



Mode d'emploi

IFU095-FR

Numéro de version : 1.0

Date de publication : Février 2024

REF

ASTX17.1(24)-IVD

ASTX17.1(24)-B-IVD

ASTX17.1(96)-A-IVD

ASTX17.1(96)-B-IVD

ASTX9.1(96)-A-IVD

ASTX9.1(96)-B-IVD

IVD



CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street,
Fremantle, WA 6160,
Australie



CareDx AB,
Franzégatan 5,
SE-112 51 Stockholm,
Suède

EC REP

Qarad BV,
Cipalstraat 3,
2440 Geel,
Belgique

CH REP

Qarad Suisse S.A.,
World Trade Center, Avenue Gratta-Paille 2
1018 Lausanne,
Suisse
CHRN: CHRN-AR-20002058

Table des matières

1.	Aperçu.....	3
1.1	Principe	3
1.2	Utilisation prévue.....	3
1.3	Contenu du gène ciblé AlloSeq Tx.....	4
1.4	Contenu du kit AlloSeq Tx et conditions de stockage	4
1.5	Limites et contre-indications.....	6
1.6	Exigences vis-à-vis des échantillons	6
1.7	Spécificité analytique/substances interférentes.....	7
1.8	Caractéristiques des performances.....	8
1.9	Précision.....	8
1.10	Spécificité	9
1.11	Reproductibilité et répétabilité.....	9
1.12	Prérequis	9
1.13	Sécurité	9
2.	Préparation de la banque (workflow Early Pooling)	12
2.0	Introduction au protocole	12
2.1	Préparation des échantillons.....	12
2.2	Préparation de la banque.....	13
2.3	Sélection de la taille et purification.....	16
2.4	Quantification Qubit (facultatif).....	18
2.5	Visualisation TapeStation (facultatif)	19
3.	Capture hybride (workflow Early Pooling)	20
3.0	Introduction au protocole	20
3.1	Hybridation de sonde	20
3.2	Capture.....	21
3.3	PCR post-enrichissement	23
3.4	Purification de la PCR post-enrichissement	24
3.5	Quantification Qubit.....	25
3.6	Visualisation TapeStation (facultatif)	25
4.	Préparation de la banque (workflow original)	26
4.0	Introduction au protocole	26
4.1	Préparation des échantillons.....	26
4.2	Préparation de la banque.....	27
4.3	Sélection de la taille et purification.....	30
4.4	Quantification Qubit (facultatif).....	31
4.5	Visualisation TapeStation (facultatif)	32
5.	Capture hybride (workflow original).....	33
5.0	Introduction au protocole	33
5.1	Pooling des échantillons.....	33
5.2	Concentration des pools de banques (facultatif)	33
5.3	Hybridation de sonde	34
5.4	Capture.....	36
5.5	PCR post-enrichissement	37
5.6	Purification de la PCR post-enrichissement	38
5.7	Quantification Qubit.....	39
5.8	Visualisation TapeStation (facultatif)	39
6.	Séquençage.....	40
6.0	Introduction au protocole	40
6.1	PhiX Préparation.....	41
6.2	Diluer et dénaturer pour MiSeq	42

6.3 Diluer et dénaturer pour MiniSeq	43
6.4 Diluer pour iSeq	44
7. Analyse de séquence	44
8. Guide de dépannage	44
9. Informations complémentaires	46
10. Coordonnées	48
11. Références	49

1. Aperçu

1.1 Principe

AlloSeq Tx est le nom de la gamme des produits de séquençage de gènes ciblés conçue pour la détermination de la compatibilité génétique entre un patient en attente d'une transplantation et le donneur potentiel. AlloSeq Tx bénéficie de la technologie de capture hybride afin d'enrichir les gènes d'intérêt à partir de la préparation d'une banque génomique complète. L'utilisation d'une technologie de capture hybride, par opposition à des techniques traditionnelles de PCR à longue portée, présente des avantages en termes de workflow et permet la flexibilité d'un contenu génétique/séquentiel sans qu'il soit nécessaire de modifier le workflow.

Le principe du workflow du test AlloSeq Tx est résumé ci-dessous :

Étape 1 : Préparation de la banque : Fragmentation et tagmentation simultanées de l'ADN, PCR d'indexation, purification et sélection de la taille,

Étape 2 : Capture hybride (enrichissement) : Pooling d'échantillons¹ (workflow original ou workflow early pooling), hybridation de la sonde, capture de fragments liés à la sonde avec des billes magnétiques contenant de la streptavidine, PCR d'enrichissement finale, purification et quantification,

Étape 3 : Séquençage : Dilution et dénaturation, et séquençage sur un séquenceur Illumina,

Étape 4 : Analyse : Génotypage dans le logiciel AlloSeq Assign

¹ Le workflow Early Pooling regroupe les échantillons en pools immédiatement après l'indexation dans un tube unique pour toutes les étapes suivantes, ce qui élimine la sélection de la taille basée sur la plaque et la purification, ainsi que l'étape de concentration optionnelle. Ce workflow permet à l'utilisateur de séquencer des échantillons en un seul service. Ce workflow convient bien aux laboratoires qui n'utilisent pas d'automatisation et qui préfèrent un protocole nécessitant moins d'interventions, moins de consommables et une réduction de 46 % des étapes de prélèvement à la pipette en comparaison au workflow original. Le format selon la plaque du workflow original convient bien aux laboratoires qui choisissent d'automatiser cette procédure.

Contenu des kits AlloSeq Tx :

- Des réactifs pour préparer des banques de génome entier,
- Des sondes biotinylées complémentaires pour capturer les cibles des séquences, et
- Des réactifs pour enrichir les cibles capturées pour le séquençage.

Nous recommandons à tous les utilisateurs de lire la totalité du mode d'emploi, en particulier la section *Sécurité*, avant de commencer la procédure. Les procédures d'utilisation du logiciel AlloSeq Assign se trouvent dans le mode d'emploi du logiciel AlloSeq Assign

1.2 Utilisation prévue

AlloSeq Tx est le nom de la gamme des produits de séquençage de gènes ciblés conçue pour la détermination de la compatibilité génétique entre un patient en attente d'une transplantation et le donneur potentiel, y compris les sondes pour l'enrichissement ciblé de 17 loci au maximum.

Les kits de typage AlloSeq Tx 17 sont des tests qualitatifs de typage ADN HLA-A, B, C, E, F, G, H, DRB1/3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, MICA et MICB pour contribuer à l'évaluation de la compatibilité génétique pour la transplantation d'organes ou de cellules souches.

Les kits de typage AlloSeq Tx 9 sont des tests qualitatifs de typage HLA-A, B, C, DRB1/3/4/5, DQB1 et DPB1 pour contribuer à l'évaluation de la compatibilité génétique pour la transplantation d'organes ou de cellules souches.

Le produit est destiné à être utilisé avec les séquenceurs Illumina MiSeq, MiniSeq et iSeq, ainsi que le logiciel d'interprétation AlloSeq Assign.

Ce dispositif est destiné à être utilisé par du personnel ayant une formation appropriée et des connaissances de la fréquence des types HLA dans leur population, dans des laboratoires réglementés de façon appropriée qui effectuent des typages (HLA) de tissus pour apparier les donneurs et les receveurs de transplantations.

Les produits AlloSeq Tx sont destinés à être utilisés uniquement par des professionnels et ne doivent pas servir de paramètre unique à une décision clinique. Les kits AlloSeq Tx ne doivent pas être utilisés pour le diagnostic de pathologies.

1.3 Contenu du gène ciblé AlloSeq Tx

Nom du produit	Code du produit	Gènes ciblés	Taille du kit	Séquençage ¹
AlloSeq Tx 17	ASTX17.1(24)-IVD	HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA et MICB	24 préparations de banques 4 enrichissements (entre 6 et 24 échantillons par enrichissement)	≤ 24 échantillons sur la cuve de mesure MiSeq Micro
	ASTX17.1(24)-B-IVD			≤ 6 échantillons sur la cuve de mesure MiSeq Nano
	ASTX17.1(96)-A-IVD	HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G, -H, -DRB1/3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1, MICA et MICB	96 préparations de banques 8 enrichissements (entre 12 et 96 échantillons par enrichissement)	≤ 24 échantillons sur iSeq
	ASTX17.1(96)-B-IVD			≤ 24 échantillons sur la cuve de mesure MiniSeq Mid Output
AlloSeq Tx9	ASTX9.1(96)-A-IVD	HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 et -DPB1	96 préparations de banques 8 enrichissements (entre 12 et 96 échantillons par enrichissement)	≤ 96 échantillons sur la cuve de mesure MiSeq Standard
	ASTX9.1(96)-B-IVD			≤ 24 échantillons sur la cuve de mesure MiSeq Micro
				≤ 6 échantillons sur la cuve de mesure MiSeq Nano
				≤ 24 échantillons sur iSeq
				≤ 24 échantillons sur la cuve de mesure MiniSeq Mid Output

¹ Le nombre d'échantillons et de cuves de mesure indiqué dans ce tableau est basé sur le kit de validation d'AlloSeq Tx. Ces valeurs peuvent être utilisées comme une indication et peuvent faire l'objet d'une vérification supplémentaire par des laboratoires individuels.

1.4 Contenu du kit AlloSeq Tx et conditions de stockage

En respectant les conditions de température de stockage ci-dessous, les composants du kit peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'emballage externe des kits et peuvent supporter jusqu'à 12 cycles de congélation-décongélation. Après utilisation, les kits et les composants doivent être immédiatement replacés dans leurs conditions de stockage.

Ces kits NE DOIVENT PAS être utilisés au-delà de leur date de péremption.

Boîte de réactifs 1 sur 5, à conserver entre -15 et -25 °C

Réactif	Quantité (24 tests)	Type/taille de tube (24 tests)	Quantité (96 tests)	Type/taille de tube (96 tests)
Tagmentation Beads	1	0.5mL	1	1.5mL
Tagmentation Buffer	1	0.5mL	1	1.5mL
PCR Mix-1	S. O.	S. O.	1	5mL

Boîte de réactifs 2 sur 5, à conserver entre 15 et 30°C

Réactif	Quantité (24 tests)	Type/taille de tube (24 tests)	Quantité (96 tests)	Type/taille de tube (96 tests)
Stop Buffer	1	1.5mL	2	2mL
Tagmentation Wash Buffer	2	5mL	1	50mL

Boîte de réactifs 3 sur 5, à conserver entre -15 et -25 °C

Réactif	Quantité (24 tests)	Type/taille de tube (24 tests)	Quantité (96 tests)	Type/taille de tube (96 tests)
AlloSeq Tx Index Primers	1 ensemble (10x)	Tube FluidX	1 plaque	Plaque de 96 puits

Boîte de réactifs 4 sur 5, à conserver entre -15 et -25 °C

Réactif	Quantité (24 tests)	Type/taille de tube (24 tests)	Quantité (96 tests)	Type/taille de tube (96 tests)
Sondes AlloSeq Tx spécifiques au produit	1	0.5mL	1	0.5mL
PCR Mix	1	1.5mL	S. O.	S. O.
PCR Mix-2	S. O.	S. O.	1	0.5mL
PCR Primers	1	0.5mL	1	0.5mL
Hybridisation Buffer 1	1	1.5mL, conique	1	1.5mL, Conique
Capture Wash Buffer	4	1.5mL, orange, conique	8	1.5mL, orange, conique
Capture Elution Buffer 1	1	0.5mL	1	0.5mL
2N NaOH	1	0.5mL	2	0.5mL

Boîte de réactifs 5 sur 5, conserver à 2 à 8 °C

Réactif	Quantité (24 tests)	Type/taille de tube (24 tests)	Quantité (96 tests)	Type/taille de tube (96 tests)
Purification Beads	1	5mL	S. O.	S. O.
Purification Beads-1	S. O.	S. O.	3	5mL
Purification Beads-2	S. O.	S. O.	1	0.5mL
Resuspension Buffer	2	1.5mL	2	5mL
Capture Beads	1	1.5mL	1	5mL
Hybridisation Buffer 2	1	0.5mL	1	0.5mL
Capture Elution Buffer 2	1	0.5mL	1	0.5mL

1.5 Limites et contre-indications

- Il est fortement recommandé à l'utilisateur de valider ces kits avant leur utilisation dans le laboratoire à l'aide des échantillons dont le génotypage a été déterminé par d'autres procédures moléculaires.
- Il est fortement recommandé à l'utilisateur de suivre toutes les instructions présentes sur l'étiquetage du produit. Tout écart à la procédure décrite n'est pas recommandé, peut ne pas être pris en charge et peut conduire à des erreurs de typage.
- Il est recommandé d'inclure un contrôle positif (ADN humain) et un contrôle négatif/sans support (avec de l'eau stérile à la place de l'ADN) dans chaque analyse de préparation de banque. Le contrôle positif doit produire une librairie quantifiable (mesuré par Qubit ou les mesures de séquençage de couverture) et la séquence obtenue doit concorder avec le génotype attendu de l'échantillon. Aucune banque quantifiable (mesurée par Qubit ou signalé comme faible couverture dans Assign) ne doit être présente dans le contrôle du modèle négatif pour chaque expérience. Si une banque quantifiable est produite pour le contrôle sans modèle, l'analyse doit être répétée.
- Le test AlloSeq Tx séquence des fragments d'ADN ayant une taille d'insert moyenne de 500 bp — ce qui signifie que les polymorphismes éloignés de plus de 500 bp — ne peuvent pas être phasés, ce qui peut donner lieu à des ambiguïtés hétérozygotes.

1.6 Exigences vis-à-vis des échantillons

Type d'échantillon :

ADN génomique humain de poids moléculaire élevé (en suspension dans un tampon Tris/EDTA et OD_{260/280} > 1,8) d'échantillons de sang complet. Les échantillons de sang complets contenant de l'héparine ne doivent PAS être utilisés. La quantité recommandée de l'ADN génomique humain de poids moléculaire élevé est de 100 à 1 000 ng. L'analyse interne a montré qu'il est également possible d'utiliser des échantillons avec de l'ADN à partir de 50 ng. Des génotypes corrects ont également été obtenus à partir d'ADN de mauvaise qualité ou coupé.

Stabilité des échantillons :

Conservation : Le sang complet doit être prélevé avec de l'ACD ou de l'EDTA. L'ADN peut être isolé à partir d'échantillons jusqu'à 2 semaines après le prélèvement sanguin initial, mais il est recommandé de traiter les échantillons dans les 2 à 3 jours qui suivent le prélèvement. Les échantillons de sang complet peuvent être conservés à -20° à -70° pendant au moins 1 an sans compromettre la qualité ou la quantité d'ADN isolé. (Réf. ASHI Laboratory Manual Vol 2).

Méthode d'extraction de l'ADN :

Le test AlloSeq Tx a été validé avec le QIAamp DNA Blood Mini Kit (Catalogue #51104), le EZ1 DNA Blood 350 µl Kit (n° d'article 951054) et Promega Maxwell. Sinon, l'ADN peut être extrait à l'aide d'autres méthodes et équipements validés par l'utilisateur pour isoler l'ADN de poids moléculaire élevé.

1.7 Spécificité analytique/substances interférentes

CareDx Pty Ltd. a identifié toutes les substances interférentes qui pouvaient impacter le test. Voir le tableau ci-dessous.

Inhibiteur	Source potentielle	Risque	Commentaires
EDTA	Tampon TE, tubes de collecte de sang	Très faible	Resuspendre l'ADN dans du Tris-HCl pH 8 ou du TE avec < 0,1 mM d'EDTA. Utiliser des kits de préparation de l'ADN sanguin du commerce. Ne pas resuspendre dans > 0,1 mM d'EDTA.
Alcools	Éthanol, isopropanol, alcool isoamylique	Faible	Vérifier que les granulés d'ADN ou les billes sont séchés à l'air et vérifier visuellement l'absence de gouttelettes d'éthanol (1 % d'éthanol = 1,25 µl à 80 % dans une réaction PCR de 100 µl). Le protocole AlloSeq Tx comporte plusieurs étapes de lavage à l'éthanol à 80 %, ce qui fait de l'inhibition due au transfert d'éthanol un risque faible, mais légèrement plus élevé que les autres facteurs.
Excès de sels	KCl, NaCl, CsCl, NaAc	Très faible	S'assurer de rincer soigneusement les granulés d'ADN ou les billes avec de l'éthanol à 80 % Vérifier que la DO 260/230 est d'environ 2 pour commencer sur l'ADN génomique.
Sels chaotropiques	Cl de guanidinium ; MgCl ₂ ; urée	Très faible	S'assurer de rincer soigneusement les granulés d'ADN ou les billes avec de l'éthanol à 80 % Vérifier que la DO 260/230 est d'environ 2 pour commencer sur l'ADN génomique.
Phénol : chloroforme	Transfert organique	Très faible	Un composant de la procédure d'extraction d'ADN commerciale Trizol souvent utilisée S'assurer de rincer soigneusement les granulés d'ADN ou les billes avec de l'éthanol à 80 % Vérifier que la DO 260/230 est d'environ 2 pour commencer sur l'ADN génomique.
Protéines	BSA, PEG, albumine sanguine	Très faible	Utiliser des kits de préparation de l'ADN sanguin du commerce Vérifier que la DO 260/280 de l'ADN génomique initial est > 1,8
Hème, hémoglobine, immunoglobulines	Sang	Très faible	Éviter l'utilisation d'échantillons sanguins présentant une hémolyse importante Utiliser des kits de préparation de l'ADN sanguin du commerce Vérifier que la DO 260/280 de l'ADN génomique initial est > 1,8
Détergents/DDT	Désoxycholate de sodium, sarkosyl, SDS, NP40, Tween 20, Triton X-100, N-octyl glucoside	Très faible	S'assurer de rincer soigneusement les granulés d'ADN ou les billes avec de l'éthanol à 80 % Vérifier que la DO 260/230 de l'ADN génomique initial est d'environ 2
Protéases	Protéinase K, manipulation des échantillons	Très faible	Utiliser des kits de préparation de l'ADN sanguin ou salivaire du commerce Porter des gants en permanence
Nucléases	Manipulation d'échantillons, enzymes de restriction, nucléase micrococcale	Très faible	Utiliser des kits de préparation de l'ADN sanguin du commerce Porter des gants en permanence

Inhibiteur	Source potentielle	Risque	Commentaires
ADN/ARN exogène	Transfert, contamination	Très faible	Préparer l'ADN génomique dans une zone pré-PCR dédiée
Supports	ARN, héparine, glycogène	Très faible	Utiliser un kit de préparation de l'ADN sanguin et/ou éviter les tubes de prélèvement de sang contenant de l'héparine
Ions métalliques en excès	Mg ²⁺ du tampon PCR, ions Fe	Très faible	S'assurer de rincer soigneusement les granulés d'ADN ou les billes avec de l'éthanol à 80 % Vérifier que la DO 260/230 de l'ADN génomique initial est d'environ 2
Médicaments antiviraux (ex. : acyclovir)	Sang	Très faible	Utiliser des kits de préparation de l'ADN sanguin du commerce Vérifier que la DO 260/280 de l'ADN génomique initial est > 1,8
Poudre des gants	Gants poudrés	Très faible	Utiliser des gants non poudrés
Tubes pour PCR avec irradiation UV	Traitement UV des tubes pour PCR	Très faible	Éviter de faire subir un traitement par UV au matériel en plastique
Biotine	Provenant de substances pharmaceutiques interagissant avec la streptavidine	Très faible	Le processus comporte plusieurs lavages de purification entre le prélèvement de l'échantillon et l'étape de capture hybride du protocole, ce qui permet d'éliminer les molécules de biotine. Dans le cas d'un test de capture hybride, la présence de biotine (peu probable, comme indiqué ci-dessus) ne donnera pas lieu à un résultat erroné. Cela peut réduire l'efficacité de l'enrichissement, qui serait détecté comme un faible rendement de l'enrichissement ou ne donnerait aucun résultat.

