

## Gebrauchsanweisung



# LymphoTrack<sup>®</sup> Dx IGK Assay – MiSeq™

Identifikation und Nachverfolgung klonaler Genumlagerungen der Immunglobulin-Kappa-Leichtkette (IGK) mittels Next-Generation Sequencing (NGS) mit dem Illumina<sup>®</sup> MiSeq.

**IVD** Dieser Assay ist zur Verwendung als *In-vitro*-Diagnostikum vorgesehen.

Schematische Darstellung des IGK-Genlocus:



Katalognummer	Produkte	Menge
<b>REF</b> 91220009	LymphoTrack Dx IGK Assay-Kit A – MiSeq	8 Indizes – jeweils 5 Reaktionen
<b>REF</b> 91220019	LymphoTrack Dx IGK Assay-Panel – MiSeq	24 Indizes – jeweils 5 Reaktionen

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>VERWENDUNGSZWECK</b> .....	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES ASSAYS</b> .....	<b>3</b>
2.1.	Hintergrund .....	3
2.2.	Zusammenfassung .....	3
<b>3.</b>	<b>VERFAHRENSGRUNDLAGEN</b> .....	<b>4</b>
3.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	4
3.2.	Amplikonreinigung .....	4
3.3.	Amplikonquantifizierung .....	4
3.4.	Next-Generation Sequencing (NGS) .....	4
3.5.	Multiplexing von Amplikons .....	5
<b>4.</b>	<b>REAGENZIEN</b> .....	<b>6</b>
4.1.	Reagenzienbestandteile .....	6
4.2.	Warn- und Vorsichtshinweise .....	7
4.3.	Lagerung und Handhabung .....	7
<b>5.</b>	<b>INSTRUMENTE</b> .....	<b>8</b>
5.1.	Thermocycler .....	8
5.2.	Magnetstand .....	8
5.3.	Real-Time PCR-Instrument .....	8
5.4.	Illumina MiSeq Instrument* .....	8
<b>6.</b>	<b>GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG VON PROBEN</b> .....	<b>9</b>
6.1.	Vorsichtsmaßnahmen .....	9
6.2.	Störsubstanzen .....	9
6.3.	Probenanforderung und -handhabung .....	9
6.4.	Probenlagerung .....	9
<b>7.</b>	<b>ASSAY-VERFAHREN</b> .....	<b>10</b>
7.1.	Im Lieferumfang enthaltene Materialien .....	10
7.2.	Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien .....	10
7.3.	Vorbereitung der Reagenzien .....	11
7.4.	Amplifikation .....	11
7.5.	AMPure XP-Aufreinigung .....	12
7.6.	Quantifizierung von Amplikons .....	13
7.7.	Pooling und Quantifizierung der Bibliothek .....	14
7.8.	Verdünnung der gepoolten Bibliothek .....	14
7.9.	qPCR-Setup für die Bibliotheksquantifizierung .....	14
7.10.	Vorbereitung der Bibliothek auf den MiSeq-Sequenzierungslauf .....	15
7.11.	Laden der MiSeq Flow Cell (Flusszelle) .....	16
7.12.	Setup für MiSeq Sample Sheet (Probenblatt) .....	16
7.13.	MiSeq-Lauf starten .....	17
<b>8.</b>	<b>DATENANALYSE</b> .....	<b>17</b>
<b>9.</b>	<b>ERWARTETE WERTE</b> .....	<b>18</b>
<b>10.</b>	<b>VERFAHRENSEINSCHRÄNKUNGEN</b> .....	<b>18</b>
<b>11.</b>	<b>INTERPRETATION UND BERICHTERSTELLUNG</b> .....	<b>19</b>
<b>12.</b>	<b>BEISPIELDATEN</b> .....	<b>21</b>
<b>13.</b>	<b>LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN</b> .....	<b>21</b>
<b>14.</b>	<b>FEHLERSUCHE UND -BEHEBUNG</b> .....	<b>22</b>
<b>15.</b>	<b>TECHNISCHER SUPPORT UND KUNDENDIENST</b> .....	<b>23</b>
<b>16.</b>	<b>REFERENZEN</b> .....	<b>23</b>
<b>17.</b>	<b>SYMBOLS</b> .....	<b>23</b>
<b>18.</b>	<b>HAFTUNGSHINWEIS</b> .....	<b>24</b>
<b>19.</b>	<b>LYMPHOTrack Dx IGH Assay - MiSeq: KURZANLEITUNG</b> .....	<b>25</b>
<b>20.</b>	<b>ANHANG A: ERSTELLUNG EINER SEQUENZIERUNGSBIBLIOTHEK MIT MEHREREN NGS-ZIELEN</b> .....	<b>26</b>

## 1. Verwendungszweck

Der LymphoTrack Dx *IGK* Assay für das Illumina MiSeq ist ein *In-vitro*-Diagnostikum zur Bestimmung der Häufigkeitsverteilung von *IGK*-Genumlagerungen basierend auf Next-Generation Sequencing (NGS) bei Patienten, bei denen der Verdacht auf eine lymphoproliferative Erkrankung besteht. Dieser Assay unterstützt die Identifizierung lymphoproliferativer Erkrankungen.

## 2. Zusammenfassung und Erläuterung des Assays

### 2.1. Hintergrund

Der Genlocus der humanen Immunglobulin-Kappa-Leichtkette (IGK) auf Chromosom 2 (2p11.2) umfasst mehrere einzelne  $V_{\kappa}$ -Gensegmente, die in sieben  $V_{\kappa}$ -Genfamilien gruppiert werden, sowie fünf  $J_{\kappa}$ -Gensegmente, die der  $C_{\kappa}$ -Region vorgelagert sind. Das kappa deleting element (Kde), etwa 24 kb nach der  $J_{\kappa}$ - $C_{\kappa}$ -Region gelegen, kann sich mit  $V_{\kappa}$ -Gensegmenten umlagern ( $V_{\kappa}$ -Kde), aber auch eine Umlagerung zu einer isolierten RSS mit dem  $J_{\kappa}$ - $C_{\kappa}$ -Intron (INTR) ist möglich. Die so entstehenden  $V_{\kappa}$ -Kde- und INTR-Kde-Umlagerungen sind das Produkt einer nicht erfolgreichen Umlagerung der B-Zelle.<sup>1</sup>

