

# Bộ kit TruSeq™ Custom Amplicon Dx

DÙNG CHO CHẨN ĐOÁN TRONG ỐNG NGHIỆM

Danh mục số 20005718: 1-4 lần sử dụng, tối đa 96 Thư viện

## Mục đích sử dụng

Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx của Illumina là bộ thuốc thử và vật tư tiêu hao dùng để chuẩn bị thư viện mẫu từ DNA tách chiết từ máu toàn phần ngoại vi và mô nhúng parafin, cố định bằng formalin (FFPE). Người dùng cần cung cấp thuốc thử cụ thể theo chất phân tích để chuẩn bị các thư viện nhắm đến các vùng hệ gen cụ thể cần quan tâm. Các thư viện mẫu được tạo ra để sử dụng trên máy phân tích trình tự DNA số lượng-lớn của Illumina.

## Nguyên tắc của quy trình

Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx của Illumina giúp bạn tự chuẩn bị các thư viện dùng để giải trình tự DNA từ các mẫu xét nghiệm máu toàn phần ngoại vi và mô đã cố định bằng formalin và nhúng parafin (FFPE). Nhờ sử dụng thuốc thử được cung cấp trong Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx, DNA hệ gen được xử lý thông qua các bước chuẩn bị thư viện, đặc biệt khuếch đại các vùng hệ gen dự kiến của mỗi mẫu bằng các oligonucleotide cụ thể theo chất phân tích, đồng thời bổ sung các chỉ thị và trình tự thu thập tế bào dòng chảy vào sản phẩm đã khuếch đại. DNA từ mẫu xét nghiệm máu toàn phần tuân theo quy trình công việc dòng mầm, trong khi DNA từ mô FFPE tuân theo quy trình công việc sinh dưỡng. Các thư viện mẫu kết quả sẵn sàng cho quá trình giải trình tự trên máy phân tích trình tự DNA số lượng-lớn của Illumina và phân tích từ các mô-đun phần mềm của thiết bị tương ứng với quy trình công việc dòng mầm hoặc sinh dưỡng.

Tất cả các thuốc thử đều được cung cấp ngoại trừ các oligonucleotide cụ thể theo chất phân tích do người dùng thiết kế. Quá trình chuẩn bị thư viện gồm 4 bước chính: Tạo thể lai, Mở rộng-buộc thắt, Khuếch đại PCR và Chuẩn hóa thư viện.

### Chuẩn bị thư viện

- **Tạo thể lai**—Lai nhóm gộp gồm các oligonucleotide ngược hướng và xuôi hướng cụ thể cho các vùng quan tâm với DNA hệ gen mẫu. Vào cuối quá trình này, quy trình rửa ba bước với bộ lọc có khả năng lựa chọn kích cỡ sẽ loại bỏ các oligonucleotide không gắn kết khỏi DNA hệ gen.
- **Mở rộng-buộc thắt**—Kết nối các oligonucleotide ngược hướng và xuôi hướng đã tạo thể lai. Một DNA polymerase mở rộng từ các oligonucleotide ngược hướng qua vùng mục tiêu, sau đó buộc thắt vào đầu 5' của oligonucleotide xuôi hướng bằng DNA ligase. Kết quả là tạo ra các sản phẩm có chứa các oligonucleotide đặc trưng cho các vùng quan tâm nằm giữa các trình tự cần thiết để khuếch đại.
- **Khuếch đại PCR**—Khuếch đại các sản phẩm mở rộng-buộc thắt bằng các mồi bổ sung trình tự chỉ thị để ghép kênh mẫu và trình tự thu thập tế bào dòng chảy cần thiết để tạo cụm trên thiết bị giải trình tự của Illumina. Vào cuối quá trình này, một quy trình tinh sạch PCR sẽ làm sạch các sản phẩm PCR (được gọi là thư viện).
- **Chuẩn hóa thư viện**—Chuẩn hóa số lượng của mỗi thư viện để đảm bảo lượng thư viện có mặt ngang bằng hơn trong thư viện gộp nhóm cuối cùng. Vào cuối quá trình này, thư viện đã gộp nhóm được nạp vào một thiết bị giải trình tự của Illumina để giải trình tự bằng phản ứng hóa học giải trình tự tổng hợp (SBS).

## Các giới hạn của quy trình

- 1 Dùng cho chẩn đoán *trong ống nghiệm*.
- 2 Thành phần indel (xóa, chèn và kết hợp) có độ dài lớn hơn 25 bp không được căn chỉnh bằng phần mềm xét nghiệm. Do đó, phần mềm xét nghiệm không phát hiện được các indel có độ dài lớn hơn 25 bp.
- 3 Hệ thống đã được xác thực để phát hiện các biến thể nucleotide đơn (SNV) và các vùng xóa lên đến 25 bp cũng như vùng chèn lên đến 24 bp khi sử dụng với Mô-đun biến thể dòng mầm và sinh dưỡng. Đối với phát hiện sinh dưỡng, ở tần số biến thể 0,05, vùng xóa 25 bp và vùng chèn 18 bp đã được thử nghiệm.

- 4 Đoạn đọc amplicon có thành phần biến thể cực hạn có thể không được phần mềm xét nghiệm căn chỉnh, dẫn đến việc vùng đó được báo cáo là thể đại. Các thành phần cực hạn này bao gồm:
  - Đoạn đọc chứa nhiều hơn ba indel
  - Đoạn đọc có độ dài tối thiểu 30 bp với thành phần SNV lớn hơn 4% tổng độ dài mục tiêu amplicon (không bao gồm các vùng thăm dò)
  - Kết quả đọc có độ dài dưới 30 bp với thành phần SNV lớn hơn 10% tổng độ dài amplicon (bao gồm các vùng thăm dò)
- 5 Các biến thể lớn (bao gồm các biến thể đa nucleotide, vùng chèn, xóa hoặc kết hợp lớn) có thể được báo cáo là các biến thể riêng biệt nhỏ hơn trong VCF đầu ra.
- 6 Các biến thể xóa có thể bị lọc hoặc bỏ sót khi mở rộng hai amplicon dạng ô nếu độ dài xóa lớn hơn hoặc bằng vùng chồng lấn giữa các amplicon dạng ô.
- 7 Hệ thống không thể phát hiện vùng chèn và xóa nếu các vùng đó xảy ra ngay liền kề mồi và không có amplicon chồng lấn. Đối với các vùng có amplicon chồng lấn, xét nghiệm không thể phát hiện vùng xóa khi vùng chồng lấn nhỏ hơn kích thước vùng xóa cần phát hiện. Ví dụ: nếu vùng chồng lấn giữa hai amplicon liền kề là hai (2) base, xét nghiệm không thể phát hiện vùng xóa nào bao gồm cả hai base đó. Có thể phát hiện một vùng xóa base duy nhất tại một trong hai base đó.
- 8 Như với bất kỳ quy trình chuẩn bị thư viện dựa trên quá trình tạo thể lai nào, các đa hình cơ bản, đột biến, vùng chèn hoặc xóa trong các vùng gắn kết oligonucleotide có thể ảnh hưởng đến các alen được thăm dò và theo đó là các kết quả phát hiện trong khi giải trình tự. Ví dụ:
  - Một biến thể cùng pha với một biến thể trong vùng mồi có thể không được khuếch đại, dẫn đến trường hợp âm tính giả.
  - Các biến thể trong vùng mồi có thể ngăn cản sự khuếch đại của alen tham chiếu, dẫn đến phát hiện biến thể đồng hợp tử không chính xác.
  - Các biến thể indel trong vùng mồi có thể dẫn đến phát hiện dương tính giả ở cuối đoạn đọc liền kề với mồi.
- 9 Có thể lọc các indel do sai lệch sợi nếu chúng xảy ra gần cuối đoạn đọc và bị cắt mềm trong quá trình căn chỉnh.
- 10 Các MNV nhỏ chưa được xác thực.
- 11 Biến thể số lượng bản sao hoặc biến thể cấu trúc, chẳng hạn như hợp nhất hoặc chuyển vị, chưa được xác thực.
- 12 Các giới hạn dành riêng cho dòng mầm
  - Mô-đun biến thể dòng mầm được thiết kế để cung cấp kết quả định tính cho phát hiện biến thể dòng mầm (ví dụ: đồng hợp tử, dị hợp tử, thể đại).
  - Khi được sử dụng với Mô-đun biến thể dòng mầm, phạm vi tối thiểu trên mỗi amplicon cần thiết để phát hiện biến thể chính xác là 150x. Số lượng mẫu và tổng số base nhắm mục tiêu sẽ ảnh hưởng đến phạm vi. Thành phần GC và thành phần hệ gen khác có thể ảnh hưởng đến phạm vi.
  - Sự thay đổi số lượng bản sao có thể ảnh hưởng đến việc xác định một biến thể là đồng hợp tử hay dị hợp tử.
  - Các biến thể trong trường hợp lặp lại nhất định được lọc ra khỏi các tệp VCF. Bộ lọc lặp lại RMxN được sử dụng để lọc biến thể nếu tất cả hoặc một phần trình tự biến thể xuất hiện lặp đi lặp lại trong hệ gen tham chiếu liền kề với vị trí biến thể. Đối với phát hiện biến thể dòng mầm, cần ít nhất 9 lần lặp lại trong tham chiếu để lọc biến thể và chỉ xét những lần lặp lại có độ dài tối đa 5 bp (R5x9).
- 13 Các giới hạn dành riêng cho sinh dưỡng
  - Mô-đun biến thể sinh dưỡng được thiết kế để cung cấp kết quả định tính cho phát hiện biến thể sinh dưỡng (ví dụ: sự hiện diện của một biến thể sinh dưỡng có tần số biến thể lớn hơn hoặc bằng 0,026 với giới hạn phát hiện là 0,05).
  - Khi được sử dụng với Mô-đun biến thể sinh dưỡng, phạm vi tối thiểu trên mỗi amplicon cần thiết để phát hiện biến thể chính xác là 450x trên mỗi nhóm gộp oligonucleotide. Số lượng mẫu và tổng số base nhắm mục tiêu sẽ ảnh hưởng đến phạm vi. Thành phần GC và thành phần hệ gen khác có thể ảnh hưởng đến phạm vi.
  - Các biến thể trong trường hợp lặp lại nhất định được lọc ra khỏi các tệp VCF. Bộ lọc lặp lại RMxN được sử dụng để lọc biến thể ở tất cả hoặc một phần trình tự biến thể xuất hiện lặp đi lặp lại trong hệ gen tham chiếu liền kề với vị trí biến thể. Đối với phát hiện biến thể sinh dưỡng, cần ít nhất 6 lần lặp lại trong tham chiếu để lọc biến thể và chỉ xét những lần lặp lại có độ dài tối đa 3 bp (R3x6).

- Mô-đun biến thể sinh dưỡng không thể phân biệt giữa biến thể dòng mầm và sinh dưỡng. Mô-đun này được thiết kế để phát hiện các biến thể trên một loạt các tần số biến thể, nhưng không thể sử dụng tần số biến thể để phân biệt các biến thể sinh dưỡng với các biến thể dòng mầm.
- Mô hình thường trong mẫu xét nghiệm ảnh hưởng đến việc phát hiện các biến thể. Giới hạn phát hiện được báo cáo dựa trên tần số biến thể liên quan đến tổng số DNA tách chiết từ cả mô khối u và mô bình thường.

## Thành phần sản phẩm

Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx của Illumina bao gồm các thành phần sau:

- Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx (Danh mục số 20005718)

## Thuốc thử

### Các thuốc thử được cung cấp

Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx của Illumina được định cấu hình để xử lý lên đến 96 thư viện trong một lần sử dụng (96 mẫu cho quy trình công việc dòng mầm và 40 mẫu cho quy trình công việc sinh dưỡng [cần có 2 thư viện cho mỗi mẫu]). Bộ kit cũng sẽ hỗ trợ bốn lần sử dụng để chuẩn bị thư viện với 24 thư viện/lần sử dụng đối với quy trình công việc dòng mầm và 20 thư viện/lần sử dụng đối với quy trình công việc sinh dưỡng.

Xem các bảng sau đây để biết danh sách đầy đủ các thuốc thử được cung cấp trong bộ kit này.

### Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx, hộp 1

**Bảng 1** Hộp Thuốc thử tiền khuếch đại 1A

Thành phần	Số lượng	Thể tích đóng gói	Thành phần hoạt tính	Bảo quản
Dung dịch đệm lai	1 ống	4,32 ml	Dung dịch nước đệm có chứa muối và formamide	-25°C đến -15°C
Hỗn hợp mỡ rộng-buộc thắt	1 ống	4,8 ml	Dung dịch nước đệm pha trộn độc quyền gồm DNA polymerase, DNA ligase và dNTP	-25°C đến -15°C
Mồi chỉ thị A (A501) - H (A508)	1 ống mỗi mồi	192 µl	Mồi PCR với trình tự chỉ thị và adapter giải trình tự	-25°C đến -15°C
Mồi chỉ thị 1 (A701) - 12 (A712)	1 ống mỗi mồi	128 µl	Mồi PCR với trình tự chỉ thị và adapter giải trình tự	-25°C đến -15°C
PCR Polymerase	1 ống	56 µl	DNA polymerase độc quyền	-25°C đến -15°C
Hỗn hợp tổng thể PCR	1 ống	2,8 ml	Dung dịch nước đệm có chứa muối và dNTP	-25°C đến -15°C

**Bảng 2** Hộp Thuốc thử hậu khuếch đại 1B

Thành phần	Số lượng	Thể tích đóng gói	Thành phần hoạt tính	Bảo quản
Chất pha loãng chuẩn hóa thư viện	1 ống	4,6 ml	Dung dịch nước đệm có chứa muối, 2-Mercaptoethanol và formamide	-25°C đến -15°C
Dung dịch đệm pha loãng thư viện	1 ống	4,5 ml	Dung dịch nước đệm	-25°C đến -15°C
Chứng nội PhiX	1 ống	10 µl	Dung dịch nước đệm có chứa DNA hệ gen PhiX	-25°C đến -15°C

Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx, hộp 2

**Bảng 3** Thuốc thử tiền khuếch đại

Thành phần	Số lượng	Thể tích đóng gói	Nội dung	Bảo quản
Khay lọc	4 khay	Không áp dụng	Khay microtiter polypropylene có màng polyethersulfone đã biến đổi	15°C đến 30°C

**Bảng 4** Thuốc thử hậu khuếch đại

Thành phần	Số lượng	Thể tích đóng gói	Thành phần hoạt tính	Bảo quản
Dung dịch đệm rửa giải	1 ống	4,8 ml	Dung dịch nước đệm	15°C đến 30°C
Dung dịch đệm bảo quản thư viện	1 ống	3,5 ml	Dung dịch nước đệm	15°C đến 30°C



**LƯU Ý**

Hộp 2 chứa thuốc thử tiền khuếch đại và hậu khuếch đại trong một hộp duy nhất.

Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx, hộp 3

**Bảng 5** Hộp Thuốc thử tiền khuếch đại 3A

Thành phần	Số lượng	Thể tích đóng gói	Thành phần hoạt tính	Bảo quản
Dung dịch đệm rửa mạnh	1 chai	24 ml	Dung dịch nước đệm có chứa muối, 2-Mercaptoethanol và formamide	2°C đến 8°C
Dung dịch đệm rửa đa năng	1 ống	4,8 ml	Dung dịch nước đệm có chứa muối	2°C đến 8°C

**Bảng 6** Hộp Thuốc thử hậu khuếch đại 3B

Thành phần	Số lượng	Thể tích đóng gói	Thành phần hoạt tính	Bảo quản
Hạt tinh sạch PCR	1 ống	5 ml	Dung dịch nước đệm có chứa hạt thuận từ pha rắn và polyethylene glycol	2°C đến 8°C
Nước rửa chuẩn hóa thư viện	2 ống	4,8 ml	Dung dịch nước đệm có chứa muối, 2-Mercaptoethanol và formamide	2°C đến 8°C
Hạt thư viện	1 ống	1,2 ml	Dung dịch nước đệm có chứa hạt thuận từ pha rắn	2°C đến 8°C

**Yêu cầu tự chuẩn bị thuốc thử chứ không được cung cấp**

**Nhóm gộp oligonucleotide tùy chỉnh**

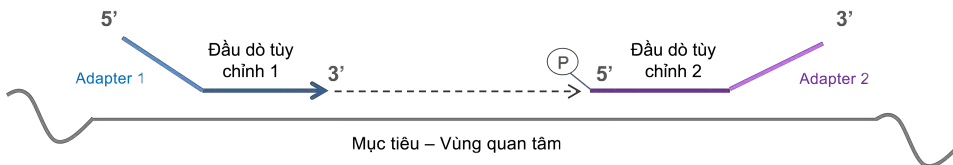
Các oligonucleotide cụ thể theo chất phân tích sẽ do người dùng phát triển và không đi kèm với bộ kit chuẩn bị thư viện.

**Hình 1** minh họa nguyên tắc thiết kế oligo tùy chỉnh. Thiết kế oligo phải đáp ứng các yêu cầu sau:

- Đối với quy trình công việc dòng mầm, phải thiết kế một cặp oligonucleotide tùy chỉnh cho mỗi amplicon: một Đầu dò tùy chỉnh 1 (oligonucleotide dành riêng cho lô-cut ngược hướng [ULSO]) và một Đầu dò tùy chỉnh 2 (oligonucleotide dành riêng cho lô-cut xuôi hướng [DLSO]).
- Đối với quy trình công việc sinh dưỡng, phải thiết kế hai cặp oligonucleotide tùy chỉnh cho mỗi amplicon. Mỗi cặp gồm một Đầu dò tùy chỉnh 1 (oligonucleotide dành riêng cho lô-cut ngược hướng [ULSO]) và một Đầu dò tùy chỉnh 2 (oligonucleotide dành riêng cho lô-cut xuôi hướng [DLSO]). Một cặp phải nhắm mục tiêu vào sợi cộng còn cặp kia nhắm vào sợi trừ.

- Các oligonucleotide tùy chỉnh phải bao quanh vùng quan tâm. Vùng quan tâm có thể nằm trong khoảng từ 150 đến 250 bp để cho phép giải trình tự hoàn chỉnh cho phân đoạn trong một lần chạy giải trình tự 2 x 150 chu kỳ.
- Cả hai oligonucleotide phải tạo thể lai với cùng một sợi DNA.
- Các oligonucleotide tùy chỉnh phải chứa các adapter dành riêng cho Illumina để cho phép bổ sung các chỉ thị và adapter giải trình tự bằng PCR.
  - Phải đặt Adapter 1 (5'- CAACGATCGTCGAAATTCGC-3') ở đầu 5' của Đầu dò tùy chỉnh 1 (ULSO).
  - Phải đặt Adapter 2 (5'- AGATCGGAAGAGCGTCGTGTA-3') ở đầu 3' của Đầu dò tùy chỉnh 2 (DLSO).
- Đầu dò tùy chỉnh 2 (DLSO) được phosphoryl hóa ở đầu 5' để hỗ trợ bước buộc thắt sau khi mở rộng Đầu dò tùy chỉnh 1 (ULSO).

Hình 1 Thiết kế oligo cho Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx



- Các thông số thiết kế oligonucleotide sau đây được đề xuất:
  - Khoảng chiều dài từ 22 đến 30 nucleotide (vùng cụ thể theo gen).
  - Tổng kích thước của amplicon từ 190 đến 290 cặp base, bao gồm bộ adapter cho quy trình công việc dòng mào hoặc 160 đến 250 cặp base, bao gồm bộ adapter cho quy trình công việc sinh dưỡng.
  - Lượng GC mỗi được đề xuất có thể nằm trong khoảng từ 25% đến 70%.
  - Khoảng Tm (nhiệt độ nóng chảy) được đề xuất là từ 55°C đến 70°C.
  - Nồng độ oligonucleotide phải là 15 nM/oligo trong nhóm gộp tùy chỉnh.
  - Không cần tinh chế oligonucleotide bổ sung sau khi tổng hợp. Nên khử muối.
  - Có thể pha loãng oligonucleotide trong dung dịch đệm TE.
  - Số lượng amplicon trên mỗi mẫu có thể nằm trong khoảng từ 16 đến 384.
  - Thiết kế các oligonucleotide sao cho để lại base dư giữa đầu mỗi và vùng quan tâm nhằm hỗ trợ phát hiện vùng chèn và xóa ở các điểm cực của vùng quan tâm (xem mục 7 của phần Các giới hạn của quy trình trên trang 2).
  - Nếu cần tạo ô để bao phủ toàn bộ vùng quan tâm, khu vực chồng lấn trong vùng mục tiêu giữa các vị trí gắn kết của các bộ đầu dò liền kề phải lớn hơn 1 bp so với kích thước vùng xóa cần phát hiện. Ví dụ: để phát hiện các vùng xóa 3 bp, vùng chồng lấn giữa các bộ đầu dò liền kề phải lớn hơn 4 bp. Các bộ đầu dò liền kề phải được thiết kế thành các sợi xen kẽ để tránh hiện tượng nhiễu.

Hãy tham khảo phần [Các giới hạn của quy trình](#) để biết phạm vi bao phủ tối thiểu trên mỗi amplicon cần thiết cho việc phát hiện biến thể. Số lượng mẫu mỗi lần chạy phải được tính toán dựa trên độ bao phủ tối thiểu mà thiết bị giải trình tự yêu cầu và sẽ phụ thuộc vào tổng chiều dài và độ bao phủ đồng đều của (các) nhóm gộp oligonucleotide tùy chỉnh.

Phải tạo tệp phiếu kê khai cho mỗi nhóm gộp oligonucleotide tùy chỉnh. Phiếu kê khai là tệp văn bản chứa thông tin về các vùng hệ gen được nhắm mục tiêu và cần thiết cho hoạt động chạy phân tích của thiết bị giải trình tự. Hãy truy cập vào trang web của Illumina để tải mẫu tệp phiếu kê khai xuống.

#### Thuốc thử tiền khuếch đại

- NaOH 10 N (chuẩn bị từ viên nén hoặc sử dụng dung dịch chuẩn)
- Dung dịch đệm TE
- Nước không có RNase/DNase

#### Thuốc thử hậu khuếch đại

- NaOH 10 N (chuẩn bị từ viên nén hoặc sử dụng dung dịch chuẩn)
- Ethanol, 200 proof cho sinh học phân tử
- Dung dịch đệm TE
- Nước không có RNase/DNase

## Bảo quản và xử lý

- 1 Nhiệt độ phòng là khoảng nhiệt độ từ 15°C đến 30°C.
- 2 Các thuốc thử sau đây được vận chuyển đông lạnh và ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C cho đến ngày hết hạn theo quy định.
  - Dung dịch đệm lai
  - Hỗn hợp mở rộng-buộc thắt
  - Mỗi chỉ thị A (A501) - H (A508)
  - Mỗi chỉ thị 1 (A701) - 12 (A712)
  - PCR Polymerase
  - Hỗn hợp tổng thể PCR
  - Chất pha loãng chuẩn hóa thư viện
  - Dung dịch đệm pha loãng thư viện
  - Chứng nội PhiXThuốc thử ổn định trong tối đa sáu chu kỳ đông lạnh/rã đông diễn ra trước ngày hết hạn theo quy định.
- 3 Các thuốc thử sau đây được vận chuyển ướp lạnh và ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C cho đến ngày hết hạn theo quy định.
  - Dung dịch đệm rửa mạnh
  - Dung dịch đệm rửa đa năng
  - Hạt tinh sạch PCR
  - Hạt thư viện
  - Nước rửa chuẩn hóa thư viện
- 4 Các thuốc thử sau đây được vận chuyển ở nhiệt độ môi trường và ổn định khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng cho đến ngày hết hạn theo quy định:
  - Dung dịch đệm rửa giải
  - khay lọc
  - Dung dịch đệm bảo quản thư viện
- 5 Những thay đổi về hình thức bên ngoài của thuốc thử được cung cấp có thể cho thấy dấu hiệu vật liệu bị hư hỏng. Nếu có các thay đổi về hình thức bên ngoài (ví dụ: màu sắc của thuốc thử thay đổi rõ ràng hoặc thuốc thử bị vẩn đục rõ ràng do nhiễm vi sinh vật), không được sử dụng thuốc thử.
- 6 Dung dịch đệm lai, Dung dịch đệm rửa mạnh và thuốc thử Chất pha loãng chuẩn hóa thư viện có thể tạo thành kết tủa hoặc tinh thể nhìn thấy được. Trước khi sử dụng, hãy trộn xoáy mạnh rồi kiểm tra bằng mắt thường để đảm bảo không có kết tủa.
- 7 Làm theo các phương thức tối ưu sau đây khi xử lý Hạt tinh sạch PCR và Hạt thư viện:
  - Không cấp đông hạt.
  - Để hạt ở nhiệt độ phòng.
  - Trộn xoáy hạt cho đến khi hòa tan kỹ và màu sắc đồng nhất ngay trước khi sử dụng.
  - Dùng pipet hút lên và xuống mười lần để trộn kỹ mẫu sau khi thêm hạt. Có thể dùng máy lắc để trộn đều mẫu.
  - Ủ hỗn hợp hạt/mẫu ở nhiệt độ phòng trong toàn bộ thời gian được chỉ định.
  - Làm theo hướng dẫn khi sử dụng chân đế từ tính. Chờ cho dung dịch trở nên trong suốt trước khi hút. Giữ khay trên chân đế từ tính khi từ từ hút dịch nổi, chú ý không làm xáo trộn các hạt đã tách.
- 8 Có thể đặt khay khuếch đại PCR trên máy luân nhiệt qua đêm hoặc bảo quản ở một trong hai điều kiện được liệt kê dưới đây. Hãy dán kín giếng khay trước khi bảo quản.
  - 2°C đến 8°C trong tối đa hai ngày
  - -25°C đến -15°C trong tối đa 1 tuần
- 9 Không cấp đông Hạt thư viện hoặc trộn với thuốc thử Chất pha loãng chuẩn hóa thư viện nếu chưa sử dụng ngay.
- 10 Có thể bảo quản khay chuẩn hóa thư viện (LNP) đã hoàn thành ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong tối đa 3 giờ hoặc từ -25°C đến -15°C trong tối đa 1 tuần.

- 11 Có thể bảo quản khay bảo quản (SGP) ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C trong tối đa 48 giờ.
- 12 Có thể bảo quản thư viện amplicon đã pha loãng (DAL) ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C trong tối đa 84 ngày.
- 13 Nạp nhóm gộp amplicon đã pha loãng vào hộp thuốc thử ngay sau khi biến tính.

## Thiết bị và vật liệu

Có cung cấp thiết bị và vật liệu, bán riêng

- 1 Máy phân tích trình tự DNA số lượng lớn của Illumina và các vật tư tiêu hao giải trình tự liên quan
- 2 **Bộ kit TruSeq Index Plate Fixture**, Danh mục số FC-130-1005
- 3 **Bộ kit TruSeq Index Plate Fixture & Collar**, Danh mục số FC-130-1007
- 4 **Nắp thay thế cho adapter chỉ thị**, Danh mục số DX-502-1003
- 5 Bộ kit QC TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE, Danh mục số 20006259 (cho quy trình công việc sinh dưỡng)

Yêu cầu tự chuẩn bị thiết bị và vật liệu chứ không được cung cấp

Thiết bị và vật liệu tiền khuếch đại

- 1 **Khối ủ nhiệt**—Cần có một khối ủ nhiệt cho một khay 96 giếng. Khối ủ nhiệt phải đáp ứng các thông số kỹ thuật sau.
  - Nắp đã gia nhiệt
  - Khoảng nhiệt độ: Môi trường +5°C đến 99°C
  - Mức điều hòa nhiệt độ:  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  ở 37°C;  $\pm 0,4^\circ\text{C}$  ở 60°C
- 2 **Máy ủ mẫu**—Cần có một máy ủ (lò tạo thể lai). Máy ủ phải đáp ứng các thông số kỹ thuật sau.
  - Khoảng nhiệt độ: 10°C đến 100°C
  - Mức điều hòa nhiệt độ:  $\pm 0,2^\circ\text{C}$
- 3 **Máy ly tâm để bàn**—Một máy ly tâm để bàn (cần có một máy ly tâm riêng trong khu vực thí nghiệm hậu khuếch đại). Máy ly tâm phải đáp ứng các thông số kỹ thuật sau.
  - Có thể duy trì ở 20°C
  - Vừa với khay 96 giếng có bộ phận lọc
  - Chấp nhận ống 5 ml
  - Đạt tốc độ từ 280 đến 2400 × g
- 4 **Máy dán nhiệt**—Được đề xuất để tạo thể lai qua đêm nhằm tránh tình trạng bay hơi ở nhiệt độ ủ 40°C.
- 5 **Pipet chính xác**—Cần có một bộ pipet chính xác. (Yêu cầu một bộ riêng trong khu vực thí nghiệm hậu khuếch đại). Việc sử dụng pipet chính xác sẽ đảm bảo phân phối thuốc thử và mẫu chính xác. Có thể sử dụng pipet một kênh hoặc đa kênh nếu pipet được hiệu chuẩn thường xuyên và có độ chính xác trong khoảng 5% thể tích đã nêu.
- 6 **Vật tư tiêu hao**—Cần có các vật tư tiêu hao sau đây.
  - Khay PCR 96 giếng có gờ, 0,2 ml, polypropylene hoặc tương đương
  - Khay bảo quản 96 giếng, 0,8 ml (khay MIDI)
  - Chậu dung dịch, PVC, không có RNase, DNase (máng)
  - Màng dán nhôm kết dính (chịu được khoảng nhiệt độ bao gồm mức 95°C) hoặc màng dán tương thích với máy dán nhiệt
  - Màng dán tương thích với máy luân nhiệt PCR
  - Đầu pipet chống sol khí