1.8 Caractéristiques des performances

La performance du test a été évaluée à l'aide d'un panel d'échantillons d'ADN dont les génotypes sont connus, dont des échantillons de contrôle interne de CareDx, des étalons de référence HLA de l'International Histocompatibility Workshops (IHW) et des échantillons obtenus auprès de l'International HLA DNA Exchange de l'Université de Californie de Los Angeles (UCLA). Les performances de la préparation des banques, des enrichissements et du séquençage ont été évaluées selon les critères d'acceptation définis.

1.9 Précision

Ensemble, le produit AlloSeq Tx et le logiciel AlloSeq Assign sont conçus pour être conformes à la norme ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) ainsi qu'à la norme EFI (European Federation of Immunogenetics) pour le typage HLA.

Résumé d'un résultat obtenu par des études de vérification et de validation.

INDICATEUR	PANEL	TAILLE DU PANEL (n)	RÉSULTAT
Concordance du génotypage	Interne	190	100%
Concordance du génotypage	UCLA	24	98,12%
Concordance du génotypage	IHW	48	98,06%
Concordance du génotypage	Externe	124	99,54%
Concordance totale/globale			99,49%

Dans toutes les instances de discordance observées au cours des études de vérification/validation, il est envisagé que la discordance découle des limites de la méthode ou de la technologie de typage précédente.

1.10 Spécificité

Les données ont montré qu'une spécificité aussi faible que 12 % n'a pas d'impact sur le test, alors que les valeurs de spécificité typiques se situent entre 64 et 92 %. Une spécificité totale est peu probable et constituerait un indicateur de problèmes de qualité potentiels. Alors que la stratégie de conception de la sonde réduit fortement la probabilité d'absence d'allèles, le paradigme sensibilité vs spécificité est susceptible d'être vérifié. C'est-à-dire qu'un certain degré de faible spécificité garantit une sensibilité complète et les allèles, dont les nouveaux, seront séquencés avec succès.

1.11 Reproductibilité et répétabilité

L'association du AlloSeq Tx et du logiciel AlloSeq Assign a prouvé sa capacité à donner des résultats équivalents d'un lot à l'autre au cours d'une étude de vérification de lot à lot, et entre les laboratoires, les utilisateurs et les instruments, lors de la vérification et de la validation sur quatre sites externes. L'AlloSeq Tx a montré qu'il pouvait donner des résultats équivalents pour le même échantillon lors de passages répétés.

1.12 Prérequis

- Les instruments sont correctement calibrés, entretenus et font l'objet d'un plan de maintenance selon les besoins.
- Des procédures opérationnelles normalisées (PON) sont en place et contrôlées.
- Le kit est utilisé par un personnel de laboratoire formé et autorisé.
- Les réactifs sont utilisés dans les limites des dates d'expiration indiquées.
- Les réactifs des différents lots de kits ne sont PAS utilisés ensemble. Cela peut avoir un impact sur la performance du kit.
- Seuls les réactifs considérés comme non inclus mais requis dans ce document sont utilisés.
- Il convient de faire attention d'éviter la contamination croisée des échantillons d'ADN ou les mélanges d'échantillons
- Les embouts de barrière sont utilisés tout au long de la procédure.
- Les déversements doivent soigneusement être évités à toutes les étapes.
- Les cahiers de travail fournis par le fabricant doivent être utilisés en association à ce document.

1.13 Sécurité

Suivez les pratiques de sécurité en laboratoire et de prévention des contaminations en salle blanche lors de l'exécution de cette procédure. Grâce au processus de gestion des risques de CareDx Pty Ltd, tous les risques ont été mitigés jusqu'à une limite acceptable. Les instructions d'utilisation doivent être suivies, afin d'éviter des situations d'utilisation dangereuses. Ce kit ne contient pas de matériaux dangereux. Veuillez consulter la fiche de données de sécurité et respecter toutes les précautions de manipulation et de mise au rebut.

COMPOSANT DU KIT	PICTOGRAMMES	AVERTISSEMENT DE SÉCURITÉ
<p>TAGMENTATION BUFFER Contient du N,N-Diméthylformamide</p>		<p>Mention d'avertissement : Danger</p> <p>Mentions de danger : H319 – Provoque une sévère irritation des yeux. H332 – Nocif par inhalation H350 – Peut provoquer le cancer H360 – Peut nuire à la fertilité ou au fœtus.</p> <p>Mises en garde – EU (§28, 1272/2008) P201 – Se procurer les instructions spéciales avant utilisation. P202 – Ne pas manipuler avant d’avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. P261 – Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P270 – Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit. P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage P264 – Se laver soigneusement le visage les mains et la peau exposée après manipulation. P272 – Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail P308 + P313 – EN CAS d’exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin. P304 + P340 – EN CAS D’INHALATION : transporter la personne à l’extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. P313 – Consulter un médecin. P305 + P351 + P338 – EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l’eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. P337 + P313 – Si l’irritation oculaire persiste : consulter un médecin. P405 – Garder sous clef. P501 – Éliminer le contenu/récipient auprès d’une entreprise spécialisée dans l’élimination de déchets.</p>
<p>PCR MIX Contient du chlorure de tétraméthylammonium</p>		<p>Mention d'avertissement : Danger</p> <p>Mention de danger H302 – Nocif en cas d’ingestion. H371 – Risque présumé d’effets graves pour les organes. H412 – Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.</p> <p>Mises en garde – EU (§28, 1272/2008) P260 – Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P270 – Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit. P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage P264 – Se laver soigneusement le visage les mains et la peau exposée après manipulation. P272 – Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail P273 – Éviter le rejet dans l’environnement. P308 + P313 – EN CAS d’exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin. P301 + P312 – EN CAS D’INGESTION : appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise. P330 – Rincer la bouche. P405 – Garder sous clef. P501 – Éliminer le contenu/récipient auprès d’une entreprise spécialisée dans l’élimination de déchets.</p>
<p>NaOH 2N Contient de l’hydroxyde de sodium</p>		<p>Mention d'avertissement : Danger</p> <p>Mention de danger H314 – Provoque de graves brûlures de la peau et de graves lésions des yeux. H318 – Provoque des lésions oculaires graves</p>

COMPOSANT DU KIT	PICTOGRAMMES	AVERTISSEMENT DE SÉCURITÉ
		<p>Mises en garde – EU (§28, 1272/2008)</p> <p>P260 – Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P264 – Se laver soigneusement le visage les mains et la peau exposée après manipulation. P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage P301 + P330 + P331 – EN CAS D’INGESTION : rincer la bouche. NE PAS faire vomir. P303 + P361 + P353 – EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l’eau ou se doucher. P363 – Laver les vêtements contaminés avant réutilisation. P310 – Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON/un médecin. P304 + P340 – EN CAS D’INHALATION : transporter la personne à l’extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. P305 + P351 + P338 – EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l’eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. P405 – Garder sous clef. P501 – Éliminer le contenu/récipient dans le respect des réglementations locales, régionales, nationales et internationales en vigueur.</p>
<p>CAPTURE BEADS Contient du formamide</p>		<p>Mention d’avertissement : Danger</p> <p>Mention de danger H351 – Susceptible de provoquer le cancer H360 – Peut nuire à la fertilité ou au fœtus. H373 – Risque présumé d’effets graves pour les organes à la suite d’expositions répétées ou d’une exposition prolongée.</p> <p>Mises en garde – EU (§28, 1272/2008) P201 – Se procurer les instructions spéciales avant utilisation. P202 – Ne pas manipuler avant d’avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. P260 – Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P270 – Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit. P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage P264 – Se laver soigneusement le visage les mains et la peau exposée après manipulation. P272 – Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail P308 + P313 – EN CAS d’exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin. P405 – Garder sous clef. P501 – Éliminer le contenu/récipient auprès d’une entreprise spécialisée dans l’élimination de déchets.</p>
<p>HYBRIDISATION BUFFER 1 Contient du formamide</p>		<p>Mention d’avertissement : Danger</p> <p>Mention de danger H351 – Susceptible de provoquer le cancer H360 – Peut nuire à la fertilité ou au fœtus. H373 - Peut causer des dommages aux organes par exposition prolongée ou répétée</p> <p>Mises en garde – EU (§28, 1272/2008) P201 – Se procurer les instructions spéciales avant utilisation. P202 – Ne pas manipuler avant d’avoir lu et compris toutes les précautions de sécurité. P261 – Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols. P270 – Ne pas manger, boire ou fumer en manipulant ce produit. P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage P264 – Se laver soigneusement le visage les mains et la peau exposée après manipulation. P272 – Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail P308 + P313 – EN CAS d’exposition prouvée ou suspectée : consulter un médecin.</p>

COMPOSANT DU KIT	PICTOGRAMMES	AVERTISSEMENT DE SÉCURITÉ
		P405 – Garder sous clef. P501 – Éliminer le contenu/récipient auprès d’une entreprise spécialisée dans l’élimination de déchets.
STOP BUFFER Contient du dodécylsulfate de sodium		Mention d’avertissement : Avertissement Mention de danger H319 – Provoque une sévère irritation des yeux. Mises en garde – EU (§28, 1272/2008) P264 – Se laver soigneusement le visage les mains et la peau exposée après manipulation. P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage P305 + P351 + P338 – EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l’eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. P337 + P313 – Si l’irritation oculaire persiste : consulter un médecin.

REMARQUE : le composant « Purification Beads » contient de l’azoture de sodium (< 0,1 %) qui n’est pas considéré comme une concentration dangereuse selon la norme EC 1272/2008 (CLP/GHS), les directives EC 1999/45EC et 67/548/EEC ou US–OSHA (HCS 29 CFR 1910.1200) et l’UN GHS.

Pour obtenir des informations supplémentaires sur tous les matériaux dangereux contenus dans le kit AlloSeq Tx, veuillez consulter la fiche de données de sécurité de TEC478_AlloSeq Tx sur www.caredx.com.

2. Préparation de la banque (workflow Early Pooling)

2.0 Introduction au protocole

- Suivez le protocole d’AlloSeq Tx ci-dessous dans l’ordre indiqué et à l’aide des paramètres spécifiés.
- Avant de procéder, vérifiez le contenu du kit et assurez-vous que vous disposez des consommables et de l’équipement nécessaires.
- Pour faciliter l’utilisation, les étapes du protocole pour la préparation de banque sont également détaillées dans *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. Les références au cahier de travail du chapitre 2 correspondent à ce cahier de travail.

2.1 Préparation des échantillons

1. Saisissez un ID pour les expériences, une description, un opérateur et la date dans le cahier de travail.
2. Sélectionnez l’ensemble de sondes AlloSeq à utiliser pour l’expérience dans le menu déroulant du cahier de travail.
3. Sélectionnez le type de séquenceur à utiliser dans le menu déroulant du cahier de travail. Une fois le type de séquenceur sélectionné, les instructions de séquençage seront affichées dans le cahier de travail.
4. Saisissez l’identifiant des échantillons à tester dans la partie jaune de la disposition de la plaque dans le cahier de travail, selon la configuration souhaitée.

REMARQUE : n’utilisez que des caractères alphanumériques. Les ID d’échantillons en double seront marqués en rouge pour inviter l’utilisateur à le corriger. Le logiciel du séquenceur exige d’avoir des identifiants d’échantillon uniques dans chaque session. N’entrez aucune information pour les puits qui ne contiendront pas d’échantillons.

5. Sélectionnez l'ensemble d'index dans le menu déroulant orange sous Plate Layout (Disposition de la plaque).
6. Si nécessaire et à l'aide du format d'index des tubes, l'ordre d'index i7 peut être modifié. Sélectionnez l'index i7 alternatif à utiliser depuis le menu déroulant options pour la colonne requise. Si des index i7 dupliqués sont sélectionnés, les cellules sont marquées en rouge pour que l'utilisateur puisse les corriger.
7. Si nécessaire et à l'aide du format d'index des tubes, l'ordre d'indice i5 peut être modifié. Sélectionnez l'index i5 alternatif à utiliser depuis le menu déroulant Options pour la ligne requise. Si des index i5 dupliqués sont sélectionnés, les cellules sont marquées en rouge pour que l'utilisateur puisse les corriger.
8. Une fois toutes les actions ci-dessus terminées, cliquez sur l'onglet 1.2 SampleSheet et vérifiez. Le texte en rouge sera utilisé pour indiquer où des informations restent requises. Si aucun texte en rouge n'est visible, l'onglet SampleSheet peut être enregistré comme un fichier CSV (délimité par des virgules) (*.csv). Enregistrez le fichier sous le nom « SampleSheet.csv ». Enregistrer le fichier au format csv ne permet d'enregistrer que l'onglet actif. Ouvrez le fichier enregistré SampleSheet.csv dans Excel et supprimez les lignes vides dans le tableau [Data], c'est-à-dire les lignes comprises entre 22 et 117 qui ne contiennent pas de renseignements sur les échantillons. Ensuite, enregistrez le fichier. La feuille de l'échantillon est alors prête à être importée pour le séquençage à l'aide d'un séquenceur Illumina.

2.2 Préparation de la banque

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par échantillon (µl)	Préparation requise
Tagmentation Buffer	-15 °C à -25 °C BOÎTE 1	10	Amener à température ambiante.
Eau stérile	15°C à 30°C Fourni par l'utilisateur	30	Aucune préparation requise
Tagmentation Beads	-15 °C à -25 °C BOÎTE 1	10	Amener à température ambiante, pendant au moins 30 min.
Stop Buffer	15°C à 30°C BOÎTE 2	10	Aucune préparation requise
Tagmentation Wash Buffer	15°C à 30°C BOÎTE 2	300	Aucune préparation requise
PCR Mix (ou PCR Mix-1 pour le kit 96)	-15 °C à -25 °C BOÎTE 4 (ou boîte 1 pour PCR Mix-1)	20	À décongeler et à conserver sur glace. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.

Réactif	Conditions de stockage	Volume par échantillon (µl)	Préparation requise
Indices : ASTX17.1(24)-IVD : H503, H505, H506, H517, H705, H706, H707, H710, H711, H714 ASTX17.1(24)-B-IVD : H502, H507, H508, H521, H701, H702, H703, H704, H712, H715 ASTX17.1(96)-A-IVD/ASTX9.1(96)-A-IVD : H503, H505, H506, H517, H502, H507, H508, H521, H705, H706, H707, H710, H711, H714, H701, H702, H703, H704, H712, H715 ASTX17.1(96)-B-IVD/ASTX9.1(96)-B-IVD : H510, H511, H513, H522, H515, H516, H518, H520, H716, H718, H719, H720, H721, H722, H723, H724, H726, H727, H728, H729	-15 °C à -25 °C BOÎTE 3	10 au total	À décongeler et à conserver sur glace.

2. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
3. Rassemblez la plaque de 96 puits demi-jupée, du film Microseal B et des tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml ou tubes de 5 mL.

REMARQUE : Il n'est pas possible de s'arrêter en toute sécurité avant l'indexation de la PCR. Le processus dure environ **1h50** (dont 50 min de thermocyclage de la PCR).

4. Pour chaque échantillon d'ADN, aliquotez 10 µl d'un échantillon de 10 à 100 ng/µl dans le puits approprié d'une plaque pour PCR, conformément à la disposition de la plaque du document 1.0 Sample_Prep sheet.
5. Préparez 40 µl de Tagmentation Master Mix par échantillon, avec : 10 µl de Tagmentation Buffer, 20 µl d'eau stérile et 10 µl de Tagmentation Beads.
6. Mélangez le mélange de référence ci-dessus au vortex puis mélangez par impulsions.
7. Avec une pipette, prélevez 40 µl de Tagmentation Master Mix dans chaque puits qui contient un échantillon d'ADN.
8. Scellez la plaque avec du film Microseal B.
9. Centrifugez la plaque à 100 x g pendant 10 secondes pour recueillir tous les réactifs au fond du puits.
10. Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1800 tr/minute pendant 1 minute.
11. Inspectez visuellement la plaque :
 - a) Si les billes ne sont pas bien distribuées dans le puits, répétez l'agitation à partir de l'étape 10,
 - b) Si le matériel n'est pas au fond du puits ou s'est éclaboussé sur le film Microseal B, mélangez par impulsions et répétez l'agitation de l'étape 10.
12. Placez la plaque dans le thermocycleur et exécutez le programme de tagmentation avec le couvercle chauffé à 105 °C, et un volume de réaction de 50 µl :

Température	Durée
55°C	5 minutes
10°C	2 minutes

13. Une fois le programme terminé, retirez immédiatement la plaque du thermocycleur et laissez-la à température ambiante pendant 2 minutes.
14. Retirez le film Microseal B.
15. Ajoutez 10 µl de Stop Buffer dans chaque puits de réaction.
16. Rescellez la plaque avec un nouveau film Microseal B.
17. Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1800 tr/minute pendant 1 minute.
18. Incubez la plaque pendant 5 minutes supplémentaires à température ambiante.

19. Pendant l'incubation, retirez le PCR Mix (ou PCR Mix-1 si vous utilisez les kits de 96 tests) et les index du congélateur pour les faire décongeler, puis placez-les sur de la glace ou un plateau froid.
20. Inspectez visuellement la plaque, si le matériel est au fond du puits ou s'est éclaboussé sur le film Microseal B, mélangez la plaque par impulsions.
21. Lavez trois fois avec du Tagmentation Wash Buffer, selon les instructions ci-dessous :
 - a) Retirez le film Microseal B et placez la plaque sur le stand magnétique-96 pendant 30 secondes, pour permettre aux billes de s'accumuler dans les puits à proximité de l'aimant.
 - b) À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les puits avec l'aimant,
 - c) Ajoutez doucement 100 µl de Tagmentation Wash Buffer dans chaque puits,
 - d) Rescellez la plaque avec un nouveau film Microseal B et vérifiez qu'il est correctement fixé,
 - e) Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1 800 tr/minute pendant 2 minutes à température ambiante,
 - f) **ATTENTION** : Si des échantillons ont éclaboussé le film, centrifugez à 100 x g pendant 10 s avant de retirer le film,
 - g) Répétez les étapes a) à f) deux fois de plus pour un total de 3 lavages.