Lymphatische Zellen unterscheiden sich von anderen somatischen Zellen des Körpers; während der Entwicklung durchlaufen die Antigen-Rezeptor-Gene von lymphatischen Zellen eine somatische Genumlagerung.<sup>2</sup> Beispielsweise werden während der B-Zellentwicklung Gene, die den IGK-Locus codieren, aus mehreren polymorphen Gensegmenten zusammengesetzt, die eine Umlagerung und Selektion durchlaufen, wodurch Kombinationen entstehen, die sowohl hinsichtlich Länge als auch Sequenz einzigartig sind. Da Erkrankungen wie Leukämien und Lymphome aus der malignen Transformation einzelner lymphatischer Zellen entstehen, teilen sich alle Leukämie- und Lymphomzellen in der Regel ein oder mehrere zellspezifische oder „klonale“ Antigen-Rezeptor-Gen-Umlagerungen. Somit können Tests, die klonale IGK-Umlagerungen nachweisen können, für die Untersuchung bösartiger B-Zell-Erkrankungen hilfreich sein.

Ursprünglich wurden klonale Umlagerungen mittels Restriktionsfragment/Southern-Blot-Hybridisierung (RF-SBH) identifiziert. Diese Untersuchungen erwiesen sich jedoch als langwierig, arbeitsintensiv, erforderten große Mengen an DNA und eigneten sich nicht für die Analyse vieler der weniger verschiedenartigen Antigen-Rezeptor-Loci.

Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte wurden RF-SBH-Assays von PCR-basierten Klonalitätsuntersuchungen abgelöst, die von Alexander Morley<sup>3</sup> entwickelt wurden und derzeit die Goldstandardmethode sind. Diese Assays stellen eine Klonalität dadurch fest, dass amplifizierte V-J- oder D-J-Produkte nach ihrer Auftrennung mittels Gel- oder Kapillarelektrophorese überrepräsentiert sind. Diese Assays sind empfindlich und eignen sich für das Testen geringer DNA-Mengen, sie können jedoch nicht ohne Weiteres zwischen klonalen Populationen und multiplen Umlagerungen unterscheiden, die möglicherweise an der gleichen Position ein Signal zeigen. Des Weiteren wurden die Assays nicht für die Identifizierung der spezifischen V-J-DNA-Sequenz entwickelt, die für die Nachverfolgung klonaler Populationen während nachfolgender Analysen erforderlich ist. Diese zweite Einschränkung kann von besonderer Bedeutung sein, da die einzigartige klonenspezifische DNA-Sequenz nach ihrer Identifizierung für die Nachverfolgung dieser klonalen Zellpopulationen während nachfolgender Tests verwendet werden kann.

### 2.2. Zusammenfassung

Dieser LymphoTrack Dx *IGK* Assay – MiSeq ist eine wesentliche Verbesserung im Vergleich zu bestehenden Klonalitäts-Assays, die die Fragmentanalyse anwenden, da er den Großteil aller *IGK*-Genumlagerungen mit einem einzigen Multiplex-Master-Mix effizient nachweist und die für jede klonale Genumlagerung spezifische DNA-Sequenz identifiziert. **Somit erfüllt dieser Assay zwei wichtige, einander ergänzende Funktionen: Er trägt zum Nachweis der ursprünglichen klonalen Populationen bei und identifiziert Sequenzdaten, die für die Nachverfolgung der Klone in nachfolgenden Proben erforderlich sind.**

Jeder einzelne Multiplex-Master-Mix für *IGK* zielt auf die  $V_{\kappa}$ - $J_{\kappa}$ -, die  $V_{\kappa}$ -Kde- und die INTR-Kde-Genumlagerungen ab, die im Zusammenhang mit bösartigen lymphatischen Erkrankungen beschrieben wurden. In den Master-Mixen enthaltene Primer verfügen über Illumina-Adapter und bis zu 24 unterschiedliche Indizes. Diese Methode ermöglicht eine One-Step-PCR und es können Amplikons mehrerer verschiedener Proben und Genziele (erzeugt mit anderen LymphoTrack Dx Assays für das Illumina MiSeq System, separat erhältlich) in einer MiSeq Flow Cell (Flusszelle) gepoolt werden, sodass bis zu 24 Proben pro Genziel parallel während eines einzigen Laufs analysiert werden können.

Die zugehörige LymphoTrack Dx Software – MiSeq ermöglicht die einfache und optimierte Analyse und Visualisierung der Daten. Anhand der Informationen in Abschnitt 11 *Interpretation und Berichterstellung*, lassen sich die in der Software zusammengefassten Probenergebnisse einfach auf das Vorhandensein oder Fehlen von Klonalität interpretieren. **Die Ergebnisse molekularer Klonalitätstests müssen immer unter Berücksichtigung klinischer, histologischer und immunphänotypischer Daten interpretiert werden.**

Positivkontrollen und Negativkontrollen für Klonalität sind im Kit enthalten.

**Hinweis:** Eine detailliertere Erläuterung des Locus und der zielgerichteten Sequenzierung finden Sie in Miller, JE., 2013.<sup>4</sup>

## 3. Verfahrensgrundlagen

### 3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Assays werden routinemäßig für die Identifizierung klonaler B- und T-Zellpopulationen eingesetzt. Diese Assays amplifizieren die DNA zwischen Primern, die auf die konservierten V- und J-Regionen von Antigen-Rezeptor-Genen abzielen. Die Primer binden an diese konservierten Regionen und liegen auf beiden Seiten einer Region, in der während der Reifung aller B- und T-Lymphozyten programmierte Genumlagerungen stattfinden. Durch diese Genumlagerungen entstehen unterschiedliche Populationen der B- und T-Lymphozyten.