Thiết bị và vật liệu hậu khuếch đại

- 1 **Máy luân nhiệt**—Cần có một máy luân nhiệt. Máy luân nhiệt phải có nắp đã gia nhiệt và đáp ứng các thông số kỹ thuật về hiệu suất như sau:
  - Khoảng kiểm soát nhiệt độ: 4°C đến 99°C
  - Độ chính xác kiểm soát:  $\pm 0,25^\circ\text{C}$  từ 35°C đến 99°C

- 2 **Máy lắc khay vi thể**—Cần có một máy lắc khay vi thể trong khu vực thí nghiệm hậu khuếch đại. Máy lắc khay phải đáp ứng các thông số kỹ thuật về hiệu suất như sau:
  - Tốc độ trộn tối đa: 3000 vòng/phút
  - Khoảng tốc độ trộn: 200 đến 3000 vòng/phút
- 3 **Máy ly tâm để bàn**—Cần có một máy ly tâm để bàn (yêu cầu một máy ly tâm riêng trong khu vực thí nghiệm tiền khuếch đại). Máy ly tâm phải đáp ứng các thông số kỹ thuật sau.
  - Có thể duy trì ở 20°C
  - Vừa với khay MIDI 96 giếng
  - Chấp nhận ống 5 ml
  - Đạt tốc độ từ 280 đến 2400 × g
- 4 **Khối ủ nhiệt**—Cần có một khối ủ nhiệt cho ống 1,5 ml đến 2 ml. Khối ủ nhiệt phải đáp ứng các thông số kỹ thuật sau.
  - Khoảng nhiệt độ: Môi trường +5°C đến 99°C
  - Mức điều hòa nhiệt độ: ±0,1°C ở 37°C; ±0,4°C ở 60°C
- 5 **Chân đế từ tính**—Cần có một chân đế từ tính cho khay 96 giếng. Theo quan sát, hiệu suất sẽ cao hơn khi các nam châm nằm ở mặt bên của chân đế thay vì phía dưới.
- 6 **Pipet chính xác**—Cần có một bộ pipet chính xác. (Yêu cầu một bộ riêng trong khu vực thí nghiệm tiền khuếch đại). Cần sử dụng pipet chính xác để đảm bảo phân phối thuốc thử và mẫu chính xác. Có thể sử dụng pipet một kênh hoặc đa kênh nếu pipet được hiệu chuẩn thường xuyên và có độ chính xác trong khoảng 5% thể tích đã nêu.
- 7 **Vật tư điện di trên gel**—Cần có vật tư và thiết bị điện di trên gel cùng với phương pháp nhuộm thích hợp để tạo hình sản phẩm PCR trong gel.
- 8 **Vật tư tiêu hao**—Cần có các vật tư tiêu hao sau đây.
  - Khay PCR 96 giếng có gờ, 0,2 ml, polypropylene hoặc tương đương
  - Khay bảo quản 96 giếng, 0,8 ml (khay MIDI)



#### LƯU Ý

Đảm bảo khay 96 giếng vừa vặn và tương thích với chân đế từ tính.

- Gel TBE agarose 2–4%
- Thang trọng lượng phân tử DNA 100 bp
- Thuốc nhuộm nạp DNA
- Ống hình nón, 15 ml
- Ống ly tâm micro Eppendorf (khuyến dùng đầu vặn)
- Chuỗi 8 ống PCR
- Chậu dung dịch, PVC, không có RNase, DNase (máng)
- Màng dán nhôm kết dính
- Microseal® 'B' (Bio-Rad) hoặc tương đương
- Đầu pipet chống sol khí

## Thu thập, vận chuyển và bảo quản mẫu xét nghiệm

### Quy trình công việc dòng mầm

Phải đáp ứng các điều kiện sau đây khi xử lý máu và DNA tách chiết từ máu.



#### THẬN TRỌNG

Xử lý tất cả các mẫu xét nghiệm máu như thể các mẫu đó được biết là có khả năng lây nhiễm HIV, HBV và các mầm bệnh lây qua đường máu khác.

- 1 Có thể sử dụng mẫu xét nghiệm máu toàn phần thu thập được trong ống K<sub>2</sub>EDTA.
- 2 Bảo quản mẫu xét nghiệm máu toàn phần không quá bảy ngày ở nhiệt độ phòng, tối đa 30 ngày ở 2°C đến 8°C, hoặc tối đa 30 ngày nếu đông lạnh ở -25°C đến -15°C.



- 3 Vận chuyển mẫu máu toàn phần không quá bảy ngày ở nhiệt độ phòng, 30 ngày ở 2°C đến 8°C, hoặc 30 ngày nếu đông lạnh ở -25°C đến -15°C. Việc vận chuyển máu toàn phần phải tuân thủ các quy định của quốc gia, liên bang, tiểu bang và địa phương về hoạt động vận chuyển các tác nhân gây bệnh.
- 4 Các mẫu DNA hệ gen đông lạnh ổn định trong 6 chu kỳ đông lạnh/rã đông.

**LƯU Ý**

Không quan sát thấy tác dụng bất lợi nào về hiệu suất của bộ kit với mẫu xét nghiệm máu toàn phần khi có bilirubin, cholesterol, hemoglobin, triglyceride hoặc EDTA tăng cao.

**Tách chiết DNA (Quy trình công việc dòng mầm)**

Có thể sử dụng bất kỳ phương pháp tách chiết DNA đã xác thực nào.

**Quy trình công việc sinh dưỡng**

Phải đáp ứng các điều kiện sau đây khi xử lý mô khối u và DNA tách chiết từ mô này.

- 1 Mô khối u cần được cố định bằng formalin và nhúng parafin.
- 2 DNA hệ gen đã tách chiết phải được bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong tối đa 28 ngày hoặc bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C trong tối đa 161 ngày.
- 3 Các mẫu DNA hệ gen đông lạnh ổn định trong 2 chu kỳ đông lạnh/rã đông.

**LƯU Ý**

Không quan sát thấy tác dụng bất lợi nào về hiệu suất của bộ kit với mô FFPE khi có Dung dịch khử parafin, sáp parafin, xylene, ethanol, Proteinase K, dung dịch rửa, hemoglobin hoặc mô hoại tử.

**Tách chiết DNA (Quy trình công việc sinh dưỡng)**

Illumina khuyến nghị sử dụng các bộ kit tách chiết DNA dựa trên cột, sử dụng gấp đôi lượng Proteinase K, ½ Proteinase K qua đêm có khuấy trộn và dung dịch rửa giải cuối cùng với thể tích ít nhất là 30 µl. Không khuyến khích sử dụng phương pháp tách chiết bằng hạt và phương pháp chỉ dùng ly giải tách chiết tế bào thô với các thuốc thử này.

**Cảnh báo và biện pháp phòng ngừa****THẬN TRỌNG**

Luật liên bang chỉ cho phép thiết bị này được bán bởi hoặc theo yêu cầu của bác sĩ hoặc bác sĩ hành nghề khác được cấp phép bởi luật của Tiểu bang nơi bác sĩ đó hành nghề, sử dụng hoặc yêu cầu sử dụng thiết bị.

**CẢNH BÁO**

Bộ thuốc thử này chứa các hóa chất độc hại tiềm ẩn. Có thể xảy ra chấn thương nếu hít phải, nuốt phải, tiếp xúc với da và mắt. Mang thiết bị bảo hộ, bao gồm bảo vệ mắt, găng tay và áo choàng phòng thí nghiệm tương ứng với các nguy cơ phơi nhiễm. Xử lý thuốc thử đã sử dụng như chất thải hóa học và thải bỏ theo các luật và quy định hiện hành của địa phương, quốc gia và khu vực. Để biết thêm thông tin về môi trường, sức khỏe và an toàn, hãy xem SDS tại [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

- 1 Xử lý tất cả các mẫu xét nghiệm máu như thể các mẫu đó được biết là có khả năng lây nhiễm Vi-rút suy giảm miễn dịch ở người (HIV), Vi-rút viêm gan B ở người (HBV) và các mầm bệnh lây qua đường m-áu khác (các biện pháp phòng ngừa chung).
- 2 Việc không tuân thủ các quy trình đã nêu có thể dẫn đến kết quả sai hoặc chất lượng mẫu giảm sút đáng kể.
- 3 Sử dụng các biện pháp phòng ngừa thường quy của phòng thí nghiệm. Không dùng pipet bằng miệng. Không ăn uống hoặc hút thuốc trong khu vực làm việc được chỉ định. Đeo găng tay và mặc áo khoác phòng thí nghiệm dùng một lần khi xử lý các mẫu xét nghiệm và thuốc thử trong bộ kit. Rửa tay kỹ càng sau khi xử lý các mẫu xét nghiệm và thuốc thử trong bộ kit.
- 4 Không sử dụng bất kỳ thành phần nào trong bộ kit khi đã quá ngày hết hạn ghi trên nhãn hộp bộ kit. Không trao đổi các thành phần trong bộ kit từ các lô bộ kit khác nhau. Lưu ý rằng các lô bộ kit được xác định trên nhãn hộp bộ kit.
- 5 Bảo quản các thành phần của bộ kit ở nhiệt độ quy định trong các khu vực tiền khuếch đại và hậu khuếch đại được chỉ định.
- 6 Tránh các chu kỳ đông lạnh-rã đông lặp đi lặp lại của thuốc thử. Tham khảo [Lưu ý về quy trình](#) để biết số lần sử dụng bộ kit.

- 7 Để tránh tình trạng suy giảm mẫu hoặc thuốc thử, hãy đảm bảo rằng tất cả hơi natri hypoclorit đã tan hoàn toàn trước khi bắt đầu quy trình.
- 8 Yêu cầu áp dụng phương pháp thực hành trong phòng thí nghiệm thích hợp và vệ sinh trong phòng thí nghiệm sạch sẽ để ngăn chặn các sản phẩm PCR làm nhiễm bẩn thuốc thử, thiết bị đo và mẫu DNA hệ gen. Tình trạng nhiễm bẩn PCR có thể khiến cho kết quả không chính xác và không đáng tin cậy.
- 9 Để tránh tình trạng nhiễm bẩn, hãy đảm bảo rằng khu vực tiền khuếch đại và hậu khuếch đại có thiết bị chuyên dụng (ví dụ: pipet, đầu pipet, máy trộn mẫu và máy ly tâm).
- 10 Tránh nhiễm bẩn chéo. Sử dụng đầu pipet mới giữa các mẫu và giữa các lần phân phối thuốc thử. Trộn mẫu bằng pipet và ly tâm khay khi được chỉ định. Không trộn khay. Việc sử dụng các đầu chống sol khí sẽ làm giảm nguy cơ tồn đọng amplicon và nhiễm bẩn chéo từ mẫu sang mẫu.
- 11 Việc ghép cặp mẫu-chỉ mục phải khớp chính xác với cách bố trí khay đã in. Local Run Manager tự động điền các mồi chỉ thị liên kết với tên mẫu khi được nhập vào mô-đun. Người dùng nên xác minh mồi chỉ thị liên kết với mẫu trước khi bắt đầu chạy giải trình tự. Bảng thông tin mẫu không khớp với cách bố trí khay sẽ dẫn đến thiếu sót trong khả năng nhận dạng mẫu dương tính và báo cáo kết quả không chính xác.
- 12 Luôn chuẩn bị ethanol 80% mới cho các bước rửa. Ethanol có thể hút nước từ không khí và ảnh hưởng đến kết quả.
- 13 Đảm bảo loại bỏ tất cả ethanol khỏi đáy giếng trong các bước rửa. Ethanol tồn dư có thể ảnh hưởng đến kết quả.
- 14 Tuân thủ thời gian làm khô theo quy định sau bước chân đế từ tính để đảm bảo bay hơi hoàn toàn. Ethanol tồn dư có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của các phản ứng tiếp theo.
- 15 Không trộn nhóm gộp oligonucleotide tùy chỉnh và Dung dịch đệm lại để bảo quản. Nếu kết hợp, nhóm gộp oligo tùy chỉnh sẽ trở nên không ổn định, ngay cả khi được bảo quản đông lạnh.
- 16 Không nên sử dụng máy luân nhiệt có chế độ làm mát chủ động (ví dụ: Peltier, làm mát bằng nhiệt điện) cho bước tạo thể lai. Bước làm mát thụ động rất quan trọng cho việc tạo thể lai đúng cách.
- 17 Luôn thêm PCR Polymerase vào Hỗn hợp tổng thể PCR ngay trước khi sử dụng. Không bao giờ bảo quản dung dịch hoạt động đã kết hợp.
- 18 Trong bước chuẩn hóa thư viện, điều tối quan trọng là phải tái hòa tan hoàn toàn viên hạt thư viện. Đây là yêu cầu cần thiết để đạt được mật độ cụm nhất quán trên tế bào dòng chảy giải trình tự.
- 19 Tuân thủ thời gian ủ được chỉ định trong bước chuẩn hóa thư viện. Việc ủ không đúng cách có thể ảnh hưởng đến lượng thư viện có mặt và mật độ cụm.
- 20 Do số lần chuyển khay và khả năng nhiễm bẩn sau đó, bạn cần hết sức cẩn thận để đảm bảo rằng các thành phần trong giếng vẫn còn đầy đủ trong giếng. Không làm bắn thành phần.

## Các từ viết tắt

**Bảng 7** Các từ viết tắt liên quan đến Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx của Illumina

Từ viết tắt	Định nghĩa
AMP	Khay khuếch đại (thư viện)
CLP	Khay tinh sạch
COP	Nhóm gộp oligonucleotide tùy chỉnh
DAL	Thư viện amplicon đã pha loãng
FPU	Bộ khay lọc
HYB	Khay tạo thể lai
LNP	Khay chuẩn hóa thư viện

Từ viết tắt	Định nghĩa
NTC	Chứng âm
PAL	Thư viện amplicon đã gộp nhóm
POS	Chứng dương
SGP	Khay bảo quản

## Lưu ý về quy trình

- Có thể sử dụng bộ kit tối đa 4 lần nếu cần xử lý ít hơn 96 thư viện. Với 4 lần sử dụng, quy trình công việc dòng mầm hỗ trợ 24 thư viện cho mỗi lần sử dụng và quy trình công việc sinh dưỡng hỗ trợ 20 thư viện cho mỗi lần sử dụng nếu làm theo các kỹ thuật sử dụng pipet được mô tả trong [Hướng dẫn sử dụng](#).
- Illumina yêu cầu phải có 1 mẫu DNA chứng dương và 1 mẫu chứng âm (NTC hay Chứng âm) trong mỗi lần sử dụng, được định nghĩa là một tập hợp các mẫu được xử lý song song. Mẫu DNA chứng dương phải là một mẫu có đặc điểm rõ ràng với sự thay đổi đã biết trong vùng quan tâm.
- Trước khi bắt đầu quy trình Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx, hãy tách chiết và định lượng DNA.
- Đối với quy trình công việc dòng mầm, định lượng DNA bằng máy quang phổ. Xác minh rằng A260/A280 của mẫu DNA lớn hơn 1,5. Chuẩn hóa mẫu DNA ở nồng độ 5 ng/μl. Mỗi mẫu cần 10 μl DNA hệ gen (tổng cộng 50 ng).
- Đầu vào đề xuất DNA 50 ng cho quy trình công việc dòng mầm cho phép thay đổi số lượng DNA; hiệu suất thư viện và hiệu suất giải trình tự sẽ dựa trên mức đầu vào này.
- Đối với quy trình công việc sinh dưỡng, định tính DNA bằng Bộ kit QC TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE của Illumina. Hiệu suất thư viện và hiệu suất giải trình tự phụ thuộc vào chất lượng mẫu được đo bằng phương pháp QC FFPE.