REMARQUE : Avant d'éliminer le surnageant du troisième lavage, préparez le mélange de référence pour PCR selon les instructions suivantes :

22. Préparez 40 µl de PCR master mix à l'aide de 20 µl d'eau stérile et de 20 µl de PCR Mix. (ou PCR Mix-1 en cas d'utilisation de kits pour 96 tests).

REMARQUE : le PCR Mix est utilisé pour les étapes suivantes du protocole. Ne jetez pas ce flacon.

23. Retirez le film Microseal B et placez la plaque sur le stand magnétique-96 pendant 30 minutes, pour permettre aux billes de s'accumuler dans les puits à proximité de l'aimant.
24. Avec une pipette de 100 µl, aspirez et jetez le surnageant du lavage de tagmentation final.
25. Retirez la plaque du support magnétique.
26. Ajoutez 40 µl du mélange de référence pour PCR à chaque puits.
27. Scellez la plaque avec du film Microseal B.
28. Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1 800 tr/minute pendant 2 minutes à température ambiante.
29. Centrifugez la plaque à 100 x g pendant 10 secondes pour s'assurer que toutes les billes sont en suspension dans le mélange de référence pour PCR.

Pour les tubes d'index (T),

30. (T) Passez au vortex et agitez les tubes d'index par pulsations pour que tout le volume soit au fond du tube.
31. (T) Retirez le film Microseal B de la plaque d'échantillons.
32. (T) Ajoutez 5 µl de l'index i7 dans chaque puits, selon la disposition de la plaque de la fiche 1.0 Sample_Prep.
33. (T) Ajoutez 5 µl de l'index i5 dans chaque puits, selon la disposition de la plaque de la fiche 1.0 Sample_Prep. Reprenez à l'étape 34.

Pour la plaque d'index (P),

30. (P) Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger la plaque d'index à 1 800 tr/minute pendant 1 minute.
31. (P) Centrifugez la plaque d'index à 100 x g pendant 10 secondes pour s'assurer que la totalité du volume se trouve au fond du puits.
32. (P) Retirez le film Microseal B de la plaque d'échantillons.
33. (P) **Veillez confirmer la bonne orientation de la plaque et le bon ensemble d'index. Ne retirez pas le film en aluminium.** Percez le film en aluminium de la plaque d'index avec un objet pointu. À l'aide d'un nouvel embout, transférez 10 µL des index combinés depuis la plaque d'index dans chaque puits d'échantillon, selon la disposition de la plaque de la feuille 1.0 Sample_Prep sheet. Reprenez à l'étape 34.

34. Scellez la plaque avec un nouveau film Microseal B.
35. Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1 800 tr/minute pendant 1 minute à température ambiante.
36. Centrifugez la plaque à 100 x g pendant 10 secondes pour recueillir tous les réactifs au fond du puits. Inspectez visuellement pour vérifier que les billes sont réparties régulièrement dans la solution. Si les billes ne sont pas distribuées régulièrement, répétez l'agitation selon l'étape 35.
37. Placez la plaque dans le thermocycleur et exécutez le programme PCR avec le couvercle chauffé à 105 °C, et un volume de réaction de 50 µl :

#	Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
1	Comblement des espaces	72°C	3 minutes	1
2	Dénaturation initiale	98°C	3 minutes	1
3	Dénaturation	98°C	20 secondes	9
4	Annelage	60°C	30 secondes	
5	Extension	72°C	3 minutes	
6	Extension finale	72°C	3 minutes	1
7	Attente finale	10°C	Attente	1

REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Les banques peuvent être stockées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 semaine.

REMARQUE : si vous effectuez immédiatement la sélection de taille et la purification, vérifiez que les Purification Beads sont à température ambiante avant l'utilisation.

2.3 Sélection de la taille et purification

1. Pour optimiser le rendement et la sélection de la taille, l'échantillon, les billes et le volume de surnageant varient en fonction du volume de la session. Le tableau ci-dessous souligne les volumes testés pour la plage spécifiée d'échantillons par session.

Volumes de réactifs pour les calculs	6 - 24 échantillons/pools	25 - 48 échantillons/pools	49 - 96 échantillons/pools
Nombre d'échantillons à regrouper (max. Indiqué pour les plages)	24	48	96
Volume de la banque à regrouper par échantillon (µl)	10	5	2.5
Volume de billes diluées par échantillon (µl)	50	25	12.5
Volume de surnageant transféré par échantillon (µl)	55	27.5	13.75
Volume de billes non diluées par échantillon, étape 8 (µl)	4.4	2.2	1.1

2. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par échantillon (µl)	Préparation requise
Purification Beads (Purification Beads – 1 pour kits de 96 tests)	2°C à 8°C BOÎTE 5	24.7	Amener à température ambiante, pendant au moins 30 min. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.

Réactif	Conditions de stockage	Volume par échantillon (µl)	Préparation requise
Eau stérile	15°C à 30°C Fourni par l'utilisateur	Varié	Aucune préparation requise
Éthanol à 100 %	15°C à 30°C Fourni par l'utilisateur	1920	Préparer de l'éthanol à 80 % selon les instructions ci-dessous.
Resuspension Buffer	2°C à 8°C BOÎTE 5	Varié	Amener à température ambiante. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.

3. Préparez des Purification Beads diluées avec des Purification Beads et de l'eau stérile, en utilisant les calculs de volume du document *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. Vérifiez que les Purification Beads sont soigneusement passées au vortex avant utilisation.
4. Préparez 2 400 µl d'éthanol à 80 % frais par pool, suffisamment pour effectuer 2 lavages, à l'aide de 1 920 µl d'éthanol à 100 % et 480 µl d'eau stérile.

REMARQUE : le nombre de pools par expérience est prédéfini sur 1 dans la cellule jaune à l'étape 3 du cahier de travail. Cette valeur peut être modifiée manuellement si nécessaire. La modification de cette cellule mettra à jour le nombre de pools pour les étapes suivantes de ce protocole/cahier de travail. Si plusieurs pools doivent être traités dans cette expérience, avec le même nombre d'échantillons par pool, le volume de Purification Beads doit être augmenté en conséquence (c.-à-d. doublé pour deux pools), et les instructions ci-dessous doivent être suivies en totalité pour chaque pool.

Si plusieurs pools ayant différents nombres d'échantillons sont requis, cet onglet du cahier de travail doit être dupliqué et les cellules en jaune sont alors mises à jour pour refléter le nombre d'échantillons, de sorte que les volumes de réactif requis/transférés soient correctement ajustés. Pour dupliquer l'onglet, cliquez avec le bouton droit sur l'un des onglets et sélectionnez « Move or Copy » (Déplacer ou copier) sélectionnez « 3.0_SS_Purification » dans la liste, cochez la case « Créer une copie » et cliquez sur « OK ».

5. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
6. Réunissez des tubes de 1,5 ml (**facultatif** : Des tubes de 2 ml tubes peuvent être utilisés s'ils sont privilégiés, en augmentant le volume de lavage à l'éthanol de 1 200 µl à 1 500 µl à l'étape 20a ci-dessous).

REMARQUE : Le processus dure environ 1 heure.

7. Aliquotez un volume approprié (voir le tableau des calculs ci-dessus ou le cahier de travail) de Purification Beads dans le tube de 1.5 mL.
8. Mélangez à la pipette les Tagmentation beads et le surnageant de la PCR d'indexation **ou** agitez la plaque PCR d'indexation pendant 1 minute à 1 800 tr/min, puis ajoutez un volume approprié de chaque échantillon (voir le tableau des calculs ci-dessus ou le cahier de travail) dans le tube contenant les Purification Beads diluées.
9. Passez chaque tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes jusqu'à ce que l'échantillon semble homogène lors de l'inspection visuelle.
10. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes. Pendant cette incubation, les plus gros fragments se lient aux billes.
11. Agitez rapidement le tube par impulsions.
12. Placez le tube sur l'aimant pendant 2,5 minutes pour que les billes se regroupent autour de l'aimant. Si le surnageant reste trouble, laissez-le sur l'aimant jusqu'à ce qu'il devienne transparent.
13. **Transférez** le volume approprié (voir le tableau de calcul ci-dessus ou le cahier de travail) de surnageant dans un nouveau tube.

14. Ajoutez un volume approprié (voir le tableau de calcul ci-dessus ou le cahier de travail) de Purification Beads (non diluées) dans le tube contenant le surnageant.
15. Passez chaque tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
16. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes. Pendant cette incubation, les fragments ayant la taille cible se lient aux billes.
17. Agitez rapidement le tube par impulsions.
18. Placez le tube sur l'aimant pendant 2,5 minutes pour que les billes se regroupent autour de l'aimant. Si le surnageant reste trouble, laissez-le sur l'aimant jusqu'à ce qu'il devienne transparent.
19. À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.
20. En maintenant le tube sur l'aimant, rincez deux fois avec de l'éthanol à 80 % :
 - a) Ajoutez 1 200 µl d'éthanol à 80 % à chaque tube,
 - b) Incubez à température ambiante pendant 30 secondes,
 - c) À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez tout le surnageant,
 - d) Répétez les étapes a) à c) pour un total de 2 lavages.
21. Éliminez tout le surnageant restant avec une pipette P20.
22. Laissez sécher le tube pendant 5 minutes à température ambiante pour que l'éthanol résiduel s'évapore.
23. Retirez le tube de l'aimant et ajoutez 37 µl de Resuspension Buffer à chaque tube pour éluer les fragments cibles.
24. Passez chaque tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
25. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
26. Agitez rapidement le tube par impulsions.
27. Placez le tube sur l'aimant pendant 30 secondes pour que les billes se regroupent dans les tubes autour de l'aimant.
28. **Transférez** 35 µl de surnageant vers un nouveau tube de 1,5 ml pour le stockage. Ce pool peut passer à l'hybridation.

REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Les banques peuvent être stockées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 mois.

2.4 Quantification Qubit (facultatif)

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
Qubit BR buffer	-25 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	199	Aucune préparation requise
Qubit BR dye	-25 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	1	Aucune préparation requise
BR Standard #1	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	10	Amener à température ambiante.
BR Standard #2	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	10	Amener à température ambiante.

2. Rassemblez les tubes Qubit et un tube de 1,5 ml ou 5 ml pour la préparation de la solution de travail, selon le volume requis.
3. Préparez deux tubes d'essai pour les étalons et un pour chaque pool.
4. Préparez la solution de travail Qubit de 200 µl avec 199 µl de Qubit buffer et 1 µl de teinture Qubit par pool/étalon pour la quantification.
5. Passez la solution de travail au vortex pendant 2 à 3 secondes, puis agitez par impulsion.
6. Aliquotez **190 µl** de solution de travail dans chacun des tubes d'étalon.
7. Aliquotez **198 µl** de solution de travail dans chacun des tubes de pool.

8. Aliquotez **10 µl** de solution étalon dans chacun des tubes d'étalon correspondants.
9. Aliquotez **2 µl** de chaque pool dans le tube respectif.
10. Passez tous les tubes au vortex pendant 2 à 3 secondes, puis agitez par pulsation.
11. Incubez les tubes à température ambiante pendant 2 minutes.
12. Insérez les tubes dans le fluorimètre Qubit et obtenez les résultats (consultez le protocole du fabricant de Qubit pour plus de renseignements).
13. Enregistrez les résultats de Qubit dans le tableau du cahier de travail pour calculer la moyenne par pool.

REMARQUE : Le rendement attendu de la librairie est d'environ 30–100 ng/µl, mais peut varier selon la qualité de l'ADN du matériel ajouté. Un rendement de 10 ng/µl ou plus donne des résultats d'enrichissement satisfaisants.

2.5 Visualisation TapeStation (facultatif)

REMARQUE : des systèmes alternatifs de visualisation des fragments, tels qu'un analyseur de fragments, un bioanalyseur ou une solution similaire peuvent être utilisés après la validation de l'utilisateur.

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par échantillon (µl)	Préparation requise
D1000 Ladder	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	1	Amener à température ambiante.
D1000 Sample Buffer	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	3	Amener à température ambiante.

2. Rassemblez la D1000 ScreenTape, et les bandes de tubes optiques et les capuchons TapeStation requis.
3. Transférez 1 µl de chaque banque pré-enrichie dans un nouveau tube.
4. Ajoutez 1 µl de D1000 Ladder dans un tube de référence.
5. Ajoutez 3 µl de D1000 sample buffer dans chaque tube de banque pré-enrichie et tube de référence.
6. Scellez tous les tubes avec des capuchons.
7. Mélangez abondamment tous les tubes au vortex IKA à 2 000 tr/m pendant 1 minute.
8. Centrifugez brièvement pour que tous les échantillons soient au fond des tubes.
9. Débouchez et chargez les tubes d'échantillons dans l'instrument 2200 TapeStation
10. Sélectionnez les tubes requis dans le logiciel 2200 TapeStation Controller et analysez les échantillons (consultez le mode d'emploi du TapeStation pour plus de renseignements).
11. Une fois l'analyse terminée, démarrez le logiciel TapeStation Analysis pour consulter les résultats (consultez le mode d'emploi du TapeStation pour plus de renseignements).
12. Enregistrez les résultats dans le cahier de travail.

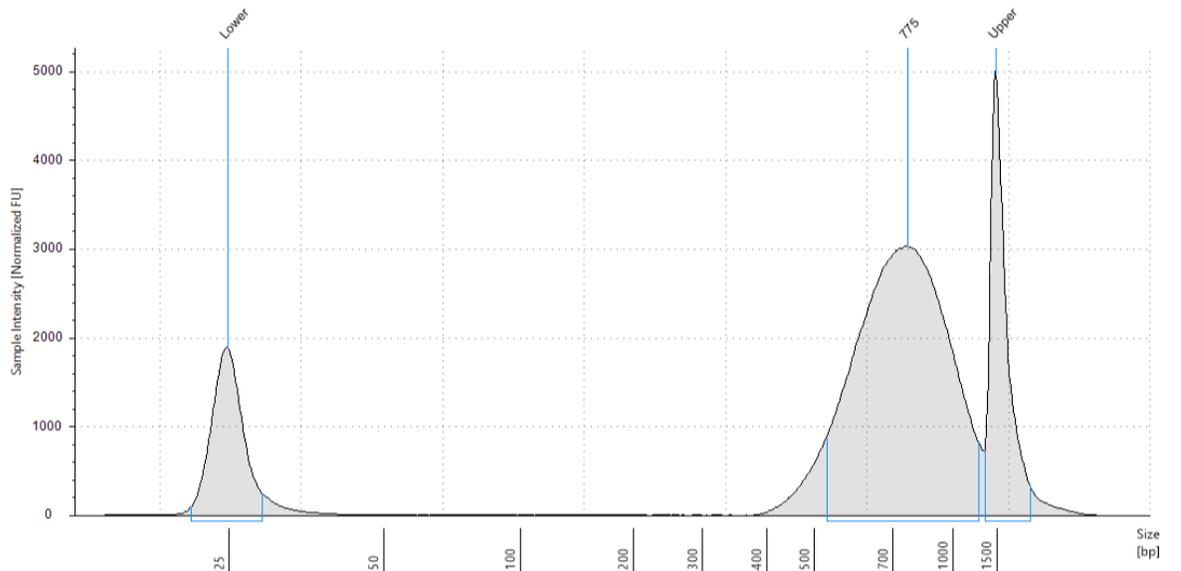


Figure 2.5.1 : Illustration représentative du tracé TapeStation pour les banques.

3. Capture hybride (workflow Early Pooling)

3.0 Introduction au protocole

- Suivez le protocole d'AlloSeq Tx ci-dessous dans l'ordre indiqué et à l'aide des paramètres spécifiés.
- Avant de procéder, vérifiez le contenu du kit et assurez-vous que vous disposez des consommables et de l'équipement nécessaires.
- Pour faciliter l'utilisation, les étapes du protocole de capture hybride sont également détaillées dans le document *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD*. Les références au cahier de travail du chapitre 3 correspondent à ce cahier de travail.

3.1 Hybridation de sonde

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
AlloSeq Tx Probe Panel	-15 °C à -25 °C BOX 4	10	Amener à température ambiante.
Hybridisation Buffer 1	-15 °C à -25 °C BOX 4	50	Placer dans l'Hybex à 58 °C pendant 15 minutes. Agiter au vortex et inspecter visuellement, si le précipité reste, incubez à 58 °C pendant 15 minutes supplémentaires.
Hybridisation Buffer 2	2 °C à 8 °C BOX 5	10	Amener à température ambiante.

2. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
3. Rassemblez les tubes et bandes pour PCR et les capuchons.

REMARQUE : il n'est pas possible de s'arrêter en toute sécurité avant la fin du protocole de capture. Les pools d'échantillons doivent passer immédiatement de l'étape d'attente à 62 °C de la réaction de thermocyclage de l'hybridation aux étapes de captures des billes et de lavage à chaud.

REMARQUE : le processus nécessite une mise en place de 20 minutes et entre 1,5 et 18 heures de thermocycleur (les réactions effectuées pendant la nuit ou plus de 18 heures doivent être en attente à une température de 62 °C lors de la dernière étape d'attente de la réaction).

- Pour chaque réaction d'hybridation, associez les réactifs suivants dans l'ordre répertorié ci-dessous dans un tube ou une bande pour PCR.

Réactif	Volume par pool (µl)
Pool de banques d'échantillon	30
AlloSeq Tx Probe Panel	10
Hybridisation Buffer 1	50
Hybridisation Buffer 2	10
Total	100

- Avec une pipette réglée sur 70 µl, mélangez bien chaque puits de réaction d'hybridation 10 fois, bouchez et agitez par impulsions.
- Si la solution reste trouble, mélangez de nouveau 6 à 8 fois, rebouchez, puis agitez par impulsion.
- Placez le tube ou la bande dans le thermocycleur et exécutez le programme d'hybridation avec le couvercle chauffé à **100 °C**, et un volume de réaction de 100 µl :

#	Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
1	Dénaturation	98°C	5 minutes	1
2	Baisse de pression	98 °C - 62 °C, réduction de 2 °C/cycle	1 minute	1
3	Passez à l'étape 2 pour 18 cycles supplémentaires (total de 19 cycles) en réduisant de 2 °C/cycle.			
4	Hybridation	62°C	60 minutes	1
5	Attente finale	62°C	Maintenez (ne pas dépasser 18 heures à 62 °C, en comptant l'étape n° 4)	1

- Laissez le tube/la plaque dans le thermocycleur jusqu'à ce qu'il soit prêt pour la capture. Vérifiez que les Capture Beads ont atteint la température ambiante et que le Capture Wash Buffer et l'Hybex sont chauffés à 58 °C.