Bei den Antigen-Rezeptor-Genen, die umgelagert werden, handelt es sich um Loci schwerer Immunglobulinketten (*IGH*) und leichter Immunglobulinketten (*IGK* und *IGL*) in B-Zellen sowie die T-Zell-Rezeptor-Gen-Loci (*TRA*, *TRB*, *TRG* und *TRD*) in T-Zellen. Jede B- und T-Zelle hat eine oder zwei produktive V-J-Umlagerungen, die hinsichtlich Länge und Sequenz einmalig sind. Wenn somit DNA einer normalen oder polyklonalen Population mit DNA-Primern amplifiziert wird, die an die V-J-Region angrenzen, werden Amplikons generiert, die hinsichtlich Sequenz und Länge einmalig sind und damit die heterogene Population widerspiegeln. In einigen Fällen, in denen keine Lymphozyten-DNA vorliegt, werden keine Amplikons generiert. Proben, die klonale *IGK*-Populationen enthalten, verfügen über bis zu vier markante amplifizierte Produkte der gleichen Länge und Sequenz, die mit einer signifikanten Häufigkeit innerhalb eines verminderten polyklonalen Hintergrunds nachgewiesen werden.

### 3.2. Amplikonreinigung

PCR-Amplikons werden aufgereinigt, um überschüssige Primer, Nukleotide, Salze und Enzyme zu entfernen. Bei diesem Verfahren kommt die Methode „Solid-Phase Reversible Immobilization“ (SPRI; festphasengebundene reversible Immobilisierung) mittels paramagnetischer Partikel zur Hochdurchsatz-Aufreinigung von PCR-Amplikons zum Einsatz. Durch Verwendung eines optimierten Puffers werden PCR-Amplikons mit 100 bp oder mehr selektiv an paramagnetische Partikel gebunden, während Verunreinigungen wie überschüssige Primer, Primer-Dimere, Salze und nicht eingebaute dNTPs entfernt werden. Die Amplikons lassen sich anschließend eluieren und von den paramagnetischen Partikeln trennen. Nun liegt ein aufgereinigtes PCR-Produkt für die weitere Analyse und Amplikonquantifizierung vor.

### 3.3. Amplikonquantifizierung

Die aufgereinigten Amplikons werden mit dem KAPA™ Library Quantification Kit (Bibliotheksquantifizierungskit) für das Illumina System quantifiziert. Aufgereinigte und verdünnte PCR-Amplikons sowie ein Set aus sechs vorab verdünnten DNA-Standards werden durch quantitative Verfahren (qPCR) amplifiziert, wobei der KAPA SYBR® FAST qPCR Master-Mix und entsprechende Primer verwendet werden. Die Primer im KAPA-Kit binden an die Illumina P5 und P7 Flusszellen-Adapter-Oligosequenzen.

Der durchschnittliche Ct-Wert für die vorab verdünnten DNA-Standards wird zur Erstellung einer Standardkurve gegen log<sub>10</sub> (Konzentration in pM) aufgetragen. Diese Standardkurve dient dann zur Berechnung der Konzentration (pM) der PCR-Amplikons. Die Berechnung der Konzentration der PCR-Amplikons ermöglicht eine ausgewogene Amplikonrepräsentation in der endgültig gepoolten Bibliothek, die zur Sequenzierung in das MiSeq geladen wird.

### 3.4. Next-Generation Sequencing (NGS)

Sanger-Sequenzierungen sind die beliebtesten Sequenzierungsverfahren der Nukleinsäure-Sequenzierungstechnologien der „ersten Generation“. Neuere Verfahren, die erstaunliche parallele Sequenzierungen ermöglichen, werden häufig als „NGS“ bezeichnet. Diese Technologien können verschiedene Strategien für die

Template-Vorbereitung, Sequenzierung, Bildgebung und Bioinformatik für Genom-Alignments und -Assemblierung kombinieren.

Die in diesem Assay verwendeten NGS-Technologien basieren auf der Amplifizierung von Gensequenzen unter Verwendung einer Reihe von Consensus-Vorwärts- und -Rückwärtsprimern, die Adapter- und Indexmarkierungen umfassen. Mit den LymphoTrack Dx Master-Mixen generierte Amplikons werden quantifiziert, gepoolt und zur Sequenzierung mit einer Illumina MiSeq Sequenzierungsplattform in eine Flusszelle geladen. Hierzu werden die amplifizierten Produkte in der Bibliothek in einer Flusszelle mit Oligonukleotiden hybridisiert und amplifiziert, um lokale klonale Kolonien auszubilden („Bridge Amplification“). Es werden vier Typen reversibler Terminator-Basen (RT-Basen) hinzugegeben und der DNA-Sequenzierungsstrang wird um ein Nukleotid nach dem anderen verlängert. Um den Einbau von Nukleotiden aufzuzeichnen, nimmt eine CCD-Kamera ein Bild des Lichts auf, das emittiert wird, wenn die einzelnen RT-Basen hinzugefügt und dann gespalten werden, um den Einbau der nächsten Base zu ermöglichen.

### 3.5. Multiplexing von Amplikons

Das vorliegende Produkt wurde so konzipiert, dass zwei verschiedene Multiplexing Levels möglich sind, um Laboratorien Zeit und Kosten zu ersparen. Das erste Multiplexing-Level wird durch die multiplen Indizes ermöglicht, die mit den Assays bereitgestellt werden. Jeder dieser 24 Indizes agiert wie ein eindeutiger Barcode, der es ermöglicht, Amplikons mehrerer verschiedener Proben nach der PCR-Amplifizierung zu poolen, um die Sequenzierungsbibliothek zu erstellen. Die so entstandenen Sequenzen werden von der Bioinformatik-Software sortiert, die die Sequenzen identifiziert, die aus einer bestimmten Probe stammen.