## Số lượng mẫu

Đối với Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx của Illumina, số lượng thư viện của một lần chạy giải trình tự có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 96 thư viện trên MiSeqDx và 8 đến 96 thư viện trên NextSeq 550Dx. Quy trình công việc sinh dưỡng yêu cầu 2 thư viện cho mỗi mẫu.

Các môi chỉ thị được sử dụng trong quá trình khuếch đại PCR phải được chọn dựa trên số lượng mẫu cuối cùng mong muốn để đảm bảo mỗi thư viện sử dụng một tổ hợp chỉ thị duy nhất.

## Trình tự môi chỉ thị

**Bảng 8** Trình tự của môi chỉ thị A (A501) – H (A508)

Môi chỉ thị	Trình tự
Môi chỉ thị A (A501)	TGAACCTT
Môi chỉ thị B (A502)	TGCTAAGT
Môi chỉ thị C (A503)	TGTTCTCT
Môi chỉ thị D (A504)	TAAGACAC
Môi chỉ thị E (A505)	CTAATCGA
Môi chỉ thị F (A506)	CTAGAACA
Môi chỉ thị G (A507)	TAAGTTCC
Môi chỉ thị H (A508)	TAGACCTA

**LƯU Ý**

Trên NextSeq™ 550Dx, các mồi chỉ thị A501-A508 được đọc theo trình tự bổ sung đảo ngược. Nên sử dụng các trình tự bổ sung đảo ngược khi xem xét các yêu cầu về tính đa dạng của chỉ thị đối với phương pháp hóa học giải trình tự hai kênh.

**Bảng 9** Trình tự của mồi chỉ thị 1 (A701) – 12 (A712)

Mồi chỉ thị	Trình tự
Mồi chỉ thị 1 (A701)	ATCACGAC
Mồi chỉ thị 2 (A702)	ACAGTGGT
Mồi chỉ thị 3 (A703)	CAGATCCA
Mồi chỉ thị 4 (A704)	ACAAACGG
Mồi chỉ thị 5 (A705)	ACCCAGCA
Mồi chỉ thị 6 (A706)	AACCCCTC
Mồi chỉ thị 7 (A707)	CCCAACCT
Mồi chỉ thị 8 (A708)	CACCACAC
Mồi chỉ thị 9 (A709)	GAAACCCA
Mồi chỉ thị 10 (A710)	TGTGACCA
Mồi chỉ thị 11 (A711)	AGGGTCAA
Mồi chỉ thị 12 (A712)	AGGAGTGG

## Hướng dẫn sử dụng

### Cách bố trí mẫu

Trước khi chuẩn bị thư viện, một lần chạy giải trình tự được tạo bằng Local Run Manager, phần mềm trên thiết bị giải trình tự. Làn chạy được điền mẫu và tệp kê khai được chọn. Cách bố trí mẫu kết quả được in hoặc xuất thành tệp để sử dụng làm tài liệu tham khảo khi chuẩn bị thư viện từ các mẫu. Để biết hướng dẫn chi tiết, hãy tham khảo hướng dẫn tham khảo dành riêng cho mô-đun tương ứng với quy trình công việc và thiết bị giải trình tự dự kiến. Bạn có thể tự nhập mẫu hoặc nhập theo hướng dẫn tham khảo.

### Hướng dẫn về quy trình công việc dòng mầm so với sinh dưỡng

Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx giúp bạn tự chuẩn bị các thư viện để giải trình tự DNA từ các mẫu xét nghiệm máu toàn phần ngoại vi và mô đã cố định bằng formalin và nhúng parafin (FFPE). Nhờ sử dụng thuốc thử được cung cấp trong Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx, DNA hệ gen được xử lý thông qua các bước chuẩn bị thư viện, đặc biệt khuếch đại các vùng hệ gen dự kiến của mỗi mẫu bằng các oligonucleotide cụ thể theo chất phân tích, đồng thời bổ sung các chỉ thị và trình tự thu thập tế bào dòng chảy vào sản phẩm đã khuếch đại. DNA từ máu toàn phần tuân theo quy trình công việc dòng mầm, trong khi DNA từ mô FFPE tuân theo quy trình công việc sinh dưỡng.

Các thư viện mẫu kết quả sẵn sàng cho quá trình giải trình tự trên máy phân tích trình tự DNA số lượng lớn của Illumina và phân tích bằng các mô-đun phần mềm của thiết bị (dòng mầm hoặc sinh dưỡng) tương ứng với quy trình công việc.

**LƯU Ý**

Trong [Hướng dẫn sử dụng](#), những điểm khác biệt trong hướng dẫn chạy quy trình công việc dòng mầm và sinh dưỡng sẽ được chỉ ra trong bước này. Những điểm khác biệt này được tóm tắt ở [Bảng 10](#).

**Bảng 10** Những điểm khác biệt giữa quy trình công việc phân tích biến thể dòng mầm và sinh dưỡng

Bước	Thông số	Quy trình công việc dòng mầm	Quy trình công việc sinh dưỡng
Tiền phân tích	Loại mẫu	DNA từ máu toàn phần	DNA từ mô FFPE
Tiền phân tích	Đầu vào DNA	50 ng	Dựa trên $\Delta Cq$
Tiền phân tích	Phương pháp QC mẫu	A260	TSCA Dx - FFPE QC
Tạo thể lai nhóm gộp oligonucleotide	Phương pháp tạo thể lai	Sợi đơn	Sợi kép
Tạo thể lai nhóm gộp oligonucleotide	Số nhóm gộp oligonucleotide	1	2
Khuếch đại bằng PCR	Thể tích môi chỉ thị	4 $\mu$ l	9 $\mu$ l
Khuếch đại bằng PCR	Thể tích phản ứng PCR chỉ thị[HM4]	50 $\mu$ l	60 $\mu$ l
Khuếch đại bằng PCR	Số chu kỳ PCR	28	32
Xác minh việc chuẩn bị thư viện	Hiệu suất thư viện	Đánh giá không bắt buộc bằng gel (sản phẩm CLP)	Đánh giá bằng gel (sản phẩm AMP)
Tinh sạch PCR	Thể tích hạt tinh sạch PCR	45 $\mu$ l	55 $\mu$ l

### Tạo thể lai nhóm gộp oligonucleotide (Tiền khuếch đại)

#### Chuẩn bị

- 1 Điều chỉnh (các) nhóm gộp oligonucleotide cụ thể theo chất phân tích, Dung dịch đệm lai, mẫu DNA hệ gen và mẫu chứng dương về nhiệt độ phòng.
- 2 Trộn xoáy mạnh (các) nhóm gộp oligo tùy chỉnh và Dung dịch đệm lai để đảm bảo rằng tất cả các chất kết tủa hòa tan hoàn toàn, sau đó ly tâm nhanh các ống nhóm gộp oligonucleotide để thu thập chất lỏng. Đảm bảo không nhìn thấy chất kết tủa trong Dung dịch đệm lai.
- 3 Đặt khối ủ nhiệt 96 giếng ở 95°C.
- 4 Làm nóng sẵn máy ủ ở 37°C.
- 5 Tạo khay mẫu theo cách bố trí khay được in từ Local Run Manager.

#### Quy trình

- 1 Bố trí khay PCR 96 giếng mới (sau đây gọi là khay **HYB**).
- 2 Chọn một trong các quy trình công việc sau (dòng mầm hoặc sinh dưỡng) dựa trên các loại biến thể bạn đang nhắm mục tiêu.
  - **Quy trình công việc dòng mầm:**
    - Thêm 10  $\mu$ l mẫu hoặc chất kiểm chuẩn ở nồng độ 5 ng/ $\mu$ l (tổng cộng 50 ng) vào các giếng thích hợp trong khay **HYB** theo cách bố trí khay.
  - **Quy trình công việc sinh dưỡng:**
    - Thêm 10  $\mu$ l mẫu hoặc chất kiểm chuẩn đã pha loãng theo Bộ kit QC TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE. Các mẫu hoặc chất kiểm chuẩn được thêm vào hai giếng trong khay để tạo thể lai cho cả hai nhóm gộp oligonucleotide theo cách bố trí khay.
- 3 Chọn một trong các quy trình công việc sau (dòng mầm hoặc sinh dưỡng) dựa trên các loại biến thể bạn đang nhắm mục tiêu.
  - **Quy trình công việc dòng mầm:**

- Thêm 10 µl Dung dịch đệm TE 1X vào giếng chứng âm (NTC). Làm theo cách bố trí khay đã tạo để lựa chọn giếng chính xác.
- **Quy trình công việc sinh dưỡng:**
  - Thêm 10 µl Dung dịch đệm TE 1X vào giếng chứng âm (NTC) (2). Làm theo cách bố trí khay đã tạo để lựa chọn giếng chính xác.
- 4 Chọn một trong các quy trình công việc sau (dòng mầm hoặc sinh dưỡng) dựa trên các loại biến thể bạn đang nhắm mục tiêu.
  - **Quy trình công việc dòng mầm:**
    - Thêm 5 µl nhóm gộp oligonucleotide tùy chỉnh vào tất cả các giếng chứa DNA hệ gen và NTC theo cách bố trí khay.
  - **Quy trình công việc sinh dưỡng:**
    - Thêm 5 µl nhóm gộp oligonucleotide tùy chỉnh A vào các giếng chứa DNA hệ gen và NTC theo cách bố trí khay.
    - Thêm 5 µl nhóm gộp oligonucleotide tùy chỉnh B vào các giếng chứa DNA hệ gen và NTC theo cách bố trí khay.

Các giếng nhận từng nhóm gộp loại trừ lẫn nhau.
- 5 Thêm 40 µl Dung dịch đệm lai vào từng mẫu và NTC trong khay **HYB**. Dùng pipet hút nhẹ lên và xuống 3–5 lần để trộn đều.
- 6 Dán kín khay **HYB** và ly tâm ở mức 1000 × g ở 20° C trong 1 phút.



#### THẬN TRỌNG

Để hạn chế sự bay hơi có thể xảy ra trong quá trình phản ứng tạo thể lai, bạn nên sử dụng máy dán nhiệt để dán kín khay **HYB** khi tạo thể lai qua đêm. Nếu không có máy dán nhiệt, hãy bịt kín khay **HYB** bằng màng nhôm kết dính và cố định kỹ càng bằng con lăn hoặc miếng chèn dán kín và tiến hành bước tiếp theo khi nhiệt độ đạt 40°C.

- 7 Đặt khay **HYB** vào khối ủ nhiệt 96 giếng được làm nóng sẵn ở 95°C, đóng nắp và ủ trong 1 phút.
- 8 Giảm thông số cài đặt khối ủ nhiệt xuống 40°C và tiếp tục ủ cho đến khi khối ủ nhiệt đạt 40°C (khoảng 80 phút).  
Việc làm mát dần dần rất quan trọng trong quá trình tạo thể lai thích hợp. Do đó, không nên dùng các máy luân nhiệt PCR có công nghệ làm mát chủ động (ví dụ: Peltier, làm mát bằng nhiệt điện) cho quá trình này.



#### ĐIỂM DỪNG AN TOÀN

Sau khi khối ủ nhiệt đạt 40°C, khay **HYB** sẽ duy trì ổn định ở 40°C lên tới 18 giờ.

Trước khi lấy khay ra khỏi khối ủ nhiệt, hãy gia cố màng nhôm bằng con lăn hoặc miếng chèn dán kín.

### Loại bỏ oligonucleotide không gắn kết

#### Chuẩn bị

- 1 Điều chỉnh Hỗn hợp mở rộng-buộc thắt, Dung dịch đệm rửa mạnh và Dung dịch đệm rửa đa năng về nhiệt độ phòng, rồi trộn xoáy nhanh.
- 2 Lắp ráp bộ phận khay lọc (sau đây gọi là **FPU**) theo thứ tự từ trên xuống dưới: nắp, khay lọc, vòng adapter và khay **MIDI**.
- 3 Rửa sơ màng khay lọc như sau:
  - a Thêm 50 µl Dung dịch đệm rửa mạnh vào mỗi mẫu và giếng NTC.
  - b Đậy nắp lên khay lọc và ly tâm ở mức 2400 × g ở 20°C trong 5 phút.



#### LƯU Ý

Kiểm tra để xác minh rằng tất cả các giếng của khay lọc đã ráo nước hoàn toàn. Nếu dung dịch đệm rửa chưa ráo hết, hãy ly tâm lại ở mức 2400 × g ở 20°C cho đến khi toàn bộ chất lỏng chảy hết (5–10 phút nữa).



#### THẬN TRỌNG

Cần kiểm soát nhiệt độ ly tâm trong các bước rửa. Nếu nhiệt độ đạt từ 25°C trở lên, nhiệt độ cao hơn có thể dẫn đến độ gắn kết mồi mạnh hơn. Trong các trường hợp hiếm gặp, nếu các mẫu có SNV trong các vùng gắn kết mồi, mức độ mạnh hơn có thể dẫn đến hiện tượng mất alen.

## Quy trình

- 1 Lấy khay **HYB** ra khỏi khối ủ nhiệt và ly tâm ở mức 1000 × g ở 20°C trong 1 phút.
- 2 Chuyển toàn bộ thể tích (khoảng 55 µl) của mỗi mẫu vào các giếng tương ứng của khay lọc.
- 3 Đậy nắp lên khay lọc và ly tâm ở mức 2400 × g ở 20°C trong 5 phút.
- 4 Rửa khay lọc như sau:
  - a Thêm 50 µl Dung dịch đệm rửa mạnh vào mỗi mẫu và giếng NTC.
  - b Đậy nắp lên khay lọc và ly tâm ở mức 2400 × g ở 20°C trong 5 phút.



## LƯU Ý

Kiểm tra để xác minh rằng tất cả các giếng của khay lọc đã ráo nước hoàn toàn. Nếu dung dịch đệm rửa chưa ráo hết, hãy ly tâm lại ở mức 2400 × g ở 20°C cho đến khi toàn bộ chất lỏng chảy hết (5–10 phút nữa).