3.2 Capture

- Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
Capture Beads	2 °C à 8 °C BOX 5	250	Amener à température ambiante, pendant au moins 30 min.
Capture Wash Buffer	-15 °C à -25 °C BOX 4	800	Préchauffer à 58 °C avant utilisation.
Capture Elution Buffer 1	-15 °C à -25 °C BOX 4	28.5	Amener à température ambiante.
2N NaOH	-15 °C à -25 °C BOX 4	1.5	Amener à température ambiante. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.
Capture Elution Buffer 2	2 °C à 8 °C BOX 5	4	Amener à température ambiante.

- Préparez un mélange de référence d'éluion des réactifs suivants, selon le pool à capturer :

Réactif	Volume par pool (µl)
Capture Elution Buffer 1	28.5
2N NaOH (frais)	1.5

REMARQUE : La solution de NaOH absorbera immédiatement le CO₂ de l'atmosphère, ce qui altère le pH et les performances du réactif. Vérifiez que le tube de 2N NaOH est scellé lorsqu'il n'est pas utilisé.

3. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
4. Rassemblez les tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml, les tubes et bandes pour PCR et les capuchons.

REMARQUE : le processus dure environ 1 heure.

5. Pour chaque réaction d'hybridation, ajoutez 250 µl de Capture Beads à un tube de 1,5 ml propre.
6. **Transférez** 100 µl de chaque réaction d'hybridation dans le tube correspondant contenant les Capture Beads.
7. Passez le tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes. N'utilisez pas de centrifugeuse ou d'agitation par impulsions.
8. Incubez le tube à 58 °C dans l'Hybex pendant 15 minutes.
9. Agitez rapidement le tube par impulsions.
10. Placez immédiatement le tube sur l'aimant pendant 30 secondes, pour que les billes se regroupent autour de l'aimant.
11. À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.
12. Lavez trois fois avec du Capture Wash Buffer, selon les instructions ci-dessous :

REMARQUE : lorsqu'il n'est pas utilisé, le Capture Wash Buffer doit rester dans l'Hybex pour maintenir une température de 58 °C. Il doit être retiré immédiatement de l'Hybex, avant l'ajout à la réaction aux étapes 12b et 14. Travaillez rapidement lors des étapes de lavage chauffé, afin de minimiser la durée à température ambiante du pool d'échantillons et du tampon.

- a) Retirez le tube de l'aimant,
 - b) Ajoutez 200 µl de Capture Wash Buffer (58 °C),
 - c) Passez le tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes. N'utilisez pas de centrifugeuse ou d'agitation par impulsions.
 - d) Incubez le tube à 58 °C dans l'Hybex pendant 5 minutes.
 - e) Agitez par impulsions, puis placez immédiatement le tube sur l'aimant pendant 30 secondes pour que les billes se regroupent autour de l'aimant.
 - f) À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.
 - g) Répétez les étapes a) à f) deux fois de plus pour un total de 3 lavages.
13. Retirez le tube de l'aimant.
 14. Ajoutez 200 µl de Capture Wash Buffer chauffé (58 °C).
 15. Passez le tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes. N'utilisez pas de centrifugeuse ou d'agitation par impulsions.
 16. **Transférez** la totalité du contenu (solution de lavage et billes) vers un nouveau tube de 1,5 ml.

REMARQUE : cette étape de transfert est essentielle pour retirer les inhibiteurs de la PCR qui peuvent dégrader les performances de la suite du processus.

17. Incubez le tube à 58 °C dans l'Hybex pendant 5 minutes.
18. Agitez immédiatement par impulsions, puis placez immédiatement le tube sur l'aimant pendant 30 secondes, pour que les billes se regroupent autour de l'aimant.
19. À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.
20. Agitez rapidement le tube par impulsions, puis placez immédiatement le tube sur l'aimant pendant 30 secondes pour que les billes se regroupent autour de l'aimant.
21. À l'aide d'une pipette P20, aspirez et jetez tout surnageant restant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.

22. Placez le mélange de référence d'élution au vortex, puis retirez le tube de réaction de l'aimant et ajoutez 23 µl de mélange de référence d'élution dans chaque tube.
23. Passez le tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
24. Incubez à température ambiante pendant 2 minutes.
25. Agitez rapidement le tube par impulsions.
26. Placez le tube sur l'aimant pendant 30 secondes pour que les billes se regroupent autour de l'aimant.
27. **Transférez** 21 µl de surnageant vers un nouveau tube ou une nouvelle bande pour PCR.
28. Ajoutez 4 µl de Capture Elution Buffer 2.
29. Mélangez 6 à 8 fois à la pipette. Le volume final est de 25 µl.

REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Les banques peuvent être stockées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 24 heures.

3.3 PCR post-enrichissement

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
PCR Primers	-15 °C à -25 °C BOX 4	5	Décongeler sur de la glace.
PCR Mix (ou PCR Mix-2 pour kit de 96 tests)	-15 °C à -25 °C BOX 4	20	Décongeler à température ambiante, puis placer sur de la glace.

2. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
3. Rassemblez les tubes pour PCR requis contenant les banques de capture de l'étape 3.2 Capture.

REMARQUE : La configuration de ce processus prend environ 5 minutes, **1h40** dans le thermocycleur.

4. Ajoutez 5 µl de PCR Primers aux banques capturées dans le tube de PCR.
5. Ajoutez 20 µL de PCR Mix (ou de PCR Mix-2 si vous utilisez des kits de 96 tests) dans le tube.
6. Mélangez 10 fois à la pipette.
7. Agitez rapidement le tube par impulsions.
8. Placez le tube ou la bande dans le thermocycleur et exécutez le programme de PCR post-hybridation avec le couvercle chauffé à 105 °C, et un volume de réaction de 50 µl :

#	Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
1	Dénaturation	98°C	30 secondes	1
2	Dénaturation	98°C	1 minute	17
3	Annelage	60°C	30 secondes	
4	Extension	72°C	3 minutes	
5	Extension finale	72°C	5 minutes	1
6	Attente finale	10°C	Attente	1

REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Les banques peuvent être stockées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 semaine.

REMARQUE : si vous effectuez immédiatement la purification, vérifiez que les Purification Beads sont à température ambiante avant l'utilisation.

3.4 Purification de la PCR post-enrichissement

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
Purification Beads (Purification Beads-2 pour kit de 96 tests)	2 °C à 8 °C BOX 5	27	Amener à température ambiante, pendant au moins 30 min.
Eau stérile	15 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	80	Aucune préparation requise
Éthanol à 100 %	15 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	320	Préparer de l'éthanol à 80 % selon les instructions ci-dessous.
Resuspension Buffer	2 °C à 8 °C BOX 5	32	Amener à température ambiante. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.

2. Préparez de l'éthanol à 80 % frais (2 lavages par pool) à l'aide de 480 µl d'éthanol à 100 % et de 120 µl d'eau stérile (un volume excédentaire est inclus).
3. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
4. Rassemblez les tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml.

REMARQUE : ce processus prend environ **30** minutes.

5. Pour chaque réaction de purification, ajoutez 27 µl de Purification Beads soigneusement vortexées à un tube de 1,5 ml propre.
6. **Transférez** 45 µl de chaque réaction de PCR post-enrichissement dans le tube correspondant contenant les Purification Beads.
7. Passez chaque tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
8. Agitez rapidement le tube par impulsions.
9. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
10. Placez le tube sur l'aimant pendant 30 secondes pour que les billes se regroupent autour de l'aimant.
11. À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.
12. En maintenant le tube sur l'aimant, rincez deux fois avec de l'éthanol à 80 % :
 - a) Ajoutez 200 µl d'éthanol à 80 % à chaque tube,
 - b) Incubez à température ambiante pendant 30 secondes,
 - c) À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez tout le surnageant,
 - d) Répétez les étapes a) à c) pour un total de 2 lavages.
13. Éliminez tout le surnageant restant avec une pipette P20.
14. Laissez sécher le tube pendant 5 minutes à température ambiante pour que l'éthanol résiduel s'évapore.
15. Retirez le tube de l'aimant et ajoutez 32 µl de Resuspension Buffer à chaque tube pour éluer les fragments cibles.
16. Passez chaque tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
17. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
18. Agitez rapidement le tube par impulsions.
19. Placez le tube sur l'aimant pendant 30 secondes pour que les billes se regroupent dans les tubes autour de l'aimant.
20. **Transférez** 30 µl de surnageant vers un nouveau tube de 1,5 ml pour le stockage.

REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Les banques peuvent être stockées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 mois.

3.5 Quantification Qubit

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
Qubit BR buffer	-25 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	199	Aucune préparation requise
Qubit BR dye	-25 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	1	Aucune préparation requise
BR Standard #1	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	10	Amener à température ambiante.
BR Standard #2	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	10	Amener à température ambiante.

2. Rassemblez les tubes Qubit et un tube de 1,5 ml ou 5 ml pour la préparation de la solution de travail, selon le volume requis.
3. Préparez deux tubes d'essai pour les étalons et un pour chaque pool.
4. Préparez la solution de travail Qubit de 200 µl avec 199 µl de Qubit buffer et 1 µl de teinture Qubit par pool/étalon pour la quantification.
5. Passez la solution de travail au vortex pendant 2 à 3 secondes, puis agitez par impulsion.
6. Aliquotez **190 µl** de solution de travail dans chacun des tubes d'étalon.
7. Aliquotez **198 µl** de solution de travail dans chacun des tubes de pool.
8. Aliquotez **10 µl** de solution étalon dans chacun des tubes d'étalon correspondants.
9. Aliquotez **2 µl** de chaque pool dans le tube respectif.
10. Passez tous les tubes au vortex pendant 2 à 3 secondes, puis agitez par pulsation.
11. Incubez les tubes à température ambiante pendant 2 minutes.
12. Insérez les tubes dans le fluorimètre Qubit et obtenez les résultats (consultez le protocole du fabricant de Qubit pour plus de renseignements).
13. Enregistrez les résultats de Qubit dans le tableau du cahier de travail pour calculer la concentration moyenne.

3.6 Visualisation TapeStation (facultatif)

REMARQUE : des systèmes alternatifs de visualisation des fragments, tels qu'un analyseur de fragments, un bioanalyseur ou une solution similaire peuvent être utilisés après la validation de l'utilisateur.

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
D1000 Ladder	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	1	Amener à température ambiante.
D1000 Sample Buffer	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	3	Amener à température ambiante.

2. Rassemblez la D1000 ScreenTape, et les bandes de tubes optiques et les capuchons TapeStation requis.
3. Transférez 1 µl de chaque pool dans un nouveau tube.
4. Ajoutez 1 µl de D1000 Ladder dans un tube de référence.
5. Ajoutez 3 µl de D1000 sample buffer dans chaque tube de pool et de référence.
6. Scellez tous les tubes avec des capuchons.
7. Mélangez abondamment tous les tubes au vortex IKA à 2 000 tr/m pendant 1 minute.
8. Centrifugez brièvement pour que tous les échantillons soient au fond des tubes.
9. Débouchez et chargez les tubes d'échantillons dans l'instrument 2200 TapeStation
10. Sélectionnez les tubes requis dans le logiciel 2200 TapeStation Controller et analysez les échantillons (consultez le mode d'emploi du TapeStation pour plus de renseignements).

11. Une fois l'analyse terminée, démarrez le logiciel TapeStation Analysis pour consulter les résultats (consultez le mode d'emploi du TapeStation pour plus de renseignements).
12. Enregistrez les résultats dans le tableau du cahier de travail.

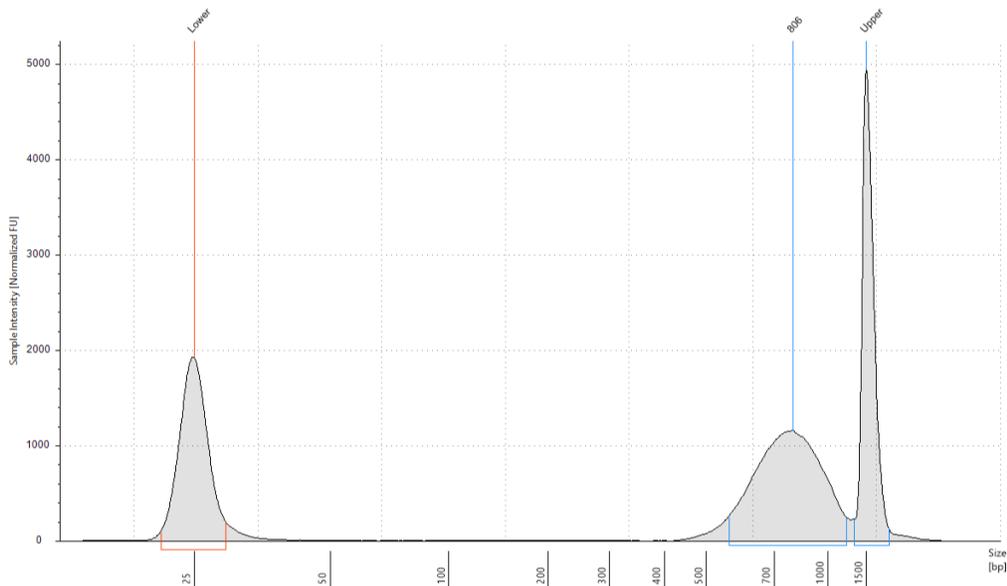


Figure 3.6.1 : Illustration représentative du tracé de TapeStation pour pools de banques enrichies.

4. Préparation de la banque (workflow original)

4.0 Introduction au protocole

- Suivez le protocole d'AlloSeq Tx ci-dessous dans l'ordre indiqué et à l'aide des paramètres spécifiés.
- Avant de procéder, vérifiez le contenu du kit et assurez-vous que vous disposez des consommables et de l'équipement nécessaires.
- Pour faciliter l'utilisation, les étapes du protocole de préparation de librairie sont également détaillées dans le document *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD*. Les références au cahier de travail du chapitre 4 correspondent à ce cahier de travail.

4.1 Préparation des échantillons

1. Saisissez un identifiant d'expérience, une description, un opérateur et la date dans le cahier de travail.
2. Sélectionnez l'ensemble de sondes AlloSeq à utiliser pour l'expérience dans le menu déroulant du cahier de travail.
3. Sélectionnez le type de séquenceur à utiliser dans le menu déroulant du cahier de travail.
4. Saisissez l'identifiant des échantillons à tester dans la partie jaune de la disposition de la plaque dans le cahier de travail, selon la configuration souhaitée.

REMARQUE : n'utilisez que des caractères alphanumériques. Les ID d'échantillons en double seront marqués en rouge pour inviter l'utilisateur à le corriger. Le logiciel du séquenceur exige d'avoir des identifiants d'échantillon uniques dans chaque session. N'entrez aucune information pour les puits qui ne contiendront pas d'échantillons.

5. Sélectionnez l'ensemble d'index dans le menu déroulant orange sous Plate Layout (Disposition de la plaque) dans le cahier de travail.
6. Si nécessaire et à l'aide du format d'index des tubes, l'ordre d'index i7 peut être modifié. Sélectionnez l'index i7 alternatif à utiliser depuis le menu déroulant options pour la colonne requise. Si des index i7 dupliqués sont sélectionnés, les cellules sont marquées en rouge pour que l'utilisateur puisse les corriger.

7. Si nécessaire et à l'aide du format d'index des tubes, l'ordre d'indice i5 peut être modifié. Sélectionnez l'index i5 alternatif à utiliser depuis le menu déroulant Options pour la ligne requise. Si des index i5 dupliqués sont sélectionnés, les cellules sont marquées en rouge pour que l'utilisateur puisse les corriger.
8. Une fois toutes les actions ci-dessus terminées, cliquez sur l'onglet 1.2 SampleSheet et vérifiez. Le texte en rouge sera utilisé pour indiquer où des informations restent requises. Si aucun texte en rouge n'est visible, l'onglet SampleSheet peut être enregistré comme un fichier CSV (délimité par des virgules) (*.csv). Enregistrez le fichier sous le nom « SampleSheet.csv ». Enregistrer le fichier au format csv ne permet d'enregistrer que l'onglet actif. Ouvrez le fichier enregistré SampleSheet.csv dans Excel et supprimez les lignes vides dans le tableau [Data], c'est-à-dire les lignes comprises entre 22 et 117 qui ne contiennent pas de renseignements sur les échantillons. Ensuite, enregistrez le fichier. La feuille de l'échantillon est alors prête à être importée pour le séquençage à l'aide d'un séquenceur Illumina.

4.2 Préparation de la banque

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par échantillon (µl)	Préparation requise
Tagmentation Buffer	-15 °C à -25 °C BOÎTE 1	10	Amener à température ambiante.
Eau stérile	15°C à 30°C Fourni par l'utilisateur	30	Aucune préparation requise
Tagmentation Beads	-15 °C à -25 °C BOÎTE 1	10	Amener à température ambiante, pendant au moins 30 min.
Stop Buffer	15°C à 30°C BOÎTE 2	10	Aucune préparation requise
Tagmentation Wash Buffer	15°C à 30°C BOÎTE 2	300	Aucune préparation requise
PCR Mix (ou PCR Mix-1 pour kit de 96 tests)	-15 °C à -25 °C BOÎTE 4 (ou BOÎTE 1 pour kit de 96 tests)	20	À décongeler et à conserver sur glace. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.
Index : ASTX17.1(24)-IVD : H503, H505, H506, H517, H705, H706, H707, H710, H711, H714 ASTX17.1(24)-B-IVD : H502, H507, H508, H521, H701, H702, H703, H704, H712, H715 ASTX17.1(96)-A-IVD/ASTX9.1(96)-A-IVD : H503, H505, H506, H517, H502, H507, H508, H521, H705, H706, H707, H710, H711, H714, H701, H702, H703, H704, H712, H715 ASTX17.1(96)-B-IVD/ASTX9.1(96)-B-IVD : H510, H511, H513, H522, H515, H516, H518, H520, H716, H718, H719, H720, H721, H722, H723, H724, H726, H727, H728, H729	-15 °C à -25 °C BOÎTE 3	10 au total	À décongeler et à conserver sur glace.

2. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
3. Rassemblez la plaque de 96 puits demi-jupée, du film Microseal B et des tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml ou tubes de 5 mL.