Das zweite Multiplexing-Level entsteht durch die Fähigkeit der zugehörigen Software, Sequenzierungsdaten sowohl nach Index als auch nach Gen zu sortieren. Somit können Amplikons, die mit zielgerichteten Primern erzeugt wurden (selbst solche mit dem gleichen Index), vereinigt werden, um eine Bibliothek zu erstellen, die dann mit einer einzigen Flusszelle sequenziert wird. Ein Beispiel hierfür wäre die gemeinsame Sequenzierung einer Kombination aus Produkten aus verschiedenen Invivoscribe LymphoTrack Dx Assay Kits für den MiSeq, beispielsweise *IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* und *TRG*. **Wird ein Multiplexing von Amplikons verschiedener Genziele durchgeführt, muss auf die passende Sequenzierungschemie geachtet werden. Die Anzahl der Sequenzierungszyklen muss ausreichend groß sein, sodass auch das längste Amplikon des Multiplex sequenziert werden kann.** Soll beispielsweise ein Multiplexing von Amplikons aus einer Kombination von *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* und *TRG* vorgenommen werden, sollte das Sequenzierungs-Kit MiSeq v2 (500 Zyklen) für bis zu 4 Ziele oder das Sequenzierungs-Kit v3 (600 Zyklen) für bis zu 7 Ziele verwendet werden. Für ein Multiplexing eines dieser Amplikons mit *IGHV* Leader sollte das Sequenzierungs-Kit MiSeq v3 (600 Zyklen) verwendet werden. Für ein Multiplexing von ausschließlich *IGH* FR3 und *TRG* Amplikons, die beide eine kürzere Amplikongröße aufweisen, sollte das Sequenzierungs-Kit MiSeq v2 (300 oder 500 Zyklen) verwendet und die Zykluseinstellungen im Probenblatt sollten angepasst werden. Weitere Anweisungen sind Anhang A (Abschnitt 20) zu entnehmen.

Die Anzahl der Proben, für die ein Multiplexing in einer einzigen Flusszelle durchgeführt werden kann, hängt auch von der verwendeten Flusszelle ab. Die Standardflusszellen von Illumina (MiSeq v3) können 22–25 Millionen Lesevorgänge generieren. Zur Bestimmung der Anzahl der Lesevorgänge pro Probe teilen Sie die Gesamtzahl der Lesevorgänge für die Flusszelle durch die Anzahl der Proben, für die das Multiplexing vorgenommen werden soll. Die Anzahl der Lesevorgänge pro Probe sollte für eine Interpretation ausreichen. Für weitere Informationen siehe Abschnitt 11 *Interpretation und Berichterstellung*. Illumina stellt auch andere Flusszellen her, bei denen dieselbe Sequenzierungschemie verwendet wird, aber weniger Lesevorgänge generiert werden. Bei Verwendung dieser alternativen Flusszellen ist zu berücksichtigen, dass bei weniger Gesamtlesevorgängen entweder die Tiefe je Probe reduziert wird oder dass der Lauf auf der Flusszelle weniger Proben enthalten muss, um dieselbe Tiefe je Probe zu erzielen.

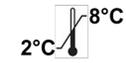
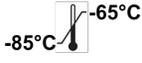
## 4. Reagenzien

### 4.1. Reagenzienbestandteile

Tabelle 1. Verfügbare Kits

Katalognummer	Beschreibung	Anzahl der Index-Master-Mixe	Reaktionen insgesamt
 91220009	LymphoTrack Dx <i>IGK</i> Assay-Kit A – MiSeq	8 Indizes – jeweils 5 Sequenzierungsläufe	40
 91220019	LymphoTrack Dx <i>IGK</i> Assay-Panel – MiSeq	24 Indizes – jeweils 5 Sequenzierungsläufe	120

Tabelle 2. Kit-Bestandteile

Reagenz	Reagenzienbestandteile	Verpackungseinheit	92270019 Anzahl der Einheiten	92270009 Anzahl der Einheiten	Lager-temperatur	Anmerkungen
<b>Master-Mixe<sup>‡</sup></b>	<i>IGK</i> MiSeq 01	250 µL	1	1		keine Angabe
	<i>IGK</i> MiSeq 02		1	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 03		1	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 04		1	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 05		1	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 06		1	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 07		1	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 08		1	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 09		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 10		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 11		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 12		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 13		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 14		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 15		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 16		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 18		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 19		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 20		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 21		0	1		
	<i>IGK</i> MiSeq 22		0	1		
<i>IGK</i> MiSeq 23	0	1				
<i>IGK</i> MiSeq 25	0	1				
<i>IGK</i> MiSeq 27	0	1				
<b>DNA für die Positivkontrolle</b>	<i>IGK</i> POS (+)  40880018)	45 µL	1	3		<i>IGK</i> V3D-20_01 / <i>IGK</i> DEL DNA verdünnt in Tonsillen-DNA
<b>DNA für die Negativkontrolle</b>	NGS NEG (-)  40920018)	45 µL	1	3	oder 	Tonsillen-DNA, maximale Sequenzhäufigkeit kann je nach Charge schwanken

**Hinweis:** Für die Herstellung dieser Kits werden keine Konservierungsstoffe verwendet.

**‡Hinweis:** Indizes 17, 24 und 26 werden für diese Kits nicht verwendet

#### 4.2. Warn- und Vorsichtshinweise



Lesen Sie die Gebrauchsanweisung aufmerksam durch, bevor Sie mit dem Assay beginnen, und halten Sie sich strikt an die Anweisungen.