- 5 Lặp lại quy trình rửa như được mô tả trong bước trước.
- 6 Loại bỏ tất cả dòng chảy qua (chứa formamide), rồi lắp ráp lại **FPU**.
- 7 Thêm 45 µl Dung dịch đệm rửa đa năng vào mỗi mẫu và giếng NTC của **FPU**.
- 8 Đậy nắp lên khay lọc và ly tâm ở mức 2400 × g ở 20°C trong 5 phút.



## LƯU Ý

Kiểm tra để xác minh rằng tất cả các giếng của khay lọc đã ráo nước hoàn toàn. Nếu dung dịch đệm rửa chưa ráo hết, hãy ly tâm lại ở mức 2400 × g ở 20°C cho đến khi toàn bộ chất lỏng chảy hết (5–10 phút nữa).

## Mở rộng-buộc thắt oligonucleotide gắn kết

## Quy trình

- 1 Thêm 45 µl Hỗn hợp mở rộng-buộc thắt vào mỗi mẫu và giếng NTC của khay lọc.
- 2 Dán kín khay lọc bằng màng nhôm kết dính, rồi đậy nắp.
- 3 Ủ **FPU** trong lò ủ 37°C đã làm nóng sẵn trong 45 phút mà không quay.
- 4 Trong khi ủ **FPU**, chuẩn bị **AMP** (Khay khuếch đại) như được mô tả trong phần sau.

## Khuếch đại bằng PCR

## Chuẩn bị

- 1 Chuẩn bị dung dịch NaOH 0,05 N mới.
- 2 Xác định các mồi chỉ thị sẽ được sử dụng theo cách bố trí khay được in từ Local Run Manager.
- 3 Điều chỉnh Hỗn hợp tổng thể PCR và các mồi chỉ thị thích hợp về nhiệt độ phòng. Trộn xoáy từng ống đã rửa đồng để trộn đều, rồi ly tâm nhanh các ống để thu thập chất lỏng.
- 4 Bố trí khay PCR 96 giếng mới (sau đây gọi là khay **AMP**).
- 5 Thêm các mồi chỉ thị vào khay **AMP** dựa trên quy trình công việc:
  - **Quy trình công việc dòng mầm:**
    - Thêm 4 µl mồi chỉ thị đã chọn [A (A501) – H (A508)] vào giếng thích hợp trong một cột của khay **AMP**.
    - Loại bỏ nắp trắng ban đầu và dùng nắp trắng mới.
    - Thêm 4 µl mồi chỉ thị đã chọn [1 (A701) – 12 (A712)] vào hàng thích hợp trong khay **AMP**. **Phải thay đầu pipet sau mỗi hàng để tránh nhiễm bẩn chéo chỉ thị.**
    - Loại bỏ nắp cam ban đầu và dùng nắp cam mới.
  - **Quy trình công việc sinh dưỡng:**
    - Thêm 9 µl mồi chỉ thị đã chọn [A (A501) – H (A508)] vào giếng thích hợp trong một cột của khay **AMP**.
    - Loại bỏ nắp trắng ban đầu và dùng nắp trắng mới.
    - Thêm 9 µl mồi chỉ thị đã chọn [1 (A701) – 12 (A712)] vào hàng thích hợp trong khay **AMP**. **Phải thay đầu pipet sau mỗi hàng để tránh nhiễm bẩn chéo chỉ thị.**
    - Loại bỏ nắp cam ban đầu và dùng nắp cam mới.
- 6 Chuẩn bị dung dịch hoạt động Hỗn hợp tổng thể PCR/PCR Polymerase như sau:

- a Đối với 96 thư viện, thêm 56 µl PCR Polymerase vào 2,8 ml Hỗn hợp tổng thể PCR. Tỷ lệ Hỗn hợp tổng thể PCR trộn với PCR Polymerase đã bao gồm thể tích hao hụt.
- b Lật ngược 20 lần dung dịch PCR hoạt động đã chuẩn bị để trộn đều.
- c Dung dịch PCR hoạt động ổn định ở nhiệt độ phòng trong 10 phút.

#### Quy trình

- 1 Lấy **FPU** ra khỏi máy ủ.
- 2 Gỡ màng bọc nhôm. Đậy nắp lên khay lọc và ly tâm ở mức 2400 × g ở 20°C trong 2 phút.
- 3 Thêm 25 µl NaOH 0,05 N vào mỗi mẫu và giếng NTC trên khay lọc. Dùng pipet hút NaOH lên và xuống 5–6 lần.
- 4 Đậy và ủ khay lọc ở nhiệt độ phòng trong 5 phút để rửa giải các thư viện.
- 5 Trong khi ủ khay lọc, chuyển 22 µl dung dịch PCR hoạt động vào mỗi giếng của khay **AMP** chứa mỗi chỉ thị.
- 6 Chuyển các mẫu đã rửa giải từ khay lọc sang khay **AMP** như sau:
  - a Cẩn thận sao cho không chọc thủng màng lọc, nhẹ nhàng hút mẫu lên và xuống 5–6 lần bằng pipet P20 đặt ở 20 µl.
  - b Chuyển 20 µl từ khay lọc sang các giếng tương ứng của khay **AMP**.
  - c Dùng pipet nhẹ nhàng hút lên và xuống 5–6 lần để trộn kỹ DNA với dung dịch PCR hoạt động.
  - d Chuyển các giếng phản ứng còn lại từ khay lọc sang khay **AMP** theo cách tương tự. **Phải thay đầu pipet sau mỗi lần chuyển để tránh nhiễm bẩn chéo chỉ thị và mẫu.**
- 7 Dán kín khay **AMP** và cố định bằng con lăn hoặc miếng chèn.
- 8 Ly tâm ở mức 1000 × g ở 20°C trong 1 phút.
- 9 Chuyển khay **AMP** sang khu vực hậu khuếch đại.
- 10 Thực hiện PCR dựa trên quy trình công việc của bạn bằng cách sử dụng chương trình máy luân nhiệt sau đây trong khi đậy nắp đã gia nhiệt:
  - **Quy trình công việc dòng mầm:**
    - 95°C trong 3 phút
    - Sau đó là 28 chu kỳ:
      - 95°C trong 30 giây
      - 66°C trong 30 giây
      - 72°C trong 60 giây
    - 72°C trong 5 phút
    - Duy trì ở 10°C
  - **Quy trình công việc sinh dưỡng:**
    - 95°C trong 3 phút
    - Sau đó là 32 chu kỳ:
      - 95°C trong 30 giây
      - 66°C trong 30 giây
      - 72°C trong 60 giây
    - 72°C trong 5 phút
    - Duy trì ở 10°C



#### ĐIỂM DỪNG AN TOÀN

Nếu không chuyển ngay sang Tinh sạch PCR, khay **AMP** có thể lưu lại trên máy luân nhiệt qua đêm, được bảo quản ở 2°C đến 8°C trong tối đa 48 giờ, hoặc được bảo quản ở -25°C đến -15°C trong tối đa 1 tuần.

### Xác minh việc chuẩn bị thư viện

#### Quy trình

Xác minh việc chuẩn bị thư viện bằng các bước sau.

#### **Quy trình công việc dòng mầm:**

Không có hoạt động xác minh việc chuẩn bị thư viện trong quy trình công việc dòng mầm.



**Quy trình công việc sinh dưỡng:**

- 1 Kết hợp 5 µl sản phẩm đã khuếch đại với 15 µl nước và thuốc nhuộm nạp DNA, nếu cần.
- 2 Chạy trên gel TBE agarose 2-4% với thang 50-100 bp để xác nhận sự xuất hiện và độ sáng của sản phẩm thư viện (kích cỡ sản phẩm phụ thuộc vào bảng).
  - Các mẫu cho thấy sự khuếch đại trong một Nhóm gộp oligo hoặc cả hai Nhóm gộp oligo được coi là hợp lệ và có thể được xử lý trong quy trình công việc còn lại.
  - Các mẫu cho thấy gần như không có sự khuếch đại trong một Nhóm gộp oligo hoặc cả hai Nhóm gộp oligo được coi là không hợp lệ và không nên xử lý trong quy trình công việc còn lại.
  - Nếu quan sát thấy kết quả gel không hợp lệ, bạn cần lập lại việc chuẩn bị thư viện cho mẫu đó hoặc các mẫu từ bước *Tạo thể lai nhóm gộp oligonucleotide (Tiền khuếch đại)*.
  - Nếu không quan sát thấy các dải băng trên gel trong lần chạy lặp lại, hãy kiểm tra chất lượng mẫu hoặc thiết kế bảng oligo.
  - Nếu mẫu NTC trống cho thấy sự khuếch đại trong Nhóm gộp oligo A và/hoặc B, điều này cho thấy hiện tượng nhiễm bẩn.

## Tinh sạch PCR

## Chuẩn bị

- 1 Điều chỉnh Hạt tinh sạch PCR về nhiệt độ phòng.
- 2 Chuẩn bị ethanol 80% mới từ ethanol tuyệt đối.

## Quy trình

- 1 Ly tâm khay **AMP** ở mức 1000 × g ở 20°C trong 1 phút.
- 2 Bố trí khay MIDI mới (sau đây gọi là khay **CLP**).
- 3 Lật ngược Hạt tinh sạch PCR 10 lần. Trộn xoáy mạnh rồi lật ngược 10 lần nữa. Kiểm tra dung dịch bằng mắt thường để đảm bảo các hạt được tái hòa tan.

**LƯU Ý**

Hạt tinh sạch PCR rất nhớt nên cần đặc biệt cẩn thận khi sử dụng pipet. Để tránh mất quá nhiều thuốc thử, hãy từ từ hút và nhả thể tích hạt, rồi kiểm tra bằng mắt thường để đảm bảo tất cả các hạt đã được nhả ra khỏi đầu pipet trước khi đẩy đầu ra. Hút thể tích thích hợp rồi nhả mà không cần trộn bằng pipet hoặc làm ướt sẵn đầu pipet.

- 4 Thêm Hạt tinh sạch PCR vào khay **CLP** theo các bước sau, tùy thuộc vào quy trình công việc:
  - **Quy trình công việc dòng mầm:**
    - Thêm từ từ 45 µl Hạt tinh sạch PCR vào mỗi giếng của khay **CLP**.
    - Chuyển toàn bộ sản phẩm PCR từ khay **AMP** sang khay **CLP** (khoảng 50 µl).
  - **Quy trình công việc sinh dưỡng:**
    - Thêm từ từ 55 µl Hạt tinh sạch PCR vào mỗi giếng của khay **CLP**.
    - Chuyển toàn bộ sản phẩm PCR từ khay **AMP** sang khay **CLP** (khoảng 60 µl).
- 5 Dán kín khay **CLP** và lắc trên máy lắc khay vi thể với tốc độ 1800 vòng/phút trong 2 phút.
- 6 Ủ ở nhiệt độ phòng mà không lắc trong 10 phút.
- 7 Đặt khay lên chân đế từ tính trong ít nhất 2 phút hoặc đến khi dịch nổi trở nên trong suốt.
- 8 Trong khi khay **CLP** nằm trên chân đế từ tính, hãy lấy ra và loại bỏ dịch nổi một cách cẩn thận.
- 9 Trong khi khay **CLP** nằm trên chân đế từ tính, hãy rửa hạt như sau:
  - a Thêm 200 µl ethanol 80% mới chuẩn bị vào mỗi giếng mẫu.
  - b Ủ khay trên chân đế từ tính trong ít nhất 30 phút hoặc đến khi dịch nổi trở nên trong suốt.
  - c Lấy ra và loại bỏ dịch nổi một cách cẩn thận.
- 10 Lặp lại quy trình rửa như được mô tả trong bước trước.
- 11 Sử dụng pipet đa kênh P20 đặt ở 20 µl để loại bỏ ethanol dư thừa.
- 12 Lấy khay **CLP** ra khỏi chân đế từ tính và hong khô các hạt trong 5 phút.
- 13 Thêm 30 µl Dung dịch đệm rửa giải vào các hạt một cách cẩn thận rồi trộn xoáy nhanh.



#### LƯU Ý

Dung dịch đệm rửa giải rất nhớt nên cần hút và nhà thể tích từ từ.

- 14 Dán kín khay **CLP** bằng màng Microseal 'B' và con lăn hoặc miếng chèn, rồi lắc trên máy lắc khay vi thể ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 5 phút. Sau khi lắc, kiểm tra xem các mẫu đã được tái hòa tan chưa. Nếu vẫn nhìn thấy viên hạt trong một số giếng, hãy sử dụng pipet P200 đặt ở 30 µl để tái hòa tan từng viên hạt riêng lẻ. Kiểm tra các đầu pipet bằng mắt thường để thấy các hạt được nhà lại vào giếng trước khi đẩy đầu ra. Dán kín lại khay **CLP** và lắc trên máy lắc khay vi thể ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 5 phút nữa.
- 15 Ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút.
- 16 Đặt khay **CLP** lên chân đế từ tính trong ít nhất 2 phút hoặc đến khi dịch nổi trở nên trong suốt.
- 17 Bố trí khay MIDI mới (sau đây gọi là khay **LNP**).
- 18 Chuyển 20 µl dịch nổi từ khay **CLP** sang khay **LNP**.
- 19 Chuyển 20 µl dịch nổi từ khay **CLP** sang khay **LNP** một cách cẩn thận.
- 20 Dán kín khay **LNP** bằng màng dán khay kết dính, rồi ly tâm ở mức 1000 × g ở 20°C trong 1 phút để đảm bảo toàn bộ dịch nổi chìm xuống đáy giếng.
- 21 [Không bắt buộc] Chuyển 10 µl dịch nổi còn lại từ khay **CLP** sang khay mới và dán nhãn có tên lần chạy và ngày thực hiện lên khay. Bảo quản khay này ở nhiệt độ -25°C đến -15°C cho đến khi hoàn thành quá trình chạy giải trình tự và phân tích dữ liệu.  
Có thể dùng các sản phẩm PCR đã tinh sạch để khắc phục sự cố trong trường hợp mẫu không đạt.



#### ĐIỂM DỪNG AN TOÀN

Nếu dừng tại điểm này, hãy dán kín khay **LNP** và ly tâm ở mức 1000 × g ở 20°C trong 1 phút. Khay ổn định trong tối đa 3 giờ ở nhiệt độ 2°C đến 8°C hoặc trong tối đa một tuần ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C.

## Chuẩn hóa thư viện

### Chuẩn bị

- 1 Chuẩn bị dung dịch NaOH 0,1 N mới.
- 2 Điều chỉnh Chất pha loãng chuẩn hóa thư viện, Hạt thư viện, Nước rửa chuẩn hóa thư viện về nhiệt độ phòng.
- 3 Lấy Dung dịch đệm bảo quản thư viện khỏi khu vực lưu trữ ở nhiệt độ phòng và đặt sang một bên.
- 4 Trộn xoáy mạnh Chất pha loãng chuẩn hóa thư viện và đảm bảo tất cả kết tủa đã hòa tan.
- 5 Trộn xoáy mạnh Hạt thư viện trong 1 phút xen kẽ lật ngược cho đến khi các hạt được tái hòa tan và không có viên nào ở đáy ống khi lật ngược ống.