REMARQUE : Il n'est pas possible de s'arrêter en toute sécurité avant l'indexation de la PCR. Le processus dure environ **1h50** (dont 50 min de thermocyclage de la PCR).

4. Pour chaque échantillon d'ADN, aliquotez 10 µl d'un échantillon de 10 à 100 ng/µl dans le puits approprié d'une plaque pour PCR, conformément à la disposition de la plaque du document 1.0 Sample_Prep sheet.
5. Préparez 40 µl de Tagmentation Master Mix par échantillon, avec : 10 µl de Tagmentation Buffer, 20 µl d'eau stérile et 10 µl de Tagmentation Beads.
6. Mélangez le mélange de référence ci-dessus au vortex puis mélangez par impulsions.
7. Avec une pipette, prélevez 40 µl de Tagmentation Master Mix dans chaque puits qui contient un échantillon d'ADN.
8. Scellez la plaque avec du film Microseal B.
9. Centrifugez la plaque à 100 x g pendant 10 secondes pour recueillir tous les réactifs au fond du puits.
10. Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1 600 tr/minute pendant 1 minute.
11. Inspectez visuellement la plaque :
 - a) Si les billes ne sont pas bien distribuées dans le puits, répétez l'agitation à partir de l'étape 10,
 - b) Si le matériel n'est pas au fond du puits ou s'est éclaboussé sur le film Microseal B, mélangez par impulsions et répétez l'agitation de l'étape 10.
12. Placez la plaque dans le thermocycleur et exécutez le programme de tagmentation avec le couvercle chauffé à 105 °C, et un volume de réaction de 50 µl :

Température	Durée
55°C	5 minutes
10°C	2 minutes

13. Une fois le programme terminé, retirez immédiatement la plaque du thermocycleur et laissez-la à température ambiante pendant 2 minutes.
14. Retirez le film Microseal B.
15. Ajoutez 10 µl de Stop Buffer dans chaque puits de réaction.
16. Rescellez la plaque avec un nouveau film Microseal B.
17. Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1 600 tr/minute pendant 1 minute.
18. Incubez la plaque pendant 5 minutes supplémentaires à température ambiante.
19. Pendant l'incubation, retirez le PCR Mix (ou PCR Mix-1 si vous utilisez les kits de 96 tests) et les index du congélateur pour les faire décongeler, puis placez-les sur de la glace ou un plateau froid.
20. Inspectez visuellement la plaque, si le matériel est au fond du puits ou s'est éclaboussé sur le film Microseal B, mélangez la plaque par impulsions.
21. Lavez trois fois avec du Tagmentation Wash Buffer, selon les instructions ci-dessous :
 - a) Retirez le film Microseal B et placez la plaque sur le stand magnétique-96 pendant 1 minute, pour permettre aux billes de s'accumuler dans les puits à proximité de l'aimant,
 - b) À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les puits avec l'aimant,
 - c) Ajoutez doucement 100 µl de Tagmentation Wash Buffer dans chaque puits,
 - d) Rescellez la plaque avec un nouveau film Microseal B et vérifiez qu'il est correctement fixé,
 - e) Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1 800 tr/minute pendant 2 minutes à température ambiante,
 - f) **ATTENTION :** Si des échantillons ont éclaboussé le film, centrifugez à 100 x g pendant 10 secondes avant de retirer le film,
 - g) Répétez les étapes a) à f) deux fois de plus pour un total de 3 lavages.

REMARQUE : Avant d'éliminer le surnageant du troisième lavage, préparez le mélange de référence pour PCR selon les instructions suivantes :

22. Préparez 40 µl de PCR master mix à l'aide de 20 µl d'eau stérile et de 20 µl de PCR Mix (ou PCR Mix-1 en cas d'utilisation de kits pour 96 tests).

REMARQUE : le PCR Mix est utilisé pour les étapes suivantes du protocole. Ne jetez pas ce flacon.

23. Retirez le film Microseal B et placez la plaque sur le stand magnétique-96 pendant 1 minute, pour permettre aux billes de s'accumuler dans les puits à proximité de l'aimant.
24. Avec une pipette de 100 µl, aspirez et jetez le surnageant du lavage de tagmentation final.
25. Retirez la plaque du support magnétique.
26. Ajoutez 40 µl du mélange de référence pour PCR à chaque puits.
27. Scellez la plaque avec du film Microseal B.
28. Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1 800 tr/minute pendant 2 minutes à température ambiante.
29. Centrifugez la plaque à 100 x g pendant 10 secondes pour s'assurer que toutes les billes sont en suspension dans le mélange de référence pour PCR.

Pour les tubes d'index (T),

30. (T) Passez au vortex et agitez les tubes d'index par pulsations pour que tout le volume soit au fond du tube.
31. (T) Retirez le film Microseal B de la plaque d'échantillons.
32. (T) Ajoutez 5 µl de l'index i7 dans chaque puits, selon la disposition de la plaque de la fiche 1.0 Sample_Prep.
33. (T) Ajoutez 5 µl de l'index i5 dans chaque puits, selon la disposition de la plaque de la fiche 1.0 Sample_Prep. Reprenez à l'étape 34.

Pour la plaque d'index (P),

30. (P) Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger la plaque d'index à 1 800 tr/minute pendant 1 minute.
31. (P) Centrifugez la plaque d'index à 100 x g pendant 10 secondes pour s'assurer que la totalité du volume se trouve au fond du puits.
32. (P) Retirez le film Microseal B de la plaque d'échantillons.
33. (P) **Veillez confirmer la bonne orientation de la plaque et le bon ensemble d'index. Ne retirez pas le film en aluminium.** Percez le film en aluminium de la plaque d'index avec un objet pointu. À l'aide d'un nouvel embout, transférez 10 µL des index combinés depuis la plaque d'index dans chaque puits d'échantillon, selon la disposition de la plaque de la feuille 1.0 Sample_Prep sheet. Reprenez à l'étape 34.
34. Scellez la plaque avec un nouveau film Microseal B.
35. Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1 800 tr/minute pendant 1 minute à température ambiante.
36. Centrifugez la plaque à 100 x g pendant 10 secondes pour recueillir tous les réactifs au fond du puits. Inspectez visuellement pour vérifier que les billes sont réparties régulièrement dans la solution. Si les billes ne sont pas distribuées régulièrement, répétez l'agitation selon l'étape 35.
37. Placez la plaque dans le thermocycleur et exécutez le programme PCR avec le couvercle chauffé à 105 °C, et un volume de réaction de 50 µl :

#	Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
1	Comblement des espaces	72°C	3 minutes	1
2	Dénaturation initiale	98°C	3 minutes	1
3	Dénaturation	98°C	20 secondes	9
4	Annelage	60°C	30 secondes	
5	Extension	72°C	3 minutes	
6	Extension finale	72°C	3 minutes	1
7	Attente finale	10°C	Attente	1

REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Les banques peuvent être stockées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 semaine.

REMARQUE : si vous effectuez immédiatement la sélection de taille et la purification, vérifiez que les Purification Beads sont à température ambiante avant l'utilisation.

4.3 Sélection de la taille et purification

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par échantillon (µl)	Préparation requise
Purification Beads (Purification Beads – 1 pour kits de 96 tests)	2°C à 8°C BOÎTE 5	110.8	Amener à température ambiante, pendant au moins 30 min. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.
Eau stérile	15°C à 30°C Fourni par l'utilisateur	215	Aucune préparation requise
Éthanol à 100 %	15°C à 30°C Fourni par l'utilisateur	320	Préparer de l'éthanol à 80 % selon les instructions ci-dessous.
Resuspension Buffer	2°C à 8°C BOÎTE 5	17	Amener à température ambiante. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.

- Préparez les Purification Beads diluées avec 90 µl de Purification Beads et 135 µl d'eau stérile par échantillon. Vérifiez que les Purification Beads sont soigneusement passées au vortex avant utilisation.
- Préparez 600 µl d'éthanol à 80 % frais par échantillon, de quoi faire 2 lavages, à l'aide de 480 µl d'éthanol à 100 % et 120 µl d'eau stérile (un volume excédentaire est inclus).
- Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
- Rassemblez la plaque MIDI requise, le Microseal B et les plaques pour PCR.

REMARQUE : Le processus dure environ 1 heure.

- Aliquotez 225 µl de Purification Beads diluées dans le puits approprié d'une plaque MIDI (conformément à la disposition de la plaque du document 1.0 Sample_Prep sheet).
- Mélangez à la pipette les Tagmentation beads et le surnageant de la PCR d'indexation **ou** agitez la plaque de PCR d'indexation pendant 1 minute à 1 800 tr/min, puis ajoutez 45 µl de chaque mélange dans le puits correspondant de la plaque MIDI contenant les Purification Beads diluées.
- Scellez la plaque MIDI avec du film Microseal B.
- Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1 800 tr/minute pendant 2 minutes.
- Incubez la plaque à température ambiante pendant 5 minutes. Pendant cette incubation, les plus gros fragments se lient aux billes.
- Centrifugez la plaque à 280 x g pendant 1 minute.
- Retirez le film Microseal B et placez la plaque sur le stand magnétique-96 pendant 5 minutes, pour permettre aux billes de s'accumuler dans les puits à proximité de l'aimant.
- Transférez 260 µl du surnageant dans une nouvelle plaque MIDI ou nettoyez les puits de la même plaque.**
- Ajoutez 20,8 µl de Purification Beads (non diluées) abondamment vortexées à chaque échantillon. Scellez avec un film Microseal B.
- Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1800 tr/minute pendant 1 minute.
- Incubez la plaque à température ambiante pendant 5 minutes. Pendant cette incubation, les fragments ayant la taille cible se lient aux billes.
- Retirez le film Microseal B et placez la plaque sur le stand magnétique-96 pendant 5 minutes, pour permettre aux billes de s'accumuler dans les puits à proximité de l'aimant.

18. À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les puits avec l'aimant.
19. En maintenant la plaque sur l'aimant, lavez deux fois avec de l'éthanol à 80 % :
 - a) Ajoutez 200 µl d'éthanol à 80 % à chaque échantillon,
 - b) Incubez à température ambiante pendant 30 secondes,
 - c) À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez tout le surnageant,
 - d) Répétez les étapes a) à c) pour un total de 2 lavages.
20. Éliminez tout le surnageant restant avec une pipette P20.
21. Laissez sécher la plaque pendant 5 minutes à température ambiante pour que l'éthanol résiduel s'évapore.
22. Ajoutez 17 µl de Resuspension Buffer dans chaque puits pour éluer les fragments cibles.
23. Scellez la plaque avec du film Microseal B.
24. Utilisez le mélangeur pour plaque pour mélanger à 1 800 tr/minute pendant 2 minutes.
25. Incubez la plaque à température ambiante pendant 5 minutes.
26. Centrifugez la plaque à 280 x g pendant 30 secondes.
27. Retirez le film Microseal B et placez la plaque sur le stand magnétique-96 pendant 5 minutes, pour permettre aux billes de s'accumuler dans les puits à proximité de l'aimant.
28. **Transférez** 15 µl de surnageant vers une nouvelle plaque pour PCR pour le stockage.

REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Les banques peuvent être stockées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 mois.

4.4 Quantification Qubit (facultatif)

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par échantillon (µl)	Préparation requise
Qubit BR buffer	-25°C à 30°C Fourni par l'utilisateur	199	Aucune préparation requise
Qubit BR dye	-25°C à 30°C Fourni par l'utilisateur	1	Aucune préparation requise
BR Standard #1	2°C à 8°C Fourni par l'utilisateur	10	Amener à température ambiante.
BR Standard #2	2°C à 8°C Fourni par l'utilisateur	10	Amener à température ambiante.

2. Rassemblez les tubes Qubit et un tube de 1,5 ml ou 5 ml pour la préparation de la solution de travail, selon le volume requis.
3. Préparez deux tubes d'essai pour les étalons et un pour chaque échantillon.
4. Préparez la solution de travail Qubit de 200 µl avec 199 µl de Qubit buffer et 1 µl de teinture Qubit par échantillon/étalon pour la quantification.
5. Passez la solution de travail au vortex pendant 2 à 3 secondes, puis agitez par impulsion.
6. Aliquotez **190 µl** de solution de travail dans chacun des tubes d'étalon.
7. Aliquotez **198 µl** de solution de travail dans chacun des tubes d'échantillons.
8. Aliquotez **10 µl** de solution étalon dans chacun des tubes d'étalon correspondants.
9. Aliquotez **2 µl** de chaque échantillon dans chacun des tubes d'étalon.
10. Passez tous les tubes au vortex pendant 2 à 3 secondes, puis agitez par pulsation.
11. Incubez les tubes à température ambiante pendant 2 minutes.
12. Insérez les tubes dans le fluorimètre Qubit et obtenez les résultats (consultez le protocole Qubit pour plus de renseignements).
13. Enregistrez les résultats de Qubit dans le tableau du cahier de travail pour calculer la moyenne par échantillon.

REMARQUE : Le rendement attendu de la librairie est d'environ 30 ng/ μ l, mais peut varier selon la qualité de l'ADN du matériel ajouté. Un rendement de 10 ng/ μ l ou plus donne des résultats d'enrichissement satisfaisants.

4.5 Visualisation TapeStation (facultatif)

REMARQUE : des systèmes alternatifs de visualisation des fragments, tels qu'un analyseur de fragments, un bioanalyseur ou une solution similaire peuvent être utilisés après la validation de l'utilisateur.

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par échantillon (μ l)	Préparation requise
D1000 Ladder	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	1	Amener à température ambiante.
D1000 Sample Buffer	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	3	Amener à température ambiante.

- Rassemblez le D1000 ScreenTape requis, la plaque d'échantillon à 96 puits (parois fines) et le film en aluminium.
- Transférez 1 μ l de chaque librairie pré-enrichie dans une nouvelle plaque PCR de 96 puits.
- Ajoutez 1 μ l de D1000 Ladder dans un puits de référence.
- Ajoutez 3 μ l de D1000 sample buffer dans chaque puits de librairie pré-enrichie et chaque puits de référence.
- Scellez la plaque avec l'opercule en aluminium.
- Passez au vortex à l'aide du vortex pour IKA à 2 000 tr/min pendant 1 minute.
- Centrifugez brièvement pour que tous les échantillons soient au fond des puits.
- Chargez la plaque d'échantillons dans l'instrument 2200 TapeStation
- Sélectionnez les puits requis dans le logiciel 2200 TapeStation Controller et analysez les échantillons (consultez le mode d'emploi du TapeStation pour plus de renseignements).
- Une fois l'analyse terminée, démarrez le logiciel TapeStation Analysis pour consulter les résultats (consultez le mode d'emploi du TapeStation pour plus de renseignements).
- Enregistrez les résultats dans le cahier de travail.

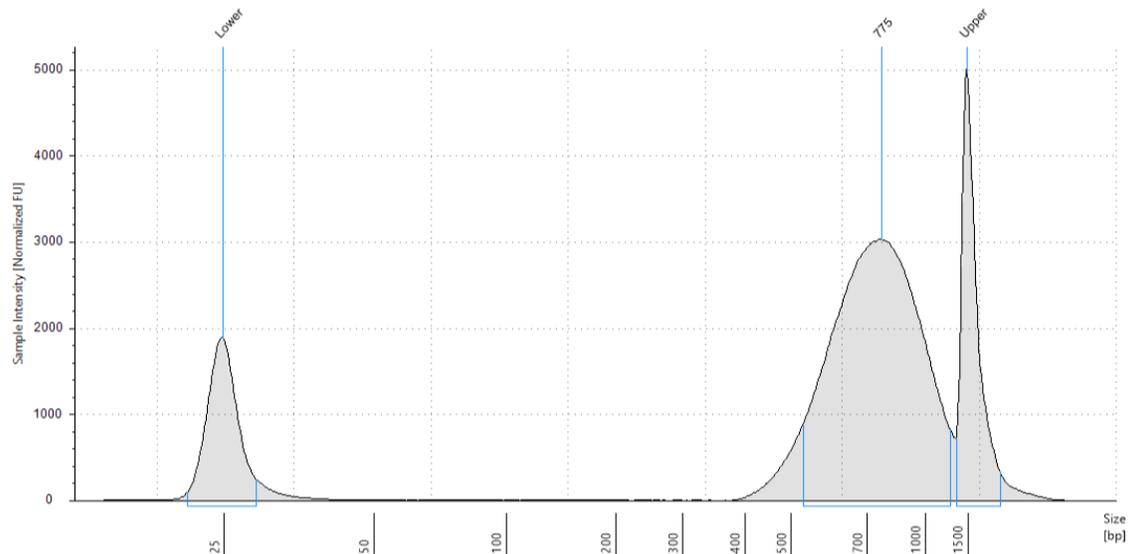


Figure 4.5.1 : Illustration représentative du tracé TapeStation pour les banques.

5. Capture hybride (workflow original)

5.0 Introduction au protocole

- Suivez le protocole d'AlloSeq Tx ci-dessous dans l'ordre indiqué et à l'aide des paramètres spécifiés.
- Avant de procéder, vérifiez le contenu du kit et assurez-vous que vous disposez des consommables et de l'équipement nécessaires.
- Pour faciliter l'utilisation, les étapes du protocole de capture hybride sont également détaillées dans le document *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD*. Les références au cahier de travail du chapitre 5 correspondent à ce cahier de travail.

5.1 Pooling des échantillons

1. Saisissez l'ID de l'expérience dans le champ jaune approprié du cahier de travail.
2. Saisissez le nombre de pools à traiter dans le champ jaune approprié du cahier de travail.
3. Copiez les renseignements de l'échantillon approprié depuis l'onglet 1.1 LinearView de *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD* et collez-les dans la liste de pools de la banque dans *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD* à l'aide de l'option de collage spéciale « Valeurs et format de nombre ».
4. Si le pool comporte ≤ 12 échantillons, ajoutez 2,5 µl de chaque banque à enrichir dans un tube ou une bande pour PCR et ajoutez le volume approprié de Resuspension Buffer pour obtenir 30 µl au total, conformément au tableau ci-dessous.
5. Si le pool comporte > 12 échantillons, ajoutez 2,5 µl de chaque banque à enrichir dans un tube pour microcentrifugeuse de 1,5 ml et passez à l'étape de concentration (1.1 dans le cahier de travail *IFU095-2_AlloSeq Tx Hybrid Capture Workbook CE IVD*).
6. Si plusieurs pools sont traités, dupliquez cet onglet et suivez les étapes 1 à 5 ci-dessus, en identifiant chaque pool de manière unique.

REMARQUE : les banques à plus faible rendement peuvent bénéficier d'un volume d'entrée dans la librairie plus important, sans dépasser un volume d'entrée combiné total de 30 µl. Un traitement de banques de faible rendement dans un pool d'enrichissement de banques de rendement supérieur (génomiques) séparé est recommandé, si cela est possible. Pour obtenir des conseils spécifiques, contactez votre représentant technique local.