- **IVD** Dieses Produkt ist zur Verwendung als In-vitro-Diagnostikum vorgesehen.
- Verwenden Sie den Assay-Kit als System. Verwenden Sie keine Reagenzien anderer Hersteller. Verdünnung, Reduzierung der Amplifikationsreaktionen und andere Abweichungen vom vorliegenden Protokoll können sich auf die Testergebnisse auswirken und/oder zur Ungültigkeit beschränkter Unterlizenzen führen, die mit dem Erwerb der Kits bereitgestellt werden.
- Die Materialien sind bis Ablauf des aufgedruckten Verfallsdatums stabil, wenn Handhabung und Lagerung wie hier beschrieben erfolgen. Kits nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Optimale Leistung und Reproduzierbarkeit können nur bei genauer Einhaltung des Protokolls gewährleistet werden. Stellen Sie sicher, dass die richtigen Programme für den Thermocycler ausgewählt werden, da ungeeignete Programme zu ungenauen/falschen Ergebnissen, wie z. B. falsch positiven und falsch negativen Ergebnisse, führen können.
- Mischen und kombinieren Sie Reagenzien aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern nicht.
- Entsorgen Sie nicht verwendete Reagenzien und Abfälle gemäß national, bundesstaatlich, staatlich und lokal gültigen Bestimmungen.
- Sämtliche Laborverfahren sind mit Standardschutzkleidung (Handschuhe, Laborkittel und Augenschutz) durchzuführen. Bei der Handhabung von Proben ist gemäß guter Laborpraxis zu arbeiten und es sind universelle Schutzmaßnahmen zu ergreifen. Nicht mit dem Mund pipettieren. In Arbeitsbereichen des Labors nicht essen, trinken oder rauchen. Hände nach dem Umgang mit Proben und Assay-Reagenzien gründlich waschen. Proben sollten in zugelassenen biologischen Sicherheitsbereichen gehandhabt und nur in zugelassenen Sicherheitswerkbänken geöffnet werden.
- Für die Vorbereitung von DNA-Proben ist Wasser in Molekularbiologie-Qualität zu verwenden.
- Aufgrund der hohen analytischen Sensitivität dieses Tests sind Kontaminationen der Reagenzien oder Amplifikationsprodukte durch Proben, Kontrollen oder Amplikons zu vermeiden. Zwischen Proben und zwischen dem Dispensieren von Reagenzien jeweils eine neue, aerosol-beständige Pipettenspitze verwenden. Sämtliche Reagenzien sind auf Anzeichen einer Kontamination hin zu überwachen (z. B. Negativkontrollen, die positive Signale geben). Reagenzien, bei denen der Verdacht einer Kontamination besteht, sind zu entsorgen.
- Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos sind beim Umgang mit Proben und Reagenzien Handschuhe zu tragen sowie Arbeitsbereiche und Pipetten regelmäßig und vor dem PCR-Setup zu reinigen.
- Der Arbeitsablauf im PCR-Labor sollte unidirektional zwischen verschiedenen Arbeitsbereichen ablaufen: zunächst Vorbereitung des Master-Mix, anschließend Probenaufbereitung, dann Amplifikation und abschließend Nachweis. Autoklavieren beseitigt keine DNA-Kontamination. Amplifizierte DNA sollte nicht in den Bereich gebracht werden, der für die Zubereitung der Master-Mixe oder Proben vorgesehen ist.
- Alle in einem bestimmten Laborbereich verwendeten Pipetten, Pipettenspitzen und anderen Geräte müssen in diesem Laborbereich verbleiben.
- Gegenstände, die nicht entsorgt werden können, müssen zweimal je in 10-prozentiger Bleichelösung dekontaminiert und mit destilliertem Wasser gespült werden, bevor sie in den Ausgangsbereich zurückgebracht werden können.
- Wann immer möglich sollten sterile Kunststoffartikel für den Einmalgebrauch verwendet werden, um einer Kontamination vorzubeugen.

#### 4.3. Lagerung und Handhabung

- Wird der Assay nicht sofort verwendet, ist er bei Temperaturen zwischen **-85°C und -65°C** zu lagern.
- Die optimale Lagertemperatur für DNA-Kontrollen beträgt 2°C bis 8°C, DNA kann jedoch auch bei Temperaturen von -85°C bis -65°C gelagert werden.
- Alle Reagenzien und Kontrollen müssen vor der Verwendung aufgetaut und vortexiert oder gründlich gemischt werden, um sicherzustellen, dass sie vollständig resuspendiert wurden.
- Aufgrund ihrer hohen Salzkonzentrationen sind PCR-Master-Mixe empfindlich gegenüber Einfrier- und Auftauzyklen. Sie dürfen höchstens viermal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

Sollten Sie Fragen haben, wenden Sie sich an die technischen Mitarbeiter von Invivoscribe. Wir unterstützen Sie gerne dabei, die optimalen Lagerbedingungen zu bestimmen.

## 5. Instrumente

Die nachfolgend aufgelisteten spezifischen Instrumente werden basierend auf den Methoden empfohlen, die zur Validierung dieses Assays verwendet werden.

### 5.1. Thermocycler

- Zweck oder Funktion: Amplifikation von DNA-Proben
- Empfohlenes Instrument: Veriti™ Dx Thermal Cycler (Thermocycler) oder ein vergleichbares Gerät
- Leistungseigenschaften und Spezifikationen:
  - Temperierbereich: 15 °C bis 96 °C
  - Mindestheizrate: 0,8 °C/s
- Befolgen Sie die Installations-, Betriebs-, Kalibrierungs- und Wartungsanweisungen des Herstellers.
- Angaben zum Thermocyclerprogramm finden Sie in Abschnitt 7.4 *Amplifikation*.

### 5.2. Magnetstand

- Zweck oder Funktion: Aufreinigung von PCR-Produkten
- Empfohlenes Instrument:
  - Ambion Magnetic Stand (Magnetstand) 96\* (REF AM10027)
  - Agencourt SPRIPlate® 96 Ring Super Magnet Plate (Ring-Super-Magnetplatte)\* (REF A32782) oder
  - Thermo Fisher Scientific DynaMag™-96 Side Skirted Magnet (Magnet mit Seitenumrandung)\* (REF 12027) oder ein vergleichbares Gerät
- Leistungseigenschaften und Spezifikationen:
  - Fällung paramagnetischer Partikel
- Angaben zu den Verfahren zur Aufreinigung von PCR-Produkten finden Sie in Abschnitt 7.5 *AMPure XP-Aufreinigung*.

### 5.3. Real-Time PCR-Instrument

- Zweck oder Funktion: Quantifizieren aufgereinigter PCR-Produkte
- Empfohlenes Instrument: Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR- (schnelles Dx Echtzeit) Instrument oder ein vergleichbares Gerät
- Leistungseigenschaften und Spezifikationen:
  - Detektion SYBR Green Wellenlänge
- Befolgen Sie die Installations-, Betriebs-, Kalibrierungs- und Wartungsanweisungen des Herstellers.
- Angaben zum Real-Time PCR-Programm finden Sie in Abschnitt 7.6 *Quantifizierung von Amplikons*

### 5.4. Illumina MiSeq Instrument\*

- Zweck oder Funktion: Sequenzierung der normalisierten DNA-Bibliothek
- Leistungseigenschaften und Spezifikationen:
  - Kompatibel mit MiSeq Reagenzkit v2\*
  - Kompatibel mit MiSeq Reagenzkit v3\* beim Multiplexing
- Befolgen Sie die Installations-, Betriebs-, Kalibrierungs- und Wartungsanweisungen des Herstellers.
- Siehe Abschnitt 7.11 *Laden der MiSeq Flow Cell* (Flusszelle), 7.12 *Setup für MiSeq Sample Sheet* (Probenblatt) und 7.13 *Starten eines MiSeq-Laufs*, für MiSeq-Parameter.