### Quy trình

- 1 Trộn Chất pha loãng chuẩn hóa thư viện và Hạt thư viện trong một ống hình nón 15 ml mới (sử dụng ống 1,5 ml mới nếu xử lý dưới 24 mẫu) như sau:
  - a Đối với 96 mẫu, thêm 4,4 ml Chất pha loãng chuẩn hóa thư viện.
  - b Tái hòa tan Hạt thư viện: Trộn xoáy mạnh Hạt thư viện trong 1 phút có xen kẽ lật ngược. Sử dụng pipet P1000 đặt ở mức 1000 µl để tái hòa tan hoàn toàn Hạt thư viện bằng cách dùng pipet hút lên và xuống từ từ ít nhất 10 lần cho đến khi không còn viên nào ở đáy ống khi lật ngược ống.



#### THẬN TRỌNG

Cần tái hòa tan hoàn toàn viên hạt thư viện ở đáy ống. Việc sử dụng pipet P1000 sẽ đảm bảo các hạt được tái hòa tan đồng đều và không có hạt tụ ở đáy ống. Cần tái hòa tan hạt để đạt được mật độ cụm nhất quán trên tế bào dòng chảy.



#### THẬN TRỌNG

Hạt thư viện rất nhớt nên cần đặc biệt cẩn thận khi sử dụng pipet. Để tránh mất quá nhiều thuốc thử, hãy từ từ hút và nhà thể tích hạt, rồi kiểm tra bằng mắt thường để đảm bảo tất cả các hạt đã được nhà ra khỏi đầu pipet trước khi đẩy đầu ra.

- c Đối với 96 thư viện, dùng pipet hút 800 µl Hạt thư viện vào ống chứa Chất pha loãng chuẩn hóa thư viện. Nếu có ít thư viện hơn, tỷ lệ sẽ là 7,2 µl Hạt thư viện so với 37,8 µl Chất pha loãng chuẩn hóa thư viện cho mỗi thư viện. Tính cả thể tích hao hụt do lỗi khi dùng pipet.

- d Lật ngược ống 15–20 lần để trộn đều.
- 2 Thêm 45 µl dung dịch hoạt động Chất pha loãng chuẩn hóa thư viện/Hạt thư viện kết hợp vào mỗi giếng của khay **LNP** chứa thư viện.
- 3 Dán kín khay **LNP** bằng màng Microseal 'B' và con lăn hoặc miếng chèn, rồi lắc trên máy lắc khay vi thể ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 30 phút.

**LƯU Ý**

Nếu giải trình tự trong cùng ngày thì lúc này bạn nên bắt đầu rã đông hộp thuốc thử. Làm theo hướng dẫn để rã đông hộp thuốc thử trong tờ hướng dẫn sử dụng thiết bị hiện hành.

- 4 Đặt khay lên chân đế từ tính trong ít nhất 2 phút hoặc đến khi dịch nổi trở nên trong suốt.
- 5 Trong khi khay **LNP** nằm trên chân đế từ tính, hãy gỡ màng dán, rồi lấy ra và loại bỏ dịch nổi một cách cẩn thận.
- 6 Gỡ khay **LNP** khỏi chân đế từ tính và rửa các hạt bằng Nước rửa chuẩn hóa thư viện như sau:
  - a Thêm 45 µl Nước rửa chuẩn hóa thư viện vào hạt trong khay **LNP**.
  - b Dán kín khay **LNP** bằng màng Microseal 'B' và con lăn hoặc miếng chèn, rồi lắc trên máy lắc khay vi thể ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 5 phút.
  - c Đặt khay **LNP** lên chân đế từ tính trong ít nhất 2 phút hoặc đến khi dịch nổi trở nên trong suốt.
  - d Lấy ra và loại bỏ toàn bộ dịch nổi.
- 7 Lặp lại quy trình Rửa chuẩn hóa thư viện như được mô tả trong bước trước.
- 8 Dán kín khay **LNP** bằng màng dán khay kết dính.
- 9 Ly tâm khay **LNP** ở  $1000 \times g$  ở  $20^\circ\text{C}$  trong 30 giây để thu thập dung dịch đệm rửa còn sót lại.
- 10 Đặt khay **LNP** lên chân đế từ tính trong 2 phút.
- 11 Sử dụng pipet đa kênh P20 đặt ở 20 µl để loại bỏ cẩn thận Nước rửa chuẩn hóa thư viện dư thừa. Tránh làm ảnh hưởng đến hạt.
- 12 Lấy khay **LNP** ra khỏi chân đế từ tính và thêm vào mỗi giếng 30 µl NaOH 0,1 N.
- 13 Dán kín khay **LNP** bằng màng Microseal 'B' và con lăn hoặc miếng chèn, rồi lắc trên máy lắc khay vi thể ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 5 phút.
- 14 Trong 5 phút rửa giải, bố trí khay PCR 96 giếng mới (sau đây gọi là khay **SGP**).
- 15 Thêm 30 µl Dung dịch đệm bảo quản thư viện vào mỗi giếng sẽ được sử dụng trong khay **SGP**.
- 16 Sau 5 phút rửa giải, đảm bảo tất cả hạt trong khay **LNP** được tái hòa tan. Nếu các hạt chưa được tái hòa tan hoàn toàn, hãy dùng pipet nhẹ nhàng hút các giếng đó lên và xuống hoặc gõ nhẹ vào khay trên bàn để tái hòa tan các hạt, sau đó lắc thêm 5 phút.
- 17 Đặt khay **LNP** lên chân đế từ tính trong ít nhất 2 phút.
- 18 Từ từ chuyển dịch nổi (khoảng 30 µl) từ khay **LNP** sang khay **SGP**. Dùng pipet hút nhẹ lên và xuống 5 lần để trộn đều. Dùng đầu pipet mới trong mỗi lần chuyển.
- 19 Dán kín khay **SGP** và ly tâm ở mức  $1000 \times g$  ở  $20^\circ\text{C}$  trong 1 phút. Lập tức chuyển sang *Gộp nhóm thư viện*. Loại bỏ khay **LNP**.

## Chuẩn bị giải trình tự thư viện

### Chuẩn bị

- 1 Đặt khối ủ nhiệt phù hợp với ống ly tâm 1,5 ml ở  $96^\circ\text{C}$ .
- 2 Chuẩn bị bồn nước đá trong xô đá.
- 3 Lấy Dung dịch đệm pha loãng thư viện và Chứng nội PhiX từ khu vực bảo quản  $-25^\circ\text{C}$  đến  $-15^\circ\text{C}$  và rã đông.
- 4 Sau khi rã đông, hãy làm lạnh Dung dịch đệm pha loãng thư viện và Chứng nội PhiX trong bồn nước đá.
- 5 Trộn xoáy Dung dịch đệm pha loãng thư viện, ly tâm nhanh và đảm bảo rằng tất cả các chất kết tủa hòa tan hoàn toàn.

### Biến tính và pha loãng Chứng nội PhiX

Chứng nội PhiX được cung cấp ở 10 nM và phải được biến tính thành DNA sợi đơn và pha loãng thành 20 pM trước khi sử dụng. Các hướng dẫn sau cung cấp 1 ml Chứng nội PhiX 20 pM biến tính, đủ cho một số DAL (> 20).

- 1 Chuẩn bị NaOH 0,1N.

2 Đảo ngược ống nhiều lần để trộn đều.



**THẬN TRỌNG**

Cần sử dụng NaOH mới pha loãng để làm biến tính mẫu hoàn toàn cho quá trình tạo cụm trên thiết bị giải trình tự.



**MEO**

Nếu PhiX được chuẩn bị vào cùng ngày với quá trình Chuẩn hóa thư viện thì có thể sử dụng cùng một lượng NaOH 0,1N.

3 Kết hợp các thể tích sau để pha loãng thư viện Chứng nội PhiX thành 2 nM:

- 2 µl thư viện Chứng nội PhiX 10 nM
- 8 µl Dung dịch đệm TE 1X

4 Kết hợp các thể tích sau để có thư viện Chứng nội PhiX 1 nM:

- 10 µl thư viện Chứng nội PhiX 2 nM
- 10 µl NaOH 0,1 N

5 Trộn xoáy nhanh để trộn đều dung dịch thư viện Chứng nội PhiX 1 nM.

6 Ly tâm nhanh dung dịch thư viện Chứng nội PhiX 1 nM để thu thập thành phần.

7 Ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng để biến tính dung dịch thư viện Chứng nội PhiX thành các sợi DNA đơn.

8 Thêm 980 µl Dung dịch đệm pha loãng thư viện đã làm lạnh sẵn vào ống chứa thư viện Chứng nội PhiX đã biến tính. Nồng độ cuối cùng là thư viện Chứng nội PhiX 20 pM đã biến tính.



**MEO**

Có thể bảo quản thư viện Chứng nội PhiX 20 pM đã biến tính lên đến 3 tuần ở nhiệt độ -25°C đến -15°C dưới dạng các mẫu chia nhỏ dùng một lần.

### Gộp nhóm thư viện

1 Trộn xoáy Dung dịch đệm pha loãng thư viện và đảm bảo rằng tất cả các chất kết tủa hòa tan hoàn toàn.

2 Ly tâm nhanh để thu thập thành phần.

3 Bố trí một ống nắp vặn mới (sau đây gọi là ống **PAL** [Thư viện amplicon gộp nhóm]).

4 Xác định các mẫu cần gộp nhóm để giải trình tự. Có thể gộp nhóm tối đa 96 thư viện để giải trình tự.

5 Gỡ màng dán khỏi khay **SGP**. Chuyển 10 µl của mỗi thư viện cần giải trình tự từ khay **SGP** sang chuỗi PCR 8-ống, thay đầu mỗi lần sử dụng.

6 Dán kín lại khay **SGP** bằng màng dán khay kết dính và bảo quản ở nhiệt độ -25°C đến -15°C trong tối đa 48 giờ.



**MEO**

Có thể dùng khay **SGP** để gộp nhóm ít mẫu hơn khi phạm vi giải trình tự ban đầu không đủ.

7 Kết hợp và chuyển thành phần trong chuỗi PCR 8-ống sang ống **PAL**. Trộn ống **PAL** kỹ càng.

8 Bố trí 3 ống nắp vặn mới (sau đây gọi là ống **DAL** [Thư viện amplicon pha loãng]).

9 Thêm 585 µl Dung dịch đệm pha loãng thư viện vào các ống **DAL**.

10 Chuyển 5 µl PhiX biến tính (20 pM) vào mỗi ống **DAL** chứa Dung dịch đệm pha loãng thư viện. Dùng pipet hút lên và xuống 3–5 lần để rửa sạch đầu hút và đảm bảo hoàn tất quá trình chuyển.

11 Chuyển 10 µl **PAL** sang mỗi ống **DAL**. Dùng pipet hút lên và xuống 3–5 lần để rửa sạch đầu hút và đảm bảo hoàn tất quá trình chuyển.

12 Trộn xoáy nhanh ống **DAL** và ly tâm nhanh ống **DAL** để thu thập chất lỏng.



**MEO**

Tùy theo bộ kit sử dụng, bạn có thể cần thêm Dung dịch đệm pha loãng thư viện từ bộ kit vật tư tiêu hao giải trình tự của Illumina cho thiết bị giải trình tự tương ứng.



**ĐIỂM DỪNG AN TOÀN**

Nếu không chuyển ngay sang giải trình tự, ống **DAL** có thể được bảo quản ở nhiệt độ -25°C đến -15°C trong tối đa 84 ngày.

### Chuẩn bị giải trình tự bằng MiSeqDx

1 Tiến hành với một ống **DAL** để giải trình tự.

2 Rã đông hoàn toàn nếu bảo quản ống **DAL** đông lạnh.

- 3 Trộn xoáy ống **DAL** ở tốc độ tối đa để trộn đều.
- 4 Ly tâm nhanh ống **DAL**.
- 5 Ủ ống **DAL** trên khối ủ nhiệt ở 96°C trong 2 phút.
- 6 Sau khi ủ, lật ngược ống **DAL** 1–2 lần để trộn đều, rồi đặt ngay vào bồn nước đá.
- 7 Để ống **DAL** ở bồn nước đá trong 5 phút.

**THẬN TRỌNG**

Thực hiện bước biến tính nhiệt ngay lập tức trước khi nạp ống **DAL** vào hộp thuốc thử để đảm bảo nạp mẫu hiệu quả trên tế bào dòng chảy giải trình tự.

Tham khảo tờ hướng dẫn sử dụng *Thiết bị MiSeqDx* để chuẩn bị hộp thuốc thử, nạp thư viện mẫu vào hộp thuốc thử và thiết lập quá trình chạy giải trình tự.

**Chuẩn bị giải trình tự bằng NextSeq 550Dx**

- 1 Tiến hành với một ống **DAL** để giải trình tự.
- 2 Bố trí một ống nắp vặn mới (sau đây gọi là **FDT** [Ống pha loãng cuối cùng]).
- 3 Rã đông hoàn toàn nếu bảo quản ống **DAL** đông lạnh.
- 4 Trộn xoáy ống **DAL** ở tốc độ tối đa để trộn đều.
- 5 Ly tâm nhanh ống **DAL**.
- 6 Chuyển một mẫu **DAL** chia nhỏ sang **FDT**. Thể tích **DAL** cần thiết để đạt được mật độ cụm phù hợp phụ thuộc vào nhóm gộp oligo được sử dụng và thường dao động trong khoảng 130 – 160 µl.
- 7 Điều chỉnh **FDT** sao cho đạt mức tổng thể tích 1300 µl với Dung dịch đệm pha loãng thư viện.
- 8 Trộn xoáy ống **FDT** ở tốc độ tối đa để trộn đều.
- 9 Ly tâm nhanh ống **FDT**.
- 10 Ủ ống **FDT** trên khối ủ nhiệt ở 96°C trong 2 phút.
- 11 Sau khi ủ, lật ngược ống **FDT** 1–2 lần để trộn đều, rồi đặt ngay vào bồn nước đá.
- 12 Để ống **FDT** ở bồn nước đá trong 5 phút.

**THẬN TRỌNG**

Thực hiện bước biến tính nhiệt ngay lập tức trước khi nạp ống **FDT** vào hộp thuốc thử để đảm bảo nạp mẫu hiệu quả trên tế bào dòng chảy giải trình tự.

Tham khảo tờ hướng dẫn sử dụng *Thiết bị NextSeq 550Dx* để chuẩn bị hộp thuốc thử, nạp thư viện mẫu vào hộp thuốc thử và thiết lập quá trình chạy giải trình tự.