5.2 Concentration des pools de banques (facultatif)

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
Purification Beads (Purification Beads-1 pour kits de 96 tests)	2 °C à 8 °C BOX 5	58,5 - 108	Amener à température ambiante, pendant au moins 30 min. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.
Eau stérile	15°C à 30°C Fourni par l'utilisateur	480	Aucune préparation requise
Éthanol à 100 %	15°C à 30°C Fourni par l'utilisateur	1 920	Préparer de l'éthanol à 80 % selon les instructions ci-dessous.
Resuspension Buffer	2 °C à 8 °C BOX 5	32	Amener à température ambiante. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.

2. Préparez de l'éthanol à 80 % frais (2 lavages par échantillon) à l'aide de 1 920 µl d'éthanol à 100 % et de 480 µl d'eau stérile (un volume excédentaire est inclus).
3. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
4. Rassemblez les tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml.

REMARQUE : Ce processus prend environ 30 minutes.

5. Regroupez les banques d'échantillon en pool, dans un tube de 1,5 ml, selon les instructions du cahier de travail 1.0 Regroupement d'échantillons.
6. Ajoutez un volume approprié (1,8 x le volume d'échantillon du pool, ou consultez les calculs du cahier de travail) de Purification Beads abondamment vortexées au tube de 1,5 mL contenant des banques en pool.
7. Passez 3 fois chaque tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
8. Agitez rapidement le tube par impulsions.
9. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
10. Placez le tube sur l'aimant pendant 1 minute (jusqu'à 2,5 minutes pour les banques de 96 échantillons) pour que les billes se regroupent autour de l'aimant. Si le surnageant reste trouble, laissez-le sur l'aimant jusqu'à ce qu'il devienne transparent.
11. À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.
12. En maintenant le tube sur l'aimant, rincez deux fois avec de l'éthanol à 80 % :
 - a) Ajoutez 800 µl d'éthanol à 80 % à chaque tube,
 - b) Incubez à température ambiante pendant 30 secondes,
 - c) À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez tout le surnageant,
 - d) Répétez les étapes a) à c) pour un total de 2 lavages.
13. Éliminez tout le surnageant restant avec une pipette P20.
14. Laissez sécher le tube pendant 5 minutes à température ambiante pour que l'éthanol résiduel s'évapore.
15. Ajoutez 32 µl de Resuspension Buffer dans chaque tube pour éluer les banques.
16. Passez 3 fois chaque tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
17. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
18. Agitez rapidement le tube par impulsions.
19. Placez les tubes sur l'aimant pendant 1 minute pour que les billes se regroupent dans les tubes autour de l'aimant.
20. **Transférez** 30 µl de surnageant vers un nouveau tube ou une nouvelle bande pour PCR pour l'hybridation.

REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Les banques peuvent être stockées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 semaine.

5.3 Hybridation de sonde

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
AlloSeq Tx Probe Panel	-15 °C à -25 °C BOX 4	10	Amener à température ambiante.
Hybridisation Buffer 1	-15 °C à -25 °C BOX 4	50	Placer dans l'Hybex à 50°C pendant 15 minutes. Agiter au vortex et inspecter visuellement, si le précipité reste, incubez à 50 °C pendant 15 minutes supplémentaires.
Hybridisation Buffer 2	2 °C à 8 °C BOX 5	10	Amener à température ambiante.

2. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
3. Rassemblez les tubes et bandes pour PCR et les capuchons.

REMARQUE : il n'est pas possible de s'arrêter en toute sécurité avant la fin du protocole de capture. Les pools d'échantillons doivent passer immédiatement de l'étape d'attente à 62 °C de la réaction de thermocyclage de l'hybridation aux étapes de captures des billes et de lavage à chaud.

REMARQUE : le processus nécessite une mise en place de 20 minutes et entre 2 et 18 heures de thermocycleur (les réactions effectuées pendant la nuit ou plus de 18 heures doivent être en attente à une température de 62 °C lors de la dernière étape d'attente de la réaction).

- Pour chaque réaction d'hybridation, associez les réactifs suivants dans l'ordre répertorié ci-dessous dans un tube ou une bande pour PCR.

Réactif	Volume par pool (µl)
Pool de banques d'échantillon	30
AlloSeq Tx Probe Panel	10
Hybridisation Buffer 1	50
Hybridisation Buffer 2	10
Total	100

- Avec une pipette réglée sur 70 µl, mélangez bien chaque puits de réaction d'hybridation 10 fois, scellez et agitez par impulsions.
- Si la solution reste trouble, mélangez de nouveau 6 à 8 fois avec la pipette.
- Placez le tube ou la bande dans le thermocycleur et exécutez le programme d'hybridation avec le couvercle chauffé à **100 °C**, et un volume de réaction de 100 µl :

#	Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
1	Dénaturation	98°C	5 minutes	1
2	Baisse de pression	98 °C - 62 °C, réduction de 2 °C/cycle	1 minute	1
3	Passez à l'étape 2 pour 18 cycles supplémentaires (total de 19 cycles) en réduisant de 2 °C/cycle.			
4	Hybridation	62°C	90 minutes	1
5	Attente finale	62°C	Maintenez (ne pas dépasser 18 heures à 62 °C, en comptant l'étape n° 4)	1

- Laissez le tube/la plaque dans le thermocycleur jusqu'à ce qu'il soit prêt pour la capture. Vérifiez que les Capture Beads ont atteint la température ambiante et que le Capture Wash Buffer et l'Hybex sont chauffés à 58 °C.
- Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
Capture Beads	2 °C à 8 °C BOX 5	250	Amener à température ambiante, pendant au moins 30 min.
Capture Wash Buffer	-15 °C à -25 °C BOX 4	800	Préchauffer à 58 °C avant utilisation.
Capture Elution Buffer 1	-15 °C à -25 °C BOX 4	28.5	Amener à température ambiante.
2N NaOH	-15 °C à -25 °C BOX 4	1.5	Amener à température ambiante. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.
Capture Elution Buffer 2	2 °C à 8 °C BOX 5	4	Amener à température ambiante.

5.4 Capture

1. Préparez un mélange de référence d'éluion des réactifs suivants, selon le pool à capturer :

Réactif	Volume par pool (µl)
Capture Elution Buffer 1	28.5
2N NaOH (frais)	1.5

REMARQUE : La solution de NaOH absorbera immédiatement le CO₂ de l'atmosphère, ce qui altère le pH et les performances du réactif. Vérifiez que le tube de 2N NaOH est scellé lorsqu'il n'est pas utilisé.

2. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
3. Rassemblez les tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml, les tubes et bandes pour PCR et les capuchons.

REMARQUE : le processus dure environ 1 heure.

4. Pour chaque réaction d'hybridation, ajoutez 250 µl de Capture Beads à un tube de 1,5 ml propre.
5. **Transférez** 100 µl de chaque réaction d'hybridation dans le tube correspondant contenant les Capture Beads.
6. Passez 3 fois le tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes. N'utilisez pas de centrifugeuse ou d'agitation par impulsions.
7. Incubez le tube à 58 °C dans l'Hybex pendant 15 minutes.
8. Agitez rapidement le tube par impulsions.
9. Placez immédiatement le tube sur l'aimant pendant 1 minute, pour que les billes se regroupent autour de l'aimant.
10. À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.
11. Lavez trois fois avec du Capture Wash Buffer, selon les instructions ci-dessous :

REMARQUE : lorsqu'il n'est pas utilisé, le Capture Wash Buffer doit rester dans l'Hybex pour maintenir une température de 58 °C. Il doit être retiré immédiatement avant l'ajout à la réaction aux étapes 12b et 14. Travaillez rapidement lors des étapes de lavage chauffé, afin de minimiser la durée à température ambiante du pool d'échantillons et du tampon.

- a) Retirez le tube de l'aimant,
 - b) Ajoutez 200 µl de Capture Wash Buffer (58 °C),
 - c) Passez 3 fois le tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes. N'utilisez pas de centrifugeuse ou d'agitation par impulsions.
 - d) Incubez le tube à 58 °C dans l'Hybex pendant 5 minutes.
 - e) Agitez par impulsions, puis placez immédiatement le tube sur l'aimant de 1,5 ml pendant 1 minute, pour que les billes se regroupent autour de l'aimant.
 - f) À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.
 - g) Répétez les étapes a) à f) deux fois de plus pour un total de 3 lavages.
12. Retirez le tube de l'aimant.
 13. Ajoutez 200 µl de Capture Wash Buffer chauffé (58 °C).
 14. Passez 3 fois le tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes. N'utilisez pas de centrifugeuse ou d'agitation par impulsions.
 15. **Transférez** la totalité du contenu (solution de lavage et billes) vers un nouveau tube de 1,5 ml.

REMARQUE : cette étape de transfert est essentielle pour retirer les inhibiteurs de la PCR qui peuvent dégrader les performances de la suite du processus.

16. Incubez le tube à 58 °C dans l'Hybex pendant 5 minutes.
17. Agitez immédiatement par impulsions, puis placez immédiatement le tube sur l'aimant pendant 1 minute, pour que les billes se regroupent autour de l'aimant.
18. À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.

19. Agitez rapidement le tube par impulsions, puis placez immédiatement le tube sur l'aimant pendant 1 minute pour que les billes se regroupent autour de l'aimant.
20. À l'aide d'une pipette P20, aspirez et jetez tout surnageant restant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.
21. Placez le mélange de référence d'éluion au vortex, puis retirez le tube de réaction de l'aimant et ajoutez 23 µl de mélange de référence d'éluion dans chaque tube.
22. Passez 3 fois le tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
23. Incubez à température ambiante pendant 2 minutes.
24. Agitez rapidement le tube par impulsions.
25. Placez le tube sur l'aimant pendant 1 minute pour que les billes se regroupent autour de l'aimant.
26. **Transférez** 21 µl de surnageant vers un nouveau tube ou une nouvelle bande pour PCR.
27. Ajoutez 4 µl de Capture Elution Buffer 2.
28. Mélangez 6 à 8 fois à la pipette. Le volume final est de 25 µl.

REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Les banques peuvent être stockées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 24 heures.

5.5 PCR post-enrichissement

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
PCR Primers	-15 °C à -25 °C BOX 4	5	Décongeler sur de la glace.
PCR Mix (ou PCR Mix-2 pour kit de 96 tests)	-15 °C à -25 °C BOX 4	20	Décongeler à température ambiante, puis placer sur de la glace.

2. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
3. Rassemblez les tubes pour PCR requis contenant les banques de capture de l'étape 5.4 Capture.

REMARQUE : La configuration de ce processus prend environ 5 minutes, **1h40** dans le thermocycleur.

4. Ajoutez 5 µl de PCR Primers aux banques capturées dans le tube de PCR.
5. Ajoutez 20 µL de PCR Mix (ou de PCR Mix-2 si vous utilisez des kits de 96 tests) dans le tube.
6. Mélangez 10 fois à la pipette.
7. Agitez rapidement le tube par impulsions.
8. Placez le tube ou la bande dans le thermocycleur et exécutez le programme de PCR post-hybridation avec le couvercle chauffé à 105 °C, et un volume de réaction de 50 µl :

#	Étape	Température	Durée	Nombre de cycles
1	Dénaturation	98°C	30 secondes	1
2	Dénaturation	98°C	1 minute	17
3	Annelage	60°C	30 secondes	
4	Extension	72°C	3 minutes	
5	Extension finale	72°C	5 minutes	1
6	Attente finale	10°C	Attente	1

REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Les banques peuvent être stockées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 semaine.

REMARQUE : si vous effectuez immédiatement la purification, vérifiez que les Purification Beads sont à température ambiante avant l'utilisation.

5.6 Purification de la PCR post-enrichissement

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
Purification Beads (Purification Beads-2 pour kit de 96 tests)	2 °C à 8 °C BOX 5	27	Amener à température ambiante, pendant au moins 30 min.
Eau stérile	15 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	80	Aucune préparation requise
Éthanol à 100 %	15 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	320	Préparer de l'éthanol à 80 % selon les instructions ci-dessous.
Resuspension Buffer	2 °C à 8 °C BOX 5	32	Amener à température ambiante. Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes.

2. Préparez de l'éthanol à 80 % frais (2 lavages par échantillon) à l'aide de 480 µl d'éthanol à 100 % et de 120 µl d'eau stérile (un volume excédentaire est inclus).
3. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
4. Rassemblez les tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml.

REMARQUE : ce processus prend environ **30** minutes.

5. Pour chaque réaction de purification, ajoutez 27 µl de Purification Beads soigneusement vortexées à un tube de 1,5 ml propre.
6. **Transférez** 45 µl de chaque réaction de PCR post-enrichissement dans le tube correspondant contenant les Purification Beads.
7. Passez 3 fois chaque tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
8. Agitez rapidement le tube par impulsions.
9. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
10. Placez le tube sur l'aimant pendant 1 minute ou jusqu'à ce que toutes les billes se regroupent autour de l'aimant.
11. À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez le surnageant, en laissant les billes dans les tubes avec l'aimant.
12. En maintenant le tube sur l'aimant, rincez deux fois avec de l'éthanol à 80 % :
 - a) Ajoutez 200 µl d'éthanol à 80 % à chaque tube,
 - b) Incubez à température ambiante pendant 30 secondes,
 - c) À l'aide d'une pipette, aspirez et jetez tout le surnageant,
 - d) Répétez les étapes a) à c) pour un total de 2 lavages.
13. Éliminez tout le surnageant restant avec une pipette P20.
14. Laissez sécher le tube pendant 5 minutes à température ambiante pour que l'éthanol résiduel s'évapore.
15. Retirez le tube de l'aimant et ajoutez 32 µl de Resuspension Buffer à chaque tube pour éluer les fragments cibles.
16. Passez 3 fois chaque tube au vortex à haute vitesse pendant 10 secondes.
17. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
18. Agitez rapidement le tube par impulsions.
19. Placez les tubes sur l'aimant pendant 1 minute pour que les billes se regroupent dans les tubes autour de l'aimant.
20. **Transférez** 30 µl de surnageant vers un nouveau tube de 1,5 ml pour le stockage.

REMARQUE : Il s'agit d'un point d'arrêt sans risque. Les banques peuvent être stockées à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 mois.

5.7 Quantification Qubit

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
Qubit BR buffer	-25 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	199	Aucune préparation requise
Qubit BR dye	-25 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	1	Aucune préparation requise
BR Standard #1	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	10	Amener à température ambiante.
BR Standard #2	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	10	Amener à température ambiante.

2. Rassemblez les tubes Qubit et un tube de 1,5 ml ou 5 ml pour la préparation de la solution de travail, selon le volume requis.
3. Préparez deux tubes d'essai pour les étalons et un pour chaque pool.
4. Préparez la solution de travail Qubit de 200 µl avec 199 µl de Qubit buffer et 1 µl de teinture Qubit par échantillon/étalon pour la quantification.
5. Passez la solution de travail au vortex pendant 2 à 3 secondes, puis agitez par impulsion.
6. Aliquotez **190 µl** de solution de travail dans chacun des tubes d'étalon.
7. Aliquotez **198 µl** de solution de travail dans chacun des tubes de pool.
8. Aliquotez **10 µl** de solution étalon dans chacun des tubes d'étalon correspondants.
9. Aliquotez **2 µl** de chaque pool dans le tube respectif.
10. Passez tous les tubes au vortex pendant 2 à 3 secondes, puis agitez par pulsation.
11. Incubez les tubes à température ambiante pendant 2 minutes.
12. Insérez les tubes dans le fluorimètre Qubit et obtenez les résultats (consultez le protocole du fabricant de Qubit pour plus de renseignements).
13. Enregistrez les résultats de Qubit dans le tableau du cahier de travail pour calculer la concentration moyenne.

5.8 Visualisation TapeStation (facultatif)

REMARQUE : des systèmes alternatifs de visualisation des fragments, tels qu'un analyseur de fragments, un bioanalyseur ou une solution similaire peuvent être utilisés après la validation de l'utilisateur.

1. Rassemblez les réactifs nécessaires (volume spécifié dans le tableau ci-dessous) et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Volume par pool (µl)	Préparation requise
D1000 Ladder	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	1	Amener à température ambiante.
D1000 Sample Buffer	2 °C à 8 °C, fourni par l'utilisateur	3	Amener à température ambiante.

2. Rassemblez la D1000 ScreenTape, et les bandes de tubes optiques et les capuchons TapeStation requis.
3. Transférez 1 µl de chaque pool dans un nouveau tube.
4. Ajoutez 1 µl de D1000 Ladder dans un tube de référence.
5. Ajoutez 3 µl de D1000 sample buffer dans chaque tube de pool et de référence.
6. Scellez tous les tubes avec des capuchons.
7. Mélangez abondamment tous les tubes au vortex IKA à 2 000 tr/m pendant 1 minute.
8. Centrifugez brièvement pour que tous les échantillons soient au fond des tubes.
9. Débouchez et chargez les tubes d'échantillons dans l'instrument 2200 TapeStation

10. Sélectionnez les tubes requis dans le logiciel 2200 TapeStation Controller et analysez les échantillons (consultez le mode d'emploi du TapeStation pour plus de renseignements).
11. Une fois l'analyse terminée, démarrez le logiciel TapeStation Analysis pour consulter les résultats (consultez le mode d'emploi du TapeStation pour plus de renseignements).
12. Enregistrez les résultats dans le tableau du cahier de travail.