\* Warnung: Diese Produkte tragen keine CE-Kennzeichnung.

## 6. Gewinnung und Aufbereitung von Proben

### 6.1. Vorsichtsmaßnahmen

Biologische Proben von Menschen können potenziell infektiöse Stoffe enthalten. Sämtliche Proben sind in Einklang mit Ihren institutsinternen Vorschriften für blutübertragbare Krankheitserreger bzw. gemäß biologischer Schutzstufe 2 zu handhaben.

### 6.2. Störsubstanzen

Folgende Substanzen stören bekanntermaßen die PCR:

- Zweiwertige Kationenchelatoren
- Low-Retention-Pipettenspitzen
- EDTA (in geringen Konzentrationen zu vernachlässigen)
- Heparin

### 6.3. Probenanforderung und -handhabung

- Die Mindestmenge beträgt 50 ng hochwertige DNA (5 µl DNA-Probe bei einer Mindestkonzentration von 10 ng/µl).
- Dieser Assay untersucht extrahierte und aufgereinigte genomische DNA. Die DNA muss mit einem für Doppelstrang-DNA (dsDNA) geeigneten Verfahren quantifiziert werden und darf keine PCR-Inhibitoren enthalten.
- DNA in einer geeigneten Lösung wie 0,1X TE-Puffer (1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH-Wert 8,0, hergestellt mit Wasser in Molekularbiologie-Qualität), oder nur in Wasser in Molekularbiologie-Qualität resuspendieren.

### 6.4. Probenlagerung

Proben sind auf eine Weise zu lagern, die einen Abbau der DNA verhindert.

## 7. Assay-Verfahren

### 7.1. Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Angaben zu den im Lieferumfang enthaltenen Materialien finden Sie in Tabelle 2.

### 7.2. Erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien

**Tabelle 3.** Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Reagenz/Material	Erforderliche oder empfohlene Reagenzien/Hersteller	Katalognummer	Anmerkungen
DNA-Polymerase	Roche: <ul style="list-style-type: none"> <li>EagleTaq™ DNA Polymerase (DNA-Polymerase)</li> </ul> oder Invivoscribe: <ul style="list-style-type: none"> <li>FalconTaq DNA Polymerase (DNA-Polymerase)</li> </ul> oder ein vergleichbares Gerät	05206944190  oder 60970130	5 U/μL
Wasser in Molekularbiologie-Qualität	Keine Angabe	Keine Angabe	Ohne DNase/RNase
Kalibrierte Pipetten	Keine Angabe	Keine Angabe	Muss für die genaue Messung von Volumina zwischen 0,2 μL und 1000 μL geeignet sein.
PCR-Platten oder -Röhrchen	Keine Angabe	Keine Angabe	Ohne DNase/RNase/PCR-Hemmer
Pipettenspitzen mit Filter	Keine Angabe	Keine Angabe	Steril, ohne RNase/DNase/Pyrogene
Mikrozentrifugengefäße	Keine Angabe	Keine Angabe	Steril
PCR-Aufreinigungskit	Beckman Coulter, Inc: <ul style="list-style-type: none"> <li>Agencourt AMPure XP</li> </ul>	A63880	Keine Angabe
PCR-Aufreinigung	Thermo Fisher Scientific: <ul style="list-style-type: none"> <li>Ambion Magnetic Stand (Magnetstand) 96</li> <li>DynaMag-96 Side Skirted Magnet (Magnet mit Seitenumrandung)</li> </ul> oder Beckman Coulter: <ul style="list-style-type: none"> <li>Agencourt SPRI Plate, 96 Ring Super Magnet Plate (Ring-Super-Magnetplatte)</li> </ul> oder ein vergleichbares Gerät	AM10027 12027  oder  A32782	Keine Angabe
Amplikon- und Bibliotheksquantifizierung	KAPA Biosystems: <ul style="list-style-type: none"> <li>KAPA Library Quantification Kit (Bibliotheksquantifizierungskit) – Illumina</li> </ul>	KK4824	Keine Angabe
MiSeq-Lauf	Illumina: <ul style="list-style-type: none"> <li>MiSeq Reagent v2 kit (Reagenzkit v2) (500 Zyklen)</li> </ul> oder <ul style="list-style-type: none"> <li>v3 kit (v3-Kit) (600 Zyklen) bei Multiplexing</li> </ul>	MS-102-2003 oder MS-102-3003	Standard-Flow-Cell
MiSeq-Software	<ul style="list-style-type: none"> <li>MiSeq Control Software (Kontrollsoftware) v2.6 oder neuere</li> <li>Local Run Manager v2.0 oder neuere</li> </ul>	Keine Angabe	Keine Angabe
Verdünnungspuffer A	Keine Angabe	Keine Angabe	10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, vorbereiten + 0,05 % Tween-20-Lösung

### 7.3. Vorbereitung der Reagenzien

Damit gewährleistet ist, dass die DNA-Proben keine PCR-Inhibitoren enthalten und in ausreichend hoher Qualität und Menge vorliegen, um gültige Testergebnisse erzeugen zu können, können diese mit dem Specimen Control Size Ladder Master Mix (Master Mix Probengröße-Kontrollskala) von Invivoscribe überprüft werden ([REF](#) 20960021 für ABI-Nachweis oder [REF](#) 20960020 für Gel-Nachweis). Der Specimen Control Size Ladder (Probengröße-Kontrollskala) Mix zielt auf mehrere Gene ab und erzeugt eine Reihe von Amplikons mit einer Länge von ca. 100, 200, 300, 400 und 600 bp; Die Größe kann aufgrund von Größenstandards und/oder Instrumentenunterschieden um +/- 5 bp variieren. Die Überprüfung der DNA-Integrität ist besonders wichtig für anspruchsvolle Proben, z.B. FFPE-Gewebe zählt.

**Immer die Positiv- und Negativkontrollen verwenden**, um zu gewährleisten, dass der Assay sachgemäß durchgeführt wurde.