## Quy trình kiểm soát chất lượng

Phương thức hiệu quả trong phòng thí nghiệm quy định phải có mẫu DNA chứng dương và mẫu chứng âm (không có khuôn mẫu) trong mỗi lần sử dụng để chuẩn bị thư viện. Mẫu DNA chứng dương phải là một mẫu có đặc điểm rõ ràng với biến thể đã biết trong vùng quan tâm.

Đối với quy trình công việc sinh dưỡng, tất cả các thư viện (bao gồm cả thư viện cho mẫu chứng) đều được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel như đã mô tả trước đó.

## Đặc điểm hiệu suất

Các nghiên cứu dòng mầm sử dụng Bộ kit MiSeqDx™ Universal 1.0 (Tách chiết DNA và các chất can thiệp) hoặc Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx (Đầu vào DNA) để chuẩn bị thư viện. Hai bộ kit sử dụng các thuốc thử giống nhau và chỉ có một sự khác biệt về quy trình công việc: số chu kỳ phản ứng chuỗi polymerase (PCR) (lần lượt là 28 và 32). Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx (50 ng) có chu kỳ PCR cao hơn nên cho phép đầu vào DNA thấp hơn so với Bộ kit MiSeqDx Universal 1.0 (250 ng), như được chứng minh trong nghiên cứu đầu vào DNA bằng Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx. Mỗi nghiên cứu định rõ thuốc thử chuẩn bị thư viện và các vật tư tiêu hao giải trình tự được sử dụng, nhưng tất cả các nghiên cứu đều phản ánh các đặc điểm hiệu suất của Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx do sự tương đương với Bộ kit Universal 1.0.

Các nghiên cứu sinh dưỡng sử dụng Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx.

Các thư viện chuẩn bị bằng Bộ kit MiSeqDx Universal 1.0 sử dụng các vật tư tiêu hao giải trình tự phiên bản 1 của Illumina để đọc hiệu suất, trong khi Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx sử dụng vật tư tiêu hao giải trình tự phiên bản 3 để đọc. Việc giải trình tự được thực hiện trên các thiết bị MiSeqDx. Các nghiên cứu dùng bảng hai gen hoặc một gen làm bảng đột biến đại diện đã sử dụng quy trình công việc và mô-đun phân tích dành riêng cho xét nghiệm.

### Định nghĩa các phép tính được sử dụng trong đặc điểm hiệu suất

- Tỷ lệ phần trăm độ tương hợp dương (PPA) được tính bằng tỷ lệ các lô-cut được phân loại là biến thể theo một phương pháp tham chiếu và được báo cáo chính xác thông qua xét nghiệm.
  - (số lô-cut biến thể được báo cáo chính xác thông qua xét nghiệm)/(tổng số lô-cut biến thể)
  - Các lô-cut biến thể được báo cáo thông qua xét nghiệm và phù hợp với phương pháp tham chiếu là dương tính thật (TP). Các lô-cut biến thể được báo cáo là phát hiện tham chiếu hoặc phát hiện biến thể khác nhau thông qua xét nghiệm là âm tính giả (FP).
- Tỷ lệ phần trăm độ tương hợp âm (NPA) được tính bằng tỷ lệ các lô-cut được phân loại là thể đại theo một phương pháp tham chiếu và được báo cáo chính xác thông qua xét nghiệm.
  - (số lô-cut thể đại được báo cáo chính xác thông qua xét nghiệm)/(tổng số lô-cut thể đại)
  - Các lô-cut thể đại được báo cáo thông qua xét nghiệm và phù hợp với phương pháp tham chiếu là âm tính thật (TN). Các lô-cut thể đại được báo cáo là biến thể thông qua xét nghiệm là dương tính giả (FP).
- Tỷ lệ phần trăm độ tương hợp tổng thể (OPA) được tính bằng tỷ lệ các lô-cut được báo cáo chính xác thông qua xét nghiệm so với một phương pháp tham chiếu.
  - ((số lô-cut biến thể được báo cáo chính xác thông qua xét nghiệm) + (số lô-cut thể đại được báo cáo chính xác thông qua xét nghiệm))/((tổng số lô-cut biến thể) + (tổng số lô-cut thể đại))
- Các phép tính PPA, NPA và OPA không bao gồm trường hợp không phát hiện (các lô-cut biến thể hoặc tham chiếu không đáp ứng một hoặc nhiều bộ lọc chất lượng). Hai nghiên cứu rõ ràng bao gồm trường hợp không phát hiện trong số liệu "% phát hiện chính xác" và việc bao gồm trường hợp không phát hiện được này được ghi nhận cho các bảng áp dụng.
- Tỷ lệ phát hiện được tính bằng tổng số bộ lọc đi qua lô-cut chia cho tổng số vị trí giải trình tự hoặc có thể báo cáo. Số liệu này không xét đến độ tương hợp của kết quả phát hiện với phương pháp tham chiếu.

### Tồn đọng mẫu

Cả quy trình công việc dòng mầm và sinh dưỡng đều có bước chuẩn bị thư viện và giải trình tự nhiều mẫu cùng với các mẫu chứng được xử lý đồng thời. Nghiên cứu Tồn đọng mẫu được thực hiện để đánh giá xem kết quả dương tính giả, do tồn đọng từ việc nhiễm bẩn giữa các giếng trong quá trình sử dụng khi chuẩn bị thư viện hoặc từ việc nhiễm bẩn giữa các lần chạy giải trình tự liên tiếp, có tác động đến kết quả thử nghiệm không. Các biến thể sinh dưỡng đã được sử dụng vì các biến thể này có thể được phát hiện ở tần số alen thấp hơn so với các biến thể dòng mầm.

Các mẫu bao gồm 4 mẫu DNA hệ gen từ các dòng tế bào, mỗi mẫu chứa các đột biến khác nhau trong bảng hai gen. Các mẫu được bố trí sao cho một đột biến ở một vị trí trong một gen có một trình tự tham chiếu (thể đại) ở gen kia.

Tồn đọng giữa các giếng được định nghĩa là một chế độ lỗi có thể phát sinh từ các bước xử lý thủ công (sử dụng pipet, trộn mẫu, v.v.). 2 lần chạy thử nghiệm đã được thực hiện để đánh giá mức độ tồn đọng giữa các giếng mẫu:

- Bố cục bàn cờ của mẫu DNA hệ gen đầu vào cao chứa đột biến ở Gen 1 xen kẽ với mẫu DNA hệ gen đầu vào thấp chứa đột biến ở Gen 2.
- Bố cục bàn cờ của mẫu DNA hệ gen đầu vào cao chứa đột biến ở Gen 2 xen kẽ với mẫu DNA hệ gen đầu vào thấp chứa đột biến ở Gen 1.

Trong mỗi lần chạy, tổng cộng 12 bản sao đã được đánh giá để tìm kết quả dương tính giả (ví dụ: đột biến Gen 1 được báo cáo trong một giếng được chỉ định là mẫu đột biến Gen 2 hoặc ngược lại).

Tồn đọng giữa các lần chạy được định nghĩa là chế độ lỗi có thể phát sinh từ phần dư trong lần chạy giải trình tự trước đó. Nhằm xác định sự tồn đọng giữa các lần chạy giải trình tự, 2 khay - mỗi khay chứa 11 bản sao của một mẫu DNA hệ gen đầu vào duy nhất cùng với một mẫu trống - đã được chuẩn bị và giải trình tự liên tiếp trên một thiết bị MiSeqDx và đánh giá để tìm kết quả dương tính giả. Lần chạy đầu tiên bao gồm 11 bản sao của mẫu đột biến Gen 2 cùng với 1 mẫu trống. Lần chạy thứ hai bao gồm 11 bản sao của mẫu đột biến Gen 1 cùng với 1 mẫu trống. Thư viện mẫu đột biến Gen 2 được giải trình tự trước, rồi chạy giải trình tự thư viện mẫu đột biến Gen 1, sau đó lặp lại lần chạy giải trình tự thư viện mẫu đột biến Gen 2. Nếu phát hiện bất kỳ đột biến Gen 2 nào trong lần chạy chỉ có đột biến Gen 1 và ngược lại, điều đó cho thấy có sự tồn đọng.

Báo cáo ghi nhận không có dương tính giả (0/24, 0%) do tồn đọng *giữa các giếng*. Đã phát hiện mọi đột biến dự kiến.  
 Báo cáo ghi nhận không có dương tính giả (0/24, 0%) do tồn đọng *giữa các lần chạy*. Đã phát hiện mọi đột biến dự kiến.  
 Báo cáo ghi nhận không có dương tính giả (0/48, 0%) do *tổng lượng tồn đọng* (kết hợp giữa các giếng và giữa các lần chạy).

## Đặc điểm hiệu suất dòng mầm

Nghiên cứu đầu vào DNA đã sử dụng bảng 23 nhiễm sắc thể làm bảng đột biến đại diện. Các nghiên cứu khác đã sử dụng bảng gen đơn làm bảng đột biến đại diện.

### Tách chiết DNA

Ba phương pháp tách chiết khác nhau (tách chiết hạt từ, kết tủa cặn và tách cột lọc silica) được đánh giá bằng máu toàn phần chống đông K<sub>2</sub>EDTA. Việc chuẩn bị thư viện được hoàn thành bằng Bộ kit MiSeqDx Universal 1.0. Mười bốn (14) mẫu máu duy nhất đã được sử dụng trong nghiên cứu đại diện cho một loạt kiểu gen từ một bảng gen. 3 phương pháp tách chiết DNA được 2 người vận hành khác nhau thử nghiệm độc lập, mỗi người thực hiện 3 lần chạy giải trình tự cho mỗi phương pháp tách chiết. Mỗi người vận hành thực hiện tách chiết vào những ngày khác nhau. Nồng độ DNA và tỷ lệ A260/A280 của các mẫu gDNA đã tách chiết được xác định bằng phép đo quang phổ. Tổng kích cỡ mẫu cho mỗi phương pháp tách chiết trong nghiên cứu này là 168 (14 mẫu x 2 người vận hành/phương pháp tách chiết x 3 lần chạy/người vận hành x 2 bản sao/mẫu gDNA đã tách chiết). Kết quả của mỗi phương pháp được trình bày trong [Bảng 11](#).

**Bảng 11** Độ chính xác, tỷ lệ phát hiện và tỷ lệ đạt trong lần đầu tiên của mẫu theo phương pháp tách chiết

Phương pháp tách chiết	Số mẫu đã xét nghiệm	Tỷ lệ phát hiện	Độ chính xác <sup>1</sup>	Tỷ lệ đạt trong lần đầu tiên của mẫu <sup>2</sup>
Kết tủa cặn	168	100%	100%	100%
Tách cột lọc silica	168	100%	100%	100%
Tách chiết Hạt từ	168	100%	100%	100%

<sup>1</sup>Độ chính xác - Tỷ lệ phần trăm tương hợp với một phương pháp thử nghiệm tham chiếu (giải trình tự song hướng của Sanger) tính toán được cho những vị trí base nhận được kết quả phát hiện base.

<sup>2</sup>Tỷ lệ đạt trong lần đầu tiên của mẫu - Số lượng mẫu đáp ứng tỷ lệ phát hiện được chỉ định trong lần xử lý đầu tiên (tức là không cần chạy lại hoặc xử lý thêm) dưới dạng phần trăm của tổng số mẫu được chạy trong một thí nghiệm giải trình tự MiSeqDx đơn lẻ.

## Đầu vào DNA

Phạm vi đầu vào DNA để chuẩn bị thư viện (Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx) được đánh giá bằng cách thực hiện nghiên cứu pha loãng dần sử dụng 13 mẫu DNA và một xét nghiệm đại diện được thiết kế để truy vấn nhiều gen bao gồm 12.588 base trên 23 nhiễm sắc thể khác nhau. Bộ kit thuốc thử MiSeqDx v3 được sử dụng để đọc kết quả giải trình tự.

Mỗi mẫu được thử nghiệm lặp lại ở 5 mức đầu vào DNA khác nhau, từ 250 ng đến 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng và 12 ng). Để xác định độ chính xác, các kiểu gen mẫu đã được so sánh với Bộ gen bạch kim phiên bản 2016-01. Kết quả được xác định cho từng mức đầu vào. PPA cho từng loại biến thể (xóa, chèn và SNV) được trình bày trong [Bảng 1](#); NPA được trình bày trong [Bảng 13](#). Tất cả các mức đầu vào đều có độ chính xác tương tự. Đầu vào DNA được đề xuất là 50 ng, với 25 ng và 100 ng là giới hạn dưới và giới hạn trên để đáp ứng yêu cầu về độ chính xác.

**Bảng 12** Kết quả PPA cho mỗi đầu vào DNA theo loại biến thể

Đầu vào DNA (ng)	Loại biến thể	Biến thể dự kiến	Tổng số TP	Tổng số FN	Biến thể không có phát hiện	PPA (%)
12	Xóa	552	534	3	15	99,4
25			541	0	11	100
50			542	0	10	100
100			542	0	10	100
250			542	0	10	100
12	Chèn	588	569	0	19	100
25			572	0	16	100
50			572	0	16	100
100			572	0	16	100
250			572	0	16	100
12	SNV	1752	1725	2	25	99,9
25			1739	3	10	99,8
50			1742	0	10	100
100			1740	0	12	100
250			1735	0	17	100

**Bảng 13** NPA cho mỗi đầu vào DNA

Đầu vào DNA (ng)	Biến thể dự kiến	TN	FP	Tham chiếu không có phát hiện	NPA (%)
12	2892	307179	0	3935	100
25	2892	309767	0	1347	100
50	2892	309999	0	1115	100
100	2892	309754	0	1360	100
250	2892	308922	0	2192	100



## Chất can thiệp

Để đánh giá tác động của chất can thiệp đối với việc chuẩn bị thư viện, một xét nghiệm đại diện để truy vấn một gen duy nhất bao gồm 11.529 base đã được đánh giá khi có và không có các chất can thiệp tiềm tàng. Việc chuẩn bị thư viện được hoàn thành bằng Bộ kit Universal 1.0. Tám (8) mẫu máu toàn phần đại diện cho 8 kiểu gen duy nhất đã được sử dụng trong nghiên cứu. Bốn chất can thiệp nội sinh (bilirubin, cholesterol, hemoglobin và triglyceride) được thử nghiệm bằng cách thêm các chất này vào mẫu xét nghiệm máu trước khi tách chiết DNA. Để đánh giá mức độ can thiệp do lấy máu (lượng ít hơn đề xuất), EDTA được thêm vào mẫu máu ở 2 nồng độ. Giới hạn nồng độ cho mỗi chất được thể hiện trong **Bảng 14**. Ngoài ra, để đánh giá mức độ can thiệp do chuẩn bị mẫu, dung dịch đệm rửa 15% đã được thêm vào 8 DNA hệ gen đã tinh sạch. Bảng gen đơn đã được sử dụng. Tỷ lệ phát hiện đạt 100% đối với tất cả các mẫu đã thử nghiệm bên cạnh khả năng tái tạo 100% trong các phát hiện kiểu gen ở các mẫu khi có và không có chất can thiệp.