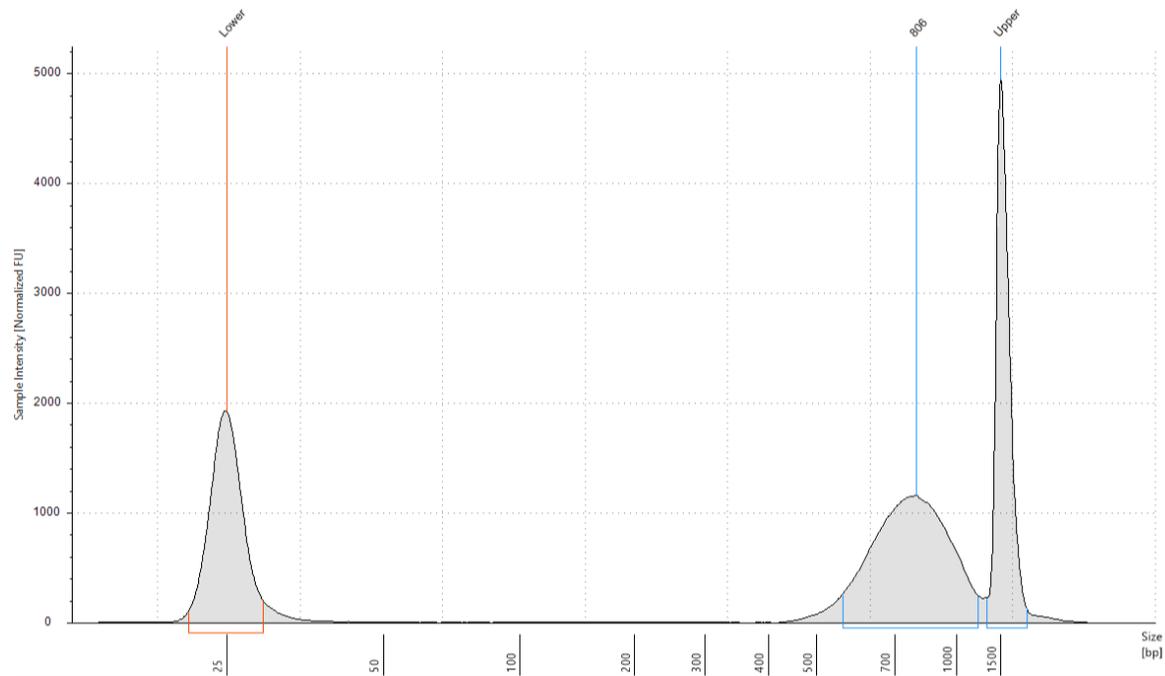


Figure 5.8.1 : Illustration représentative du tracé de TapeStation pour pools de banques enrichies.

6. Séquençage

6.0 Introduction au protocole

Les banques AlloSeq Tx sont validées pour le séquençage effectué sur des séquenceurs Illumina, dont le MiSeq, le MiniSeq ou le iSeq, lorsque les données de séquençage obtenues sont publiées dans un fichier fastq. Le nombre d'échantillons ajoutés à chaque pool enrichi déterminera la cuve de mesure nécessaire du séquenceur, selon les renseignements de la section 1.3 *Contenu du gène ciblé AlloSeq Tx* de ce mode d'emploi.

- Suivez le protocole d'AlloSeq Tx ci-dessous dans l'ordre indiqué et à l'aide des paramètres spécifiés.
- Avant de procéder, vérifiez le contenu du kit et assurez-vous que vous disposez des consommables et de l'équipement nécessaires.
- Pour faciliter l'utilisation, les étapes du protocole de séquençage sont également détaillées dans le document *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD* (workflow Early Pooling) et *IFU095-3_AlloSeq Tx Sequencing Workbook CE IVD* (workflow d'origine). Les références au cahier de travail du chapitre 6 correspondent à ces cahiers de travail.
- Les séquenceurs doivent être chargés en fonction du protocole de l'instrument, comme indiqué dans les instructions ci-dessous.
- Dans le cas de l'utilisation d'un instrument MiSeq, il est recommandé d'effectuer un lavage de la ligne de modèle avec de l'eau de Javel (hypochlorite de sodium), conformément aux instructions du guide d'utilisateur de MiSeq pour obtenir des performances optimales.

REMARQUE : le fichier .csv d'importation formaté de la feuille de l'échantillon séquençé peut être généré et enregistré selon les instructions du document *IFU095-5_AlloSeq Tx Early Pooling Workbook CE IVD* (feuille de travail « 1.0

Sample_Prep »), de « 1.2 Fiche d'échantillon » (workflow Early Pooling) ou *IFU095-1_AlloSeq Tx Library Preparation Workbook CE IVD* (feuille de travail « 1.0 Sample_Prep »), de « 1.2 SampleSheet » (workflow d'origine).

6.1 PhiX Préparation

1. Rassemblez les réactifs nécessaires et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Préparation requise
10 nM PhiX	-15 °C à -25 °C, fourni par l'utilisateur	À décongeler, puis à conserver sur glace.
2N NaOH	-15 °C à -25 °C BOX 4	Amener à température ambiante.
Eau stérile	15 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	Aucune préparation requise
Resuspension Buffer	2 °C à 8 °C BOX 5	Amener à température ambiante.
HT1 (avec cartouche de séquençage)	-15 °C à -25 °C, fourni par l'utilisateur	À décongeler, puis à conserver sur glace.

1. Préparez de la solution de travail NaOH 0,2 avec 45 µl d'eau stérile et 5 µl de 2N NaOH.

REMARQUE : La solution de NaOH absorbera immédiatement le CO₂ de l'atmosphère, ce qui altère le pH et les performances du réactif. Vérifiez que le tube de 2N NaOH est scellé lorsqu'il n'est pas utilisé.

2. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
3. Rassemblez les tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml.

6.1.1 Diluer et dénaturer PhiX pour les analyses sur MiSeq et MiniSeq

1. Ajoutez 3 µl de Resuspension Buffer dans un tube propre.
2. Ajoutez 2 µl de PhiX 10 nM au tube.
3. Ajoutez 5 µl de NaOH 0,2 N (dilué comme ci-dessus) dans le tube.
4. Passez au vortex et agitez par impulsion.
5. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
6. Ajoutez 990 µl de HT1 pré-refroidi dans le tube contenant du PhiX dénaturé.
7. **Inversez pour mélanger** (ne PAS passer au vortex), puis mélangez le tube par impulsions.

REMARQUE : Cela permet d'obtenir 1 ml de PhiX 20 pM qui est prêt pour les analyses MiSeq. Pour les analyses MiniSeq, effectuez la dilution supplémentaire réglée sur 5 pM décrite ci-dessous. Le PhiX dénaturé peut être stocké à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 mois.

6.1.2 Pour les analyses MiniSeq, diluez davantage le PhiX jusqu'à 5 pM

1. Saisissez le volume de dilution désiré dans le cahier de travail, afin de calculer la dilution appropriée pour le PhiX.
2. Diluez le PhiX à 5 pM en combinant le volume de réactif (voir le cahier de travail) dans un tube pour microcentrifugeuse.
3. **Inversez pour mélanger** (ne PAS passer au vortex), puis mélangez le tube par impulsions.

REMARQUE : le PhiX dénaturé peut être stocké à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 mois.

6.1.3 Pour les analyses iSeq, diluez PhiX à 20 pM (sans dénaturation)

1. Saisissez le volume de dilution désiré dans le cahier de travail, afin de calculer la dilution appropriée pour le PhiX.
2. Diluez le PhiX à 20 pM en combinant le volume de réactif (voir le cahier de travail) dans un tube pour microcentrifugeuse.

3. **Inversez pour mélanger** (ne PAS passer au vortex), puis mélangez le tube par impulsions.

REMARQUE : le PhiX dénaturé peut être stocké à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 mois.

6.2 Diluer et dénaturer pour MiSeq

1. Rassemblez les réactifs nécessaires et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Préparation requise
Pool d'échantillons enrichis AlloSeq Tx	-15 °C à -25 °C, préparé par l'utilisateur	À décongeler, puis à conserver sur glace.
2N NaOH	-15 °C à -25 °C BOX 4	Amener à température ambiante.
Eau stérile	15 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	Aucune préparation requise
HT1 (avec cartouche MiSeq)	-15 °C à -25 °C, fourni par l'utilisateur	À décongeler, puis à conserver sur glace.
Resuspension Buffer	2 °C à 8 °C BOX 5	Amener à température ambiante.
PhiX 20 pM (précédemment dilué)	-15 °C à -25 °C, fourni par l'utilisateur	À décongeler, puis à conserver sur glace.

2. Préparez de la solution de travail NaOH 0,2 N avec 45 µl d'eau stérile et 5 µl de 2N NaOH.

REMARQUE : La solution de NaOH absorbera immédiatement le CO₂ de l'atmosphère, ce qui altère le pH et les performances du réactif. Vérifiez que le tube de 2N NaOH est scellé lorsqu'il n'est pas utilisé.

3. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
4. Rassemblez les tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml.
5. Entrez la concentration du pool d'échantillons enrichis, la taille des fragments (environ 800 pb) et le volume total souhaité (30 µl recommandés) à 4 nM dans le cahier de travail, afin de calculer la dilution appropriée pour la banque.
6. Diluez le pool d'échantillons à 4 nM en combinant les réactifs (voir le manuel) dans un tube de microcentrifugeuse.
7. Passez au vortex et agitez par impulsions le pool d'échantillons dilués avant utilisation ultérieure.
8. Ajoutez 5 µl d'un pool d'échantillons enrichi de 4 nM à un tube propre.
9. Ajoutez 5 µl de NaOH 0,2 N (dilué comme ci-dessus) dans le tube.
10. Passez au vortex et agitez par impulsion.
11. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
12. Ajoutez 990 µl de HT1 pré-refroidi dans le tube contenant le pool d'échantillons enrichi.
13. **Inversez pour mélanger** (ne PAS passer au vortex), puis mélangez le tube par impulsions.

REMARQUE : cela donne 1 ml de pool d'échantillons de 20 pM. Les pools peuvent être stockés à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 mois.

14. Entrez le nombre de pools à combiner pour le séquençage, la concentration de charge (12 pM recommandée), le % d'ajout de PhiX souhaité (1 % minimum recommandé) et le volume de charge (minimum de 600 µl) dans le cahier de travail, afin de calculer la dilution appropriée pour la librairie.
15. Diluez le pool d'échantillons à la concentration de chargement en combinant les réactifs (voir le manuel) dans un tube de microcentrifugeuse.
16. **Inversez pour mélanger** (ne PAS passer au vortex), puis mélangez le tube par impulsions.
17. Mettez de côté sur de la glace jusqu'à ce qu'il soit prêt à être chargé sur la cartouche de réactifs MiSeq pour le séquençage.

REMARQUE : les pools peuvent être stockés à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 48 heures avant le séquençage.

18. Commencez à charger le MiSeq conformément au protocole de l'instrument.

6.3 Diluer et dénaturer pour MiniSeq

1. Rassemblez les réactifs nécessaires et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Préparation requise
Pool d'échantillons enrichis AlloSeq Tx	-15 °C à -25 °C, préparé par l'utilisateur	À décongeler, puis à conserver sur glace.
2N NaOH	-15 °C à -25 °C BOX 4	Amener à température ambiante.
Eau stérile	15 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	Aucune préparation requise
HT1 (avec cartouche de séquençage)	-15 °C à -25 °C, fourni par l'utilisateur	À décongeler, puis à conserver sur glace.
Resuspension Buffer	2 °C à 8 °C BOX 5	Amener à température ambiante.
Tris-HCl 200 mM, pH 7,0	15 °C à 30 °C, fourni par l'utilisateur	Aucune préparation requise
PhiX 5 pM (précédemment dilué)	-15 °C à -25 °C, fourni par l'utilisateur	À décongeler, puis à conserver sur glace.

2. Préparez de la solution de travail NaOH 0,1 N avec 95 µl d'eau stérile et 5 µl de 2N NaOH.

REMARQUE : La solution de NaOH absorbera immédiatement le CO₂ de l'atmosphère, ce qui altère le pH et les performances du réactif. Vérifiez que le tube de 2N NaOH est scellé lorsqu'il n'est pas utilisé.

3. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
4. Rassemblez les tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml.
5. Entrez la concentration du pool d'échantillons enrichis, la taille des fragments (environ 800 pb) et le volume total souhaité (100 µl recommandés) à 1 nM dans le cahier de travail, afin de calculer la dilution appropriée pour la banque.
6. Diluez le pool d'échantillons à 1 nM en combinant les réactifs (voir le manuel) dans un tube de microcentrifugeuse.
7. Passez au vortex et agitez par impulsions le pool d'échantillons dilués avant utilisation ultérieure.
8. Ajoutez 5 µl d'un pool d'échantillons enrichi de 1 nM à un tube propre.
9. Ajoutez 5 µl de NaOH 0,1N (dilué comme ci-dessus) dans le tube.
10. Passez au vortex et agitez par impulsion.
11. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
12. Ajoutez 5 µl de Tris-HCl 200 mM à pH 7,0.
13. Passez au vortex et agitez par impulsion.
14. Ajoutez 985 µl de HT1 pré-refroidi dans le tube contenant le pool d'échantillons enrichi.
15. **Inversez pour mélanger** (ne PAS passer au vortex), puis mélangez le tube par impulsions.

REMARQUE : cela donne 1 ml de pool d'échantillons de 5 pM. Les pools peuvent être stockés à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 1 mois.

16. Entrez le nombre de pools à combiner pour le séquençage, la concentration de charge (1,6 pM recommandée), le % d'ajout de PhiX souhaité (1 % minimum recommandé) et le volume de charge (minimum de 500 µl) dans le cahier de travail, afin de calculer la dilution appropriée pour la banque.
17. Diluez le pool d'échantillons à la concentration de chargement en combinant les réactifs (voir le manuel) dans un tube de microcentrifugeuse.

18. **Inversez pour mélanger** (ne PAS passer au vortex), puis mélangez le tube par impulsions.
19. Mettez de côté sur de la glace jusqu'à ce qu'il soit prêt à être chargé sur la cartouche de réactifs MiniSeq pour le séquençage.

REMARQUE : les pools peuvent être stockés à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 48 heures avant le séquençage.

20. Commencez à charger le MiniSeq conformément au protocole de l'instrument.

6.4 Diluer pour iSeq

1. Rassemblez les réactifs nécessaires et préparez-les selon le tableau :

Réactif	Conditions de stockage	Préparation requise
Pool d'échantillons enrichis AlloSeq Tx	-15 °C à -25 °C, préparé par l'utilisateur	À décongeler, puis à conserver sur glace.
Resuspension Buffer	2 °C à 8 °C BOX 5	Amener à température ambiante.
PhiX 20 pM (précédemment dilué)	-15 °C à -25 °C, fourni par l'utilisateur	À décongeler, puis à conserver sur glace.

2. Passez tous les réactifs au vortex et à l'agitateur par impulsions.
3. Rassemblez les tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml.
4. Entrez la concentration du pool d'échantillons enrichis, la taille des fragments (environ 800 pb) et le volume total souhaité (100 µl recommandés) à 1 nM dans le cahier de travail, afin de calculer la dilution appropriée pour la banque.
5. Diluez le pool d'échantillons à 1 nM en combinant les réactifs (voir le manuel) dans un tube de microcentrifugeuse.
6. Passez au vortex et agitez par impulsions le pool d'échantillons dilués avant utilisation ultérieure.
7. Entrez le nombre de pools à combiner pour le séquençage, la concentration de charge (200 pM recommandée), le % d'ajout de PhiX souhaité (1 % minimum recommandé) et le volume de charge (minimum de 100 µl) dans le cahier de travail, afin de calculer la dilution appropriée pour la banque.
8. Diluez le pool d'échantillons à la concentration de chargement en combinant les réactifs (voir le manuel) dans un tube de microcentrifugeuse.
9. **Inversez pour mélanger** (ne PAS passer au vortex), puis mélangez le tube par impulsions.
10. Mettez de côté sur de la glace jusqu'à ce qu'il soit prêt à être chargé sur la cartouche de réactifs iSeq pour le séquençage.

REMARQUE : les pools peuvent être stockés à une température comprise entre -15 °C et -25 °C jusqu'à 48 heures avant le séquençage.

11. Chargez 20 µl de pool d'échantillon dilué dans la cartouche iSeq selon le protocole de l'instrument.

7. Analyse de séquence

Les fichiers Fastq obtenus doivent être analysés à l'aide du logiciel AlloSeq Assign. Les procédures d'utilisation du logiciel AlloSeq Assign se trouvent dans le document *IFU094_AlloSeq Assign IFU CE IVD*.

8. Guide de dépannage

PROBLÈME	CAUSE(S) POSSIBLE(S)	Solution
Aucun rendement ou rendement faible de la préparation de la banque	ADN ajouté de mauvaise qualité ou en faible concentration.	Évaluez la qualité de l'ADN par électrophorèse sur gel. L'ADN intact doit être d'environ 3 kb avec peu ou pas de traces de frottement sur le gel. Extrayez de

PROBLÈME	CAUSE(S) POSSIBLE(S)	Solution
(détecté par la quantification Qubit)		nouveau l'ADN et répétez la procédure lorsque cela est possible.
	Type d'échantillon principal utilisé incorrect.	Éviter l'utilisation d'échantillons de sang complets contenant de l'héparine. Extraire à nouveau l'ADN provenant de sang complet préservé par ACD ou EDTA et répétez la procédure, si possible.
	Banques perdues pendant la capture	Consulter le protocole. Vérifier que les étapes de purification qui conservent ou éliminent le surnageant sont suivies correctement. Vérifier que la concentration d'éthanol est correcte. Utiliser de l'eau uniquement ou un excès d'eau peut éluer l'ADN de façon excessive.
	Les banques ne sont pas éluées par les Capture Beads.	Consulter le protocole. Vérifier que les tampons d'éluion sont utilisés dans le bon ordre. Vérifier que les réactifs/tampons ont été éliminés de façon adéquate avant la resuspension et l'éluion. Éviter de trop sécher l'ADN ou les granulés d'ADN liés aux billes pendant les étapes de séchage. Un séchage prolongé de l'ADN peut entraver la re-suspension et le rendement subséquent.
	Absence d'ajout de réactif(s) critique(s) (c'est-à-dire, de billes, de l'amorce d'index, du mélange de référence pour PCR) ou ils ne sont pas utilisés dans le bon ordre.	Consulter le protocole. Vérifier que les agents ont été ajoutés dans le bon ordre et à un volume correct. Vérifier le volume résiduel de réactif pour identifier tout excès. Répéter la procédure si nécessaire.
	Conditions d'incubation ou de cyclage incorrectes	Consulter les conditions du thermocycleur : Programme de tagmentation Programme d'indexage de PCR
Aucun rendement ou rendement faible de l'enrichissement (détecté par la quantification Qubit)	Banques perdues pendant la capture	Consulter le protocole et vérifier que les étapes nécessitant de conserver ou d'éliminer le surnageant ont été suivies correctement. Vérifier que les Purification Beads diluées sont à la concentration correcte, et que les Purification Beads non diluées (billes diluées non résiduelles) correspondent à la taille choisie.
	Les banques n'ont pas été éluées par les Capture Beads.	Vérifier que les tampons d'éluion sont utilisés dans le bon ordre. Vérifier que les réactifs/tampons ont été éliminés de façon adéquate avant la resuspension et l'éluion. Éviter de trop sécher l'ADN ou les granulés d'ADN liés aux billes pendant les étapes de séchage. Un séchage prolongé des granulés d'ADN peut entraver la possibilité de re-suspendre la solution et le rendement subséquent.
	Conditions d'incubation ou de cyclage incorrectes	Consulter les conditions du thermocycleur : Programme d'hybridation Programme PCR post-enrichissement
Fragments de taille incorrecte après la préparation de la librairie ou l'enrichissement (détecté par l'analyse de fragments)	Rapport échantillon/Purification Beads incorrect	Répéter le protocole. Vérifier que la concentration de billes utilisée est correcte pendant les étapes de sélection de la taille et de purification du protocole.