Um Kontaminationen während der PCR-Vorbereitung auszuschließen, **stets eine Nicht-Template-Kontrolle (NTC) einsetzen**.

- 7.3.1. Mit behandschuhten Händen Master-Mixe aus dem Gefrierschrank nehmen. Röhrcheninhalte langsam auftauen lassen, anschließend vorsichtig vortexen und nur kurz zentrifugieren.
- 7.3.2. Unter einer Sicherheitshaube oder in einer „Dead-Air-Box“ 45 µL aus jedem Master-Mix-Röhrchen in eine saubere PCR-Platte pipettieren (ein Well für jeden Master-Mix und ein Master-Mix pro Probe).
  - In jedem Lauf müssen zwei Kontrollen (eine positive und eine negative) sowie ein NTC enthalten sein.
  - Für die NTC statt DNA Wasser in Molekularbiologie-Qualität als Matrize verwenden.
- 7.3.3. Geben Sie 0,2 µL Taq-DNA-Polymerase (bei 5 U/µL) in jedes Well, das aliquotierte Master-Mixe enthält.
- 7.3.4. Geben Sie 5 µL DNA-Probe (mit einer Mindestkonzentration von 10 ng/l), Kontroll-DNA oder Wasser in Molekularbiologie-Qualität (NTC) in die einzelnen Wells, die die entsprechenden Master-Mixe enthalten.
  - Zum Mischen 5- bis 10-mal auf- und abpipettieren.
  - Platte verschließen und zum PCR-Thermocycler bringen.

**Tabelle 4.** Reaktions-Setup

Reagenz	Volumen
Master-Mix	45,0 µL
Taq-DNA-Polymerase	0,2 µL
Proben- oder Kontroll-DNA	5,0 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50,2 µL</b>

### 7.4. Amplifikation

- 7.4.1. Proben mit dem PCR-Programm aus Tabelle 5 amplifizieren.

Beim Multiplexing mehrerer Ziele ist für andere Bedingungen im Zusammenhang mit dem LymphoTrack Dx Assay – MiSeq Thermocycler auf Anhang A (Abschnitt 20) Bezug zu nehmen.

**Tabelle 5.** PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
1	95 °C	7 Minuten	1
2	95 °C	45 Sekunden	29x
3	60 °C	45 Sekunden	
4	72 °C	90 Sekunden	
5	72 °C	10 Minuten	1
6	15 °C	∞	1

**Hinweis:** Den erwärmten Deckel auf 105 °C und das Reaktionsvolumen auf 50 µL einstellen

- 7.4.2. Sobald das Amplifikationsprogramm abgeschlossen ist, nehmen Sie die amplifizierte PCR-Platte aus dem Thermocycler. Werden die folgenden Schritte nicht unmittelbar im Anschluss ausgeführt, lagern Sie die PCR-Produkte 1 Tag bei 4 °C.

## 7.5. AMPure XP-Aufreinigung

Die Aufreinigung der PCR-Produkte aus den Proben, positiven, negativen und Nicht-Template-Kontrollen wurden während der Validierung des Assays mit dem Agencourt AMPure XP PCR Purification System durchgeführt.

### Vorbereitung:

- 7.5.1. Nehmen Sie das AMPure XP-Reagenz aus der Lagerung und warten Sie vor dem Gebrauch, bis es sich an die Raumtemperatur angepasst hat. Die Agencourt AMPure XP-Flasche leicht schütteln, um etwaige abgesetzte Magnetpartikel zu resuspendieren.

Beim Multiplexing mehrerer Ziele ist bezüglich AMPure XP-Reagenzvolumen, die in anderen LymphoTrack Dx Assay – MiSeq PCR-Produkten verwendet werden, auf Anhang A (Abschnitt 20) Bezug zu nehmen.

- 7.5.2. Geben Sie die für die Platte erforderliche Menge Agencourt AMPure XP-Reagenz in ein neues 2-mL-Röhrchen, um eine Kontamination durch Pipettenspitzen zu vermeiden.
- Das erforderliche Volumen des Agencourt AMPure XP-Reagenz =  $n \times 50 \mu\text{L}$  (wobei n der Anzahl der aufzureinigenden Proben entspricht).
- 7.5.3. Bereiten Sie eine frische Stammlösung (0,5 mL für jede Probe, die aufgereinigt werden soll) aus 80 % Ethanol mit sterilem Wasser zu.

### Bindung der Amplikons an die Magnetpartikel:

- 7.5.4. Geben Sie **50  $\mu\text{L}$**  des aliquotierten und auf **Zimmertemperatur** gebrachten Agencourt AMPure XP-Reagenz zu jeder Probe, die aufgereinigt werden soll.
- Proben und Reagenz durch 10-maliges Auf- und Abpipettieren mischen.
  - Die Farbe der Mischung sollte nach diesem Vorgang gleichmäßig sein.
  - Zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- 7.5.5. Die gemischten Proben auf einem DynaMag-96 Side Skirted (Magnet mit Seitenumrandung) oder Ambion Magnetic Stand (Magnetstand) 96 platzieren und 5 Minuten bei Zimmertemperatur inkubieren, damit sich die Magnetpartikel aus der Lösung ausfällen können.
- Die Platte während dieses Vorgangs auf dem Magnetstand belassen, bis Sie mit Schritt 7.5.10 unten fortfahren.
- 7.5.6. Mit einer auf 95  $\mu\text{L}$  eingestellten P200-Pipette (oder einer vergleichbaren Mehrkanalpipette) den klaren Überstand absaugen und entsorgen.
- Mit einer auf 10  $\mu\text{L}$  eingestellten P10-Pipette (oder einer gleichwertigen Mehrkanalpipette) überschüssigen Überstand absaugen.
  - Vermeiden Sie, Magnetpartikel zu entfernen.

