuagar la punta y garantizar una transferencia completa.
- 12 Mezcle la **DAL** agitando el tubo tan rápido como pueda.

**NOTA**

Si desea guardar el contenido de **PAL** restante para su uso en el futuro, almacene el tubo **PAL** a una temperatura de entre $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. La **PAL** almacenada permanece en buenas condiciones durante tres días.

La **DAL** de la biblioteca diluida debe estar recién preparada y debe utilizarse de manera inmediata para la carga de MiSeqDx. El almacenamiento de **DAL** reducirá considerablemente la densidad de grupos.

- 13 Centrifugue el tubo **DAL** a $1000 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un minuto para recoger el contenido.

- 14 Con un bloque de calor, incube el tubo **DAL** a 96 °C durante dos minutos.
- 15 Tras la incubación, invierta el tubo **DAL** una o dos veces para mezclar y, a continuación, colóquelo inmediatamente en el baño de agua con hielo.
- 16 Mantenga el tubo **DAL** en el baño de agua con hielo durante cinco minutos.



NOTA

Debe realizar el paso de desnaturalización térmica inmediatamente antes de cargar la **DAL** en el cartucho de reactivo de MiSeqDx para garantizar una carga eficaz de cadenas molde en la celda de flujo de MiSeqDx.

Pasos siguientes

Después de que se haya agrupado la biblioteca de amplicones con el PhiX diluido y desnaturalizado, las bibliotecas estarán listas para cargarse en el Cartucho de MiSeqDx: Ensayo de secuenciación clínica de la fibrosis quística en el depósito designado con la etiqueta **Load Samples** (Carga de muestras). A continuación, el experimento de secuenciación se configura con la interfaz del Software operativo de MiSeq (MOS). Consulte la *Guía de referencia del instrumento MiSeqDx* (n.º de referencia 15038353_ESP) para obtener instrucciones.

Notas

Asistencia técnica

Si necesita asistencia técnica, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Tabla 11 Información de contacto general de Illumina

Sitio web de Illumina	www.illumina.com
Correo electrónico	techsupport@illumina.com

Tabla 12 Números de teléfono del servicio de asistencia al cliente de Illumina

Zona	Número de contacto	Zona	Número de contacto
Norteamérica	1.800.809.4566	Irlanda	1.800.812949
Alemania	0800.180.8994	Italia	800.874909
Austria	0800.296575	Noruega	800.16836
Bélgica	0800.81102	Países Bajos	0800.0223859
Dinamarca	80882346	Reino Unido	0800.917.0041
España	900.812168	Suecia	20790181
Finlandia	0800.918363	Suiza	0800.563118
Francia	0800.911850	Otros países	+44.1799.534000

Hojas de datos de seguridad

Las hojas de datos de seguridad están disponibles en el sitio web de Illumina en support.illumina.com/sds.ilmn.

Documentación del producto

La documentación del producto en PDF está disponible para su descarga en el sitio web de Illumina. Vaya a support.illumina.com, seleccione un producto y, a continuación, haga clic en **Documentation & Literature** (Documentación y literatura).



Illumina
San Diego, 92122 California (EE. UU.)
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Emergo Europe
Molenstraat 15
2513 BH La Haya
Países Bajos