PROBLÈME	CAUSE(S) POSSIBLE(S)	Solution
Échec du séquençage		Vérifier que le protocole a été suivi. Consulter le manuel de l'utilisateur du séquenceur.
Faible couverture des loci cibles malgré un enrichissement à rendement élevé.	Des fragments non spécifiques ont été capturés en raison d'une faible température pendant les étapes de capture et de lavage chauffé.	Vérifier que l'Hybex utilisé pour les étapes de lavage chauffé est calibré et entretenu. Travailler rapidement pendant les étapes de lavage chauffé pour garantir que la température du pool ne baisse pas brusquement.

9. Informations complémentaires

Le protocole décrit dans ce guide présuppose que vous avez consulté cette section, confirmé et obtenu tous les consommables et l'équipement requis.

Licence

Les kits AlloSeq Tx contiennent des réactifs Nextera Flex for Enrichment qui sont fabriqués par Illumina Inc. Pour une distribution par CareDx Pty Ltd.

Consommables et équipement nécessaires, mais non fournis

Les consommables et l'équipement répertoriés ci-dessous sont requis pour effectuer l'analyse, mais ne font pas partie du kit AlloSeq Tx Kit.

Le protocole a été optimisé et validé à l'aide des articles énumérés. Les performances peuvent ne pas être comparables en cas d'utilisation d'autres consommables et équipements.

Consommables	Fournisseur/n° de référence
Eau de qualité PCR	Sigma-Aldrich, W3500
Éthanol absolu pour biologie moléculaire	Fournisseur de laboratoire général
Kit de dosage Qubit™ ADNdb BR	Thermo Fisher Scientific, Q32850 ou Q32853
Tubes de dosage Qubit™	Thermo Fisher Scientific, Q32856
D1000 ScreenTape (facultatif)	Agilent Technologies, 5067-5584
D1000 Réactifs (facultatif)	Agilent Technologies, 5067-5585
Plaques d'échantillon à 96 puits (facultatif)	Agilent Technologies, 5067-5150
Film en aluminium pour plaque de 96 puits (facultatif)	Agilent Technologies, 5067-5154
Bandes de tubes optiques (8 par bande) (facultatif)	Agilent Technologies, 401428
Bande de capuchons de tubes optiques (8 par bande) (facultatif)	Agilent Technologies, 401425
L'un des kits de réactifs de séquençage suivants :	
• MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycles)	• Illumina, MS-102-2002
• MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300 cycles)	• Illumina, MS-103-1002
• MiSeq Reagent Nano Kit v2 (300 cycles)	• Illumina, MS-103-1001
• MiniSeq Mid Output Kit (300 cycles)	• Illumina, FC-420-1004
• Réactif iSeq 100 i1 v2 (300 cycles)	• Illumina, 20031371
PhiX Control v3	Illumina, FC-110-3001
Embouts de pipettes avec barrière 20 µl	Fournisseur de laboratoire général
Embouts de pipettes avec barrière 200 µl	Fournisseur de laboratoire général
Embouts de pipettes avec barrière 1 000 µl	Fournisseur de laboratoire général
Tubes pour microcentrifugeuse de 1,5 ml	Fournisseur de laboratoire général

Consommables	Fournisseur/n° de référence
Tubes de 5 ml	Fournisseur de laboratoire général
Tubes coniques de 15 ml pour centrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général
Réservoirs de réactif 25 ml	Fournisseur de laboratoire général
Bandes de 8 tubes de 0,2 ml pour PCR avec capuchons	Fournisseur de laboratoire général
Plaque pour PCR à 96 puits	Fournisseur de laboratoire général
Films adhésifs Microseal 'B'	Bio-Rad, MSB1001
Abgene™ Plaque de stockage Deepwell en polypropylène de 96 puits de 0,8 ml (plaque MIDI, workflow original uniquement)	Thermo Fisher, AB0859 ou AB0765
Hypochlorite de sodium (NaOCl) pour un lavage du séquençage après l'analyse (facultatif)	Sigma, 239305

Équipement	Fournisseur/n° de référence
Pipette de 20 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipette de 200 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipette de 1 000 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes multicanaux de 20 µl	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes multicanaux de 200 µl	Fournisseur de laboratoire général
Microcentrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général
Microplaque pour centrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général
Vortex	Fournisseur de laboratoire général
Rouleau de film d'opercule	Fournisseur de laboratoire général
Plaque d'index Fixture	Illumina, FC-130-1005
L'un des racks magnétiques suivants :	
• Aimant DynaMag™-2	Thermo Fisher, 12321D
• Separation Rack MagJET, 2 x tube de 1,5 ml	Thermo Fisher, MR01
Support magnétique 96	Thermo Fisher, AM10027
BioShake iQ, ou	BioShake iQ, 1808-0506
BioShake XP	BioShake XP, 1808-0505
Système Agilent 2200 TapeStation (facultatif)	Agilent Technologies
Fluorimètre Qubit	Thermo Fisher
L'un des thermocycleurs à 96 puits suivants :	
• Thermocycleur à 96 puits Veriti™	Applied Biosystems, 4375786
• Thermocycleur Mastercycler Pro S	Eppendorf, 6325
Ou d'autres thermocycleurs de PCR de performances comparables. Les exigences minimales du thermocycleur de PCR alternatif sont une fonction de couvercle chauffant à 105 °C pour le programme de PCR d'indexation et des tubes de 0,2 ml et une plaque de 96 puits en format bloc.	
Système Hybex	SciGene, 1057-30-2
Bloc de tubes de 1,5 ml Hybex. (32 x tubes de 1,5 ml).	SciGene, 1057-34-0
L'un des séquenceurs suivants	
• Illumina MiSeq	Illumina, SY-410-1003
• Illumina MiniSeq	Illumina, SY-420-1001
• Illumina iSeq	Illumina, 20021532

10. Coordonnées

Fabricant :

CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Australie, 6160
Tél. : +61-8-9336-4212
E-mail : orders-aus@caredx.com
Site Web : <http://www.caredx.com>

Distribué par :

Asia Pacific (APAC)
CareDx Pty Ltd,
20 Collie Street, Fremantle, WA, Australie, 6160
Tél. : +61-8-9336-4212
E-mail : orders-aus@caredx.com
Site Web : <http://www.caredx.com>

Europe, Moyen-Orient et Afrique (EMEA)
CareDx AB,
Franzégatan 5, SE-112 51 Stockholm, Sweden.
Tél. : +46-8-508 939 00
Télécopie : +46-8-717 88 18
Courriel : orders-se@caredx.com
Site Web : <http://www.caredx.com/>

Amériques
CareDx Lab Solutions Inc.,
901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382, États-Unis
Tél. : +1-877-OLERUP1
Télécopie : +1-610-344-7989
E-mail : orders-us@caredx.com
Site Web : <http://www.caredx.com>

CH-REP:

Qrad Suisse S.A.,
World Trade Center, Avenue Gratta-Paille 2, 1018 Lausanne, Suisse,
CHRN: CHRN-AR-20002058

Assistance technique et signalement d'incidents graves :

E-mail : techsupport-global@caredx.com

Tout incident grave survenu en association au dispositif doit être signalé au fabricant et à l'autorité compétente ou le ministère de la Santé de l'état membre dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi.

Pour plus de renseignements, veuillez consulter le site CareDx (<https://www.caredx.com/contact-us/>).

Produits associés :

Dispositifs pour DIV avec marquage CE :
AlloSeq Assign

11. Références

1. Illumina Technical Note. **Nextera XT library prep: tips and troubleshooting** (06/29/18)
2. Illumina Technical Note. **DNA/RNA isolation considerations for Illumina library preparation kits.** (21/12/2018)
3. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. **PCR inhibitors – occurrence, properties and removal.** 2012 J Appl Micro. 113:1014-26 (voir aussi les citations qui y figurent)
4. Demeke T, Jenkins GR. **Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits.** Anal Bioanal Chem. 2009 396:1977-90.
5. Wilson IG. **Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification.** 1997 Appl Environ Micro. 63:3741-51 (voir aussi les citations qui y figurent)
6. Al-Soud WA, Rådström P. **Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples.** Appl Env Micro. 1998 64:3748-53.
7. Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, Waitara L, Wadsö L, Steffen CR, Vallone PM, Rådström P. **Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR.** Anal Bioanal Chem. 2018 410:2569-83
8. Al-Soud WA, Rådström P. **Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells.** J Clin Micro. 2001 39:485-93
9. Yedidag EN, Koffron AJ, Mueller KH, Kaplan B, Kaufman DB, Fryer JP, Stuart FP, Abecassis M. **Acyclovir triphosphate inhibits the diagnostic polymerase chain reaction for cytomegalovirus.** Transplantation. 1996 27;62(2):238-42.
10. de Lomas JG, Sunzeri FJ, Busch MP. **False-negative results by polymerase chain reaction due to contamination by glove powder.** Transfusion. 1992 32:83-5.
11. Burgess LC, Hall JO. **UV Light Irradiation of Plastic Reaction Tubes Inhibits PCR.** Biotechniques. 1999 27:252-57.
12. Picelli S, Bjorklund AK, Reinius B, Sagasser S, Winberg G, Sandberg R. **Tn5 transposase and tagmentation procedures for massively scaled sequencing projects.** Genome Res. 2014 24:2033-44.
13. Steiniger M, Adams CD, Marko JF, Reznikoff WS. **Defining characteristics of Tn5 Transposase non-specific DNA binding.** Nucl Acid Res. 2006 34:2920-34.
14. **CareDx AlloSure Interfering Substances report** 2018.

Historique de la méthode

Version	Date	Modification (IFU095-FR v1.0 est traduit du document principal en anglais IFU095_AlloSeq Tx CE IVD v9.0)
IFU095 v1.0	19 Févr 20	Première version du mode d'emploi CE d'AlloSeq Tx.
IFU095 v1.1	28 Avr 20	Ajout de « Le test AlloSeq Tx séquence des fragments d'ADN ayant une taille moyenne de 700 bp, ce qui signifie que les polymorphismes éloignés de plus de 700 bp ne peuvent pas être phasés, ce qui peut donner lieu à des ambiguïtés hétérozygotes. » à la section sur les limitations.
IFU095 v1.2	08 mai 20	Mise à jour des interférences de substances
IFU095 v1.3	13 mai 20	Ajout de la biotine au tableau des substances pouvant causer des interférences. Ajout de détails sur l'échantillon de contrôle à la section 1.9
IFU095 v1.4	20 mai 20	Mise à jour de la section Contenu du kit 1.4 AlloSeq Tx et conditions de stockage : 2x tubes pour Tagmentation Wash Buffer, 2x tubes pour Capture Wash Buffer.
IFU095 v1.5	05 Juin 20	Modifications effectuées : <ul style="list-style-type: none"> - Correction du H714 dans le tableau des réactifs de la section 2.2, - Correction de la référence à la capture hybride de la section 3.0, - Ajout de la référence à PhiX dans Consommables, - Ajout de la référence aux cahiers de travail pour le point 3.1.5 et 3.2.5.
IFU095 v1.6	20 Oct 20	Ajout d'une note sur l'utilisation de NaOH.
IFU095 v2.0	26 mars 21	Distributeur mis à jour de Vienne à Stockholm dans la section 8.0 selon la référence CR 2020-097. Mise à jour des renseignements du réactif iSeq v1 pour indiquer qu'il est arrêté et remplacé par la v2 dans la section 7.0 selon la référence CR 2020-077. Correction de 25 par 12 pour le nombre de cycles de décongélation à la section 1.4.
IFU095 v3.0	6 mai 21	Mise à jour du contenu suivant : <ul style="list-style-type: none"> • Section 1 : Section sur les cahiers de travail d'assistance vers la section 9 ; ajout de IFU095-5. Ajout de l'explication concernant le workflow Original vs Early Pooling. Ajout du contenu sur les gènes ciblés dans ASTX17.1(24)-B-IVD Mise à jour du formatage du tableau du contenu du kit Tx Ajout de la référence du tampon buccal (RUO) Correction de la limite de détection pour indiquer ADN et non la concentration de l'ADN Ajout d'un avertissement H318 pour le 2N NaOH, des avertissements de danger H351 et H373 pour les Capture Beads, d'un avertissement H351 pour l'hybridisation Buffer 1 ; ajout de renseignements de sécurité sur le Stop Buffer au tableau • Section 2 – Ajout de la section Préparation de la banque (workflow Early Pooling) • Section 3 – Ajout de la section Capture hybride (workflow Early Pooling) • Mise à jour de la description de la préparation de l'échantillon pour s'aligner avec le cahier de travail • Section 4.2 – Ajout des indices de l'ensemble B dans le tableau, mise à jour de l'estimation de la durée de 2h45 à 1h50, modification de l'étape de centrifugation de 280 x g pendant 30 secondes à 100 x g pendant 10 secondes à l'étape 9, 21f, modification de l'étape de centrifugation de 280 x g pendant 1 minute à 100 x g pendant 10 seconds à l'étape 29, modification de l'étape de centrifugation de 280 x g pendant 10 secondes à 100 x g pendant 10 secondes, étape 36, ajout du commentaire « répétez l'agitation selon l'étape 35 » à l'étape 36. • Sections 4.4/5.7 – Ajout de la clarification sur la plage large (BR) pour tous les tableaux de réactif Qubit

Version	Date	Modification (IFU095-FR v1.0 est traduit du document principal en anglais IFU095_AlloSeq Tx CE IVD v9.0)
		<ul style="list-style-type: none"> • Section 5.3 – Ajout d’un commentaire de clarification, « Maintenez (ne pas dépasser 18 heures à 62 °C, en comptant l’étape n° 4) » dans le tableau du programme d’hybridation. • Section 5.8 – Correction des références de plaque/film par tubes/capuchons • Section 6.0 – Suppression du tableau Ce tableau se trouve dans la section 1.1 • Section 6.2 – Volume total souhaité de MiSeq changé de 100 µl à 30 µl pour correspondre au cahier de travail • Section 6.4 – Commentaire pour clarifier que seuls 20 µl des 100 µl du pool dilué sont chargés dans l’iSeq • Section 9 – Ajout de la mention « Workflow d’origine uniquement » sur la plaque MIDI, ajout d’hypochlorite de sodium (NaOCl) pour un lavage du séquençage après l’analyse. • Section 9 – Modification des noms du réactif MiSeq pour correspondre aux renseignements de commande d’Illumina Ajout du kit de réactif MiSeq v3 (600 cycles) pour AlloSeq Tx 8, ajout des renseignements de commande pour le tube Qubit, et le capuchon, la plaque et le film TapeStation <p>Généralité : Ajout d’ASTX17.1(24)-B-IVD sur la page de couverture. Ajout de « Remplacez le produit dans le stockage après utilisation pour les étapes suivantes. » Recommandations pour les réactifs qui nécessitent d’être conservés pour les étapes suivantes, et correction d’erreurs de formatage mineures, de grammaire, de ponctuation et d’orthographe dans tout le document. Ajout d’une directive supplémentaire « passer au vortex soigneusement » pour toutes les instances de l’utilisation des Purification Beads selon les retours de l’équipe sur le terrain. Correction de toutes les instances de « hybex » en « Hybex » et de « QuBit » en « Qubit ». Mise à jour de la section 2.2 & 4.2 dans le tableau pour le Stop Buffer et correction de « préparation requise » par « pas de préparation requise » Ajout de la mention « importé par » et le symbole selon les normes ISO 15223-1-2021 et IVDR.</p>
IFU095 v4.0	S. O.	Version 4.0 non publiée.
IFU095 v5.0	28 Janv. 22	Corrections grammaticales Correction des déclarations de limitation pour la quantification des contrôles. Correction des caractéristiques de performances pour correspondre à la notice du pack. Corrections en réponse à ZD-2445. Selon l’évaluation résumée, les étapes 8, 12, 18 de la la section 2.3 et l’étape 7 de la section 4.3 ont été mises à jour avec des détails supplémentaires pour mélanger les Tagmentation beads et les Purification beads. Mise à jour du contenu de la boîte pour refléter la configuration mise à jour du kit (SCN 2021-08-13).
	31 mars 22	Ajout de Tx 17 (96) ensemble A et B aux codes de produits, contenu génétique ciblé, contenu du kit. Ajout de détails dans le mode d’emploi pour des instructions sur l’utilisation de l’index préconfiguré en plaque, en particulier les sections 2.2 et 4.2.
IFU095 v6.0	13 juin 22	Ajout de Tx 9 (96) ensemble A et B aux codes de produits, contenu génétique ciblé et utilisation prévue. Suppression du symbole ™ du logo AlloSeq Tx. Correction des valeurs d’OD dans la section Interférences de substances. Alignement de la formulation entre le cahier de travail et le mode d’emploi. Section 5.2, point 12 ; changement du volume d’éthanol de 200 µL à 800 µL. Section 10 : Ajout des exigences concernant les points de vigilance pour les signalements.
IFU095 v7.0	25 janv. 23	Mise à jour de la date du copyright. Ajout de détails à la section 1.1 Principe, suppression de l’information redondante. Mise à jour du tableau de la section 1.3 pour refléter les études de vérification effectuées par CareDx. Section 1.4, suppression de « des études accélérées sont en cours ». Mise à jour de la section 1.6 Exigences vis-à-vis des échantillons ; suppression du tampon buccal, ajout du type d’échantillon, de la stabilité de l’échantillon et des méthodes d’extraction. Miser de la section 1.7, ajout de la « spécificité analytique » au titre de la section, et clarification

Version	Date	Modification (IFU095-FR v1.0 est traduit du document principal en anglais IFU095_AlloSeq Tx CE IVD v9.0)
		sur l'EDTA en tant que substance interférente. Sections 1.9 et 1.10, suppression des informations non nécessaires. Suppression de la « limite de détection » (information ajoutée à la section 1.6 Exigences vis-à-vis des échantillons). Mise à jour de la section 9 avec d'autres paramètres du thermocycleur à utiliser avec le test Tx.
IFU095 v8.0	03 Nov. 23	Ajout d'un mandataire suisse.
IFU095 v9.0	22 Fév. 24	Ajout de la Mention de Danger H373 pour le Hybridisation Buffer 1. Une note sur l'utilisation des embouts de barrière a été ajoutée à la section 1.12. Les instructions pour la manipulation des amorces PCR dans les sections 3.3. et 5.5 ont été modifiées pour plus de clarté. Le tube de 5 mL a été ajouté comme option dans la Section de Préparation de la Bibliothèque.
IFU095-FR v1.0	25 mars 24	La première traduction en français.