**Bảng 14** Tỷ lệ phát hiện cho mỗi Chất thử nghiệm

Chất thử nghiệm	Tổng số bản sao	Nồng độ đã thử nghiệm trong máu (Giới hạn trên)	Nồng độ đã thử nghiệm trong máu (Giới hạn dưới)	Tỷ lệ phát hiện
Bilirubin	16	684 $\mu\text{mol/L}$	137 $\mu\text{mol/L}$	100%
Cholesterol	16	13 mmol/L	2,6 mmol/L	100%
Hemoglobin	16	2 g/L	0,4 g/L	100%
Triglyceride	16	37 mmol/L	7,4 mmol/L	100%
EDTA	16	7 mg/mL	2,8 mg/mL	100%

## Đặc điểm hiệu suất sinh dưỡng

Nghiên cứu đầu vào DNA đã sử dụng bảng 26 gen làm bảng đột biến đại diện. Các nghiên cứu khác đã sử dụng một bảng 2 gen làm bảng đột biến đại diện.

### Đầu vào DNA

Bộ kit QC TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE được sử dụng để đánh giá tập hợp các mẫu DNA tách chiết từ các mẫu xét nghiệm FFPE gồm 9 mô khác nhau. Theo quy trình QC FFPE, giá trị  $\Delta\text{Cq}$  được đo cho từng mẫu và so sánh với mẫu chứng để tính toán các giá trị  $\Delta\text{Cq}$  nằm trong khoảng từ -1,2 đến 6,4. Các mẫu được pha loãng theo tỷ lệ 1:8, 1:4, 1:2, hoặc xử lý nguyên trạng theo hướng dẫn của bộ kit. Một số mẫu được pha loãng thêm (lên đến 1:64) để tăng giá trị  $\Delta\text{Cq}$ . Hai mẫu có giá trị  $\Delta\text{Cq}$  đòi hỏi pha loãng theo tỷ lệ 1:8 cũng được xử lý không pha loãng để thử nghiệm đầu vào cao hơn mức khuyến nghị. Tất cả các dung dịch pha loãng được xử lý thông qua quá trình chuẩn bị thư viện và được giải trình tự. Các phát hiện biến thể từ mô-đun biến thể sinh dưỡng được so sánh với phương pháp giải trình tự Sanger song hướng thực hiện trên các mục tiêu gen cụ thể phụ thuộc vào loại mô. Các dung dịch pha loãng được nhóm thành một trong bốn khoảng  $\Delta\text{Cq}$  và được phân tích để xác định độ chính xác và không có phát hiện (**Bảng 15**). Giới hạn đầu vào trên là  $\Delta\text{Cq}$  bằng 2, đạt được bằng cách pha loãng lặp lại các mẫu có đầu vào nhỏ hơn  $\Delta\text{Cq}$  là 2 theo hướng dẫn của bộ kit. Giới hạn đầu vào dưới là  $\Delta\text{Cq}$  bằng 4. Giá trị  $\Delta\text{Cq}$  từ 2 đến 4 đạt được độ chính xác tương đương. Các xét nghiệm sử dụng  $\Delta\text{Cq}$  để đánh giá mẫu FFPE cần xác định ngưỡng cắt cần thiết để đạt được độ chính xác và độ chụm mong muốn.

**Bảng 15** Độ chính xác và không có phát hiện theo nhóm ΔCq

Nhóm ΔCq	Biến thể				Vị trí thể đại				
	Dự kiến	TP	FN	Không có phát hiện	PPA	TN	FP	Không có phát hiện	NPA
ΔCq -1,2 và -0,8	1	1	0	0	100	1387	1	0	99,9
ΔCq 1,5 – 4	19	18	0	1	100	14358	1	78	99,9
ΔCq ~4	19	18	0	1	100	14333	1	103	99,9
ΔCq ~5	22	20	2	0	90,9	15878	1	439	99,9

### Tách chiết

Một nghiên cứu về phương pháp tách chiết đã được thực hiện để đánh giá tác động của 3 bộ kit tách chiết có bán trên thị trường đối với hiệu suất chuẩn bị thư viện. Các bộ kit sử dụng cột làm cơ sở tách chiết và bao gồm thuốc thử để khử parafin và đảo ngược một phần liên kết chéo formalin đặc trưng cho mô FFPE. Các phương pháp đã được sửa đổi bằng cách tăng gấp đôi lượng proteinase K và phân hủy bằng cách ủ qua đêm có khuấy trộn. DNA được rửa giải ở thể tích khuyến nghị thấp nhất cho một bộ kit nhất định hoặc tối thiểu 30 µl. Mười (10) mẫu được thử nghiệm lặp lại với mỗi bộ kit tách chiết. Tất cả các bản sao (20/20) được thử nghiệm với mỗi bộ kit đều đáp ứng các thông số kỹ thuật kiểm soát chất lượng xét nghiệm. Một xét nghiệm đại diện hai gen đã được sử dụng. PPA là 100% (16/16) và NPA là 100% (1104/1104) đối với mỗi bộ kit. Phương pháp giải trình tự Sanger được sử dụng làm phương pháp tham chiếu.

### Chất can thiệp

Một nghiên cứu về Chất can thiệp đã được thực hiện để đánh giá tác động của các chất có thể can thiệp vào hiệu suất chuẩn bị thư viện. Hiệu suất xét nghiệm được đánh giá khi có các chất ngoại sinh, (sáp parafin, xylen, ethanol và Proteinase K, dung dịch tách chiết), cũng như các chất nội sinh (mô hoại tử và hemoglobin).

### Chất ngoại sinh

Các chất ngoại sinh đã thử nghiệm là dung dịch tách chiết thường dùng trong quá trình tách chiết DNA và được liệt kê với số lượng đã thử nghiệm trong **Bảng 16**. Mười lăm (15) mẫu xét nghiệm FFPE đại trực tràng đã được thử nghiệm cho mỗi chất can thiệp và so sánh với mẫu chứng chưa xử lý. Các mẫu xét nghiệm đại diện cho các mẫu thể đại không chứa đột biến bảng Gen 1 (5/15 mẫu xét nghiệm), cũng như các mẫu có chứa các đột biến phổ biến (10/15 mẫu xét nghiệm). Các mẫu xét nghiệm được giải trình tự ở cấp độ ghép kênh tối đa là 10 mẫu cộng với mẫu chứng trong mỗi lần chạy.

**Bảng 16** Chất đã thử nghiệm

Chất can thiệp	Hàm lượng thực tế [ $\mu\text{l}$ / 25 $\mu\text{l}$ rửa giải]
Dung dịch khử parafin	$1,69 \times 10^{-04}$
Sáp parafin (trong Xylen)	$2,50 \times 10^{-05}$
Xylen	$2,50 \times 10^{-05}$
Ethanol	$1,69 \times 10^{-04}$
Proteinase K <sup>1</sup>	$3,30 \times 10^{-06}$
Dung dịch rửa <sup>2</sup>	$6,25 \times 10^{-01}$
Dung dịch rửa 1X <sup>3</sup>	$6,25 \times 10^{-01}$
Dung dịch đệm rửa AW1 <sup>1</sup>	$6,25 \times 10^{-02}$
Dung dịch đệm rửa AW2 <sup>1</sup>	$6,25 \times 10^{-01}$

<sup>1-3</sup>Ba bộ kit tách DNA dựa trên cột có bán trên thị trường.

Đối với tất cả các chất ngoại sinh đã thử nghiệm, tất cả 15 mẫu xét nghiệm đều đạt yêu cầu về chất lượng mẫu (15/15, 100% Tỷ lệ đạt QC mẫu) và cho thấy kết quả hợp lệ sau khi chuẩn bị và giải trình tự thư viện (15/15, 100% Tỷ lệ đạt trong lần đầu tiên của mẫu).

PPA được tính toán trên cơ sở từng mẫu. OPA và NPA được tính toán trên cơ sở từng đột biến ở cấp độ DNA; có 56 đột biến trên mỗi mẫu ở cấp độ DNA. Tất cả 15 mẫu xét nghiệm của toàn bộ 9 chất ngoại sinh đều cho thấy sự thống nhất với điều kiện kiểm soát chưa xử lý ở tất cả các vị trí đột biến (10/10) và không đột biến (830/830). Không chất nào có khả năng can thiệp được đánh giá ở nồng độ tối đa dự kiến sẽ gặp phải trong quá trình tách chiết DNA hệ gen (gDNA) từ mô FFPE tác động đến hiệu suất của Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx.

### Chất nội sinh (Hemoglobin)

Mười lăm (15) mẫu FFPE đại trực tràng được thí nghiệm lần lượt khi có hoặc không có hemoglobin 2 mg/mL, một lượng hemoglobin CLSI "cao". Các mẫu xét nghiệm đại diện cho các mẫu thể đại không chứa đột biến bảng đại diện (5/15 mẫu xét nghiệm), cũng như các mẫu có chứa các đột biến Bảng đại diện phổ biến (10/15 mẫu xét nghiệm). Các mẫu xét nghiệm được giải trình tự ở cấp độ ghép kênh tối đa là 10 mẫu cộng với mẫu chứng trong mỗi lần chạy. Tất cả 15 mẫu xét nghiệm đều đạt yêu cầu về chất lượng mẫu (15/15, 100% Tỷ lệ đạt QC mẫu) và cho thấy kết quả hợp lệ sau khi chuẩn bị và giải trình tự thư viện (15/15, 100% Tỷ lệ đạt trong lần đầu tiên của mẫu). Tất cả 15 mẫu xét nghiệm đều cho thấy sự thống nhất ở tất cả các vị trí đột biến (10/10) và không đột biến (830/830) với điều kiện kiểm soát chưa xử lý. Nồng độ hemoglobin đã thử nghiệm không ảnh hưởng đến hiệu suất của Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx.

### Chất nội sinh (Hoại tử)

Mười lăm (15) mẫu FFPE đại trực tràng bao gồm các mẫu thể đại không chứa đột biến bảng (10/15 mẫu xét nghiệm), cũng như các mẫu có chứa đột biến Bảng đại diện phổ biến (5/15 mẫu xét nghiệm) và từ 10–80% mô hoại tử được xác định khi đánh giá bệnh lý, đã được sử dụng để đánh giá các mẫu xét nghiệm hoại tử nội sinh. Các mẫu xét nghiệm được giải trình tự ở cấp độ ghép kênh tối đa là 10 mẫu cộng với mẫu chứng trong mỗi lần chạy. 14/15 mẫu xét nghiệm cho kết quả hợp lệ sau khi chuẩn bị và giải trình tự thư viện (93,3% Tỷ lệ đạt trong lần đầu tiên của mẫu). Tỷ lệ phần trăm độ tương hợp tổng thể là 99,9% (783/784) so với phương pháp giải trình tự Sanger. PPA là 100% (4/4) và NPA là 99,87% (779/780). 1 kết quả dương tính giả phát hiện được có khả năng là do tần số đột biến mẫu thấp hơn giới hạn phát hiện của phương pháp giải trình tự Sanger. Nhìn chung, Bộ kit TruSeq Custom Amplicon Dx đáp ứng các đặc điểm về hiệu suất với mô chứa 10–80% hoại tử.

## Bảng sáng chế và nhãn hiệu

Tài liệu này và nội dung trong đó thuộc quyền sở hữu của Illumina, Inc. và các công ty liên kết của Illumina, Inc. ("Illumina") và chỉ dành cho việc sử dụng theo hợp đồng với khách hàng của Illumina liên quan đến việc sử dụng (các) sản phẩm được mô tả trong tài liệu này và không dành cho mục đích nào khác. Tài liệu này và nội dung trong đó sẽ không được sử dụng hay phân phối vì bất kỳ mục đích nào khác và/hoặc không được truyền tải, tiết lộ hay sao chép dưới bất kỳ hình thức nào khác mà không có sự cho phép trước bằng văn bản của Illumina. Illumina không chuyển nhượng bất kỳ giấy phép nào theo các bằng sáng chế, nhãn hiệu, bản quyền hoặc các quyền theo thông luật cũng như các quyền tương tự của bất kỳ bên thứ ba nào thông qua tài liệu này.

Các hướng dẫn nêu trong tài liệu này phải được tuân thủ nghiêm ngặt và rõ ràng bởi cá nhân được đào tạo phù hợp và có đủ trình độ nhằm đảm bảo sử dụng an toàn và đúng cách (các) sản phẩm được mô tả trong tài liệu này. Người dùng phải đọc hết và hiểu rõ tất cả nội dung của tài liệu này trước khi sử dụng (các) sản phẩm đó.

**VIỆC KHÔNG ĐỌC TOÀN BỘ VÀ TUÂN THỦ RÕ RÀNG TẤT CẢ CÁC HƯỚNG DẪN NÊU TRONG TÀI LIỆU NÀY CÓ THỂ GÂY HƯ HỎNG (CÁC) SẢN PHẨM, GÂY THƯƠNG TÍCH CHO NGƯỜI, BAO GỒM NGƯỜI DÙNG HOẶC NHỮNG ĐỐI TƯỢNG KHÁC VÀ GÂY THIỆT HẠI TÀI SẢN KHÁC, VÀ SẼ LÀM MẤT HIỆU LỰC BẢO HÀNH ÁP DỤNG CHO (CÁC) SẢN PHẨM ĐÓ.**

**ILLUMINA KHÔNG CHỊU BẤT KỲ TRÁCH NHIỆM NÀO PHÁT SINH TỪ VIỆC SỬ DỤNG KHÔNG ĐÚNG CÁCH (CÁC) SẢN PHẨM ĐƯỢC MÔ TẢ TRONG TÀI LIỆU NÀY (BAO GỒM CẢ CÁC BỘ PHẬN CỦA SẢN PHẨM HOẶC PHẦN MỀM).**

© 2021 Illumina, Inc. Bảo lưu mọi quyền.

Tất cả các nhãn hiệu đều là tài sản của Illumina, Inc. hoặc các chủ sở hữu tương ứng. Để biết thông tin cụ thể về nhãn hiệu, hãy xem trang web [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

AMPure, Beckman và Beckman Coulter là các nhãn hiệu hoặc nhãn hiệu đã đăng ký của Beckman Coulter, Inc.

## Thông tin liên hệ



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A.  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (ngoài khu vực Bắc Mỹ)  
techsupport@illumina.com  
[www.illumina.com](http://www.illumina.com)



Illumina Netherlands B.V.  
Steenoven 19  
5626 DK Eindhoven  
Hà Lan



Nhà bảo trợ tại Úc:  
Illumina Australia Pty Ltd  
Nursing Association Building  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Australia

## Ghi nhãn sản phẩm

Để có thông tin tham chiếu đầy đủ về các ký hiệu xuất hiện trên bao bì và nhãn sản phẩm, hãy tham khảo khóa ký hiệu tại địa chỉ [support.illumina.com](http://support.illumina.com), trên tab *Documentation and Literature* (Tài liệu hướng dẫn và Tài liệu giới thiệu) cho bộ kit của bạn.