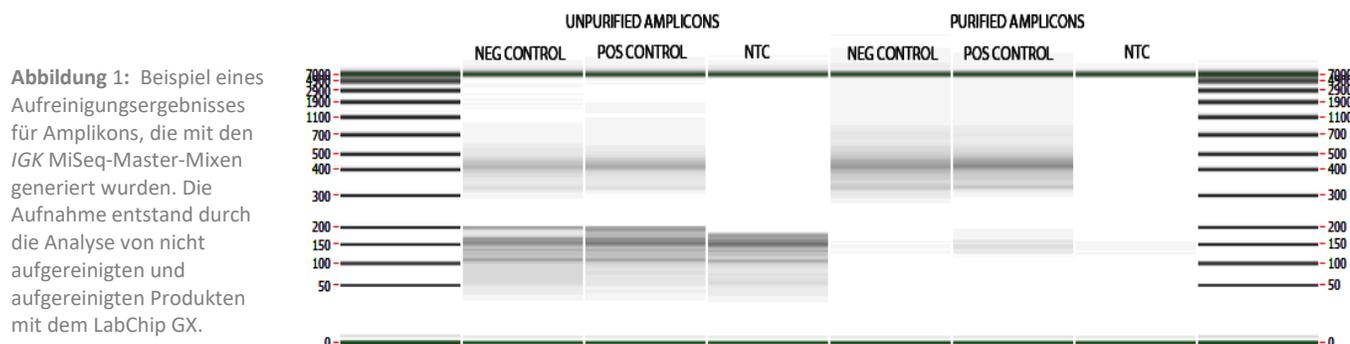
### Waschen:

- 7.5.7. Während die Platte auf dem Magnetstand belassen wird, 200  $\mu\text{L}$  einer 80-prozentigen EthanolLösung zu jeder Probe hinzugeben. Dreißig Sekunden bei Raumtemperatur inkubieren.
- Mit einer auf 195  $\mu\text{L}$  eingestellten P200-Pipette (oder einer gleichwertigen Mehrkanalpipette) das Ethanol absaugen und entsorgen.
  - Mit einer auf 10  $\mu\text{L}$  eingestellten P10-Pipette (oder einer Mehrkanalpipette) überschüssigen Ethanol absaugen.
  - Vermeiden Sie, Magnetpartikel zu entfernen.
- 7.5.8. Für insgesamt zwei Waschgänge den Schritt 7.5.7 wiederholen.
- 7.5.9. Die Magnetpartikel 5 Minuten an der Luft trocknen lassen, die Platte verbleibt dabei auf dem Magnetstand.

**Elution:**

- 7.5.10. Nehmen Sie die Platte vom Magnetstand. Geben Sie 25  $\mu\text{L}$  Puffer (10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0) hinzu.
- Pipettieren Sie die Mischung auf und ab, bis sie homogen ist.
  - Stellen Sie sicher, dass sich alle Magnetpartikel in Lösung befinden.
- 7.5.11. Zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- 7.5.12. Stellen Sie die Platte 5 Minuten (oder so lange, bis der Überstand klar ist) auf den Magnetstand.
- 7.5.13. Überführen Sie 22  $\mu\text{L}$  des Eluats auf eine frische Platte. Diese mit Cap Strips verschließen. Beschriften Sie die Platte und zentrifugieren Sie sie kurz, um sicherzustellen, dass sich der Überstand vollständig am Boden des Wells absetzt. Bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern oder mit dem nächsten Schritt fortfahren.

Das Gelbild in Abbildung 1 zeigt die Effizienz einer typischen Aufreinigung (Amplikons vor und nach der Aufreinigung).

**7.6. Quantifizierung von Amplikons**

Die folgenden Schritte wurden während der Assay-Validierung durchgeführt, um aufgereinigte PCR-Amplikons von Proben sowie von Positiv-, Negativ- und Nicht-Template-Kontrollen mit dem KAPA Library Quantification Kit (Bibliotheksquantifizierungskit) (KAPA Biosystems) zu quantifizieren.

**7.6.1. Verdünnung der Amplikons**

Der Verdünnungspuffer A unten entspricht 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0 + 0,05 % Tween-20

Ziele 1:4.000:

**Schritt A:** 2  $\mu\text{L}$  aufgereinigtes Amplikon-Eluat + 198  $\mu\text{L}$  Verdünnungspuffer A.  
Zehnmal auf- und abpipettieren, um gründlich zu mischen.

**Schritt B:** 5  $\mu\text{L}$  von Schritt A + 195  $\mu\text{L}$  Verdünnungspuffer A.  
Zehnmal auf- und abpipettieren, um gründlich zu mischen.

- 7.6.2. Führen Sie gemäß Tabelle 6 einen qPCR-Lauf für die Amplikon-Quantifizierung jeder Reaktion durch (weitere Anweisungen finden Sie im Handbuch für das KAPA Library Quantification Kit (Bibliotheksquantifizierungskit)):

**Tabelle 6.** qPCR-Setup

Reagenz	Volumen
Wasser (PCR-grade)	3,6 $\mu\text{L}$
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix mit Primer-Premix	12,0 $\mu\text{L}$
ROX	0,4 $\mu\text{L}$
Verdünnte Amplikons oder Standard (1–6)	4,0 $\mu\text{L}$
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,0 <math>\mu\text{L}</math></b>

- 7.6.3. Angaben zum Thermocyclerprogramm für die qPCR finden Sie in Tabelle 7.

Tabelle 7. qPCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
1	95 °C	5 Minuten	1
2	95 °C	30 Sekunden	35x
	60 °C	<b>45 Sekunden (Plattenanalyse)</b>	

- 7.6.4. Nutzen Sie die Daten des qPCR-Laufs, um auf Kontaminationen zu prüfen. Berechnen Sie dazu mittels der folgenden Gleichung die  $\Delta C_t$ -Werte aus Kontrollen (positiv und negativ) und der NTC:

$$\Delta C_t = C_t (\text{NTC}) - C_t (\text{Kontrolle})$$

Beträgt der  $\Delta C_t$ -Wert für beide Kontrollen  $\geq 4,0$ , können Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren. Beträgt der  $\Delta C_t$ -Wert für eine Kontrolle  $< 4,0$ , siehe Abschnitt 14 *Fehlersuche und -behebung* für weitere Anweisungen.

Beim Multiplexing mehrerer Ziele ist bezüglich des qualifizierenden  $\Delta C_t$ -Wertes für andere LymphoTrack Dx Assay – MiSeq PCR-Produkte auf Anhang A (Abschnitt 20) Bezug zu nehmen.

- 7.6.5. Verwenden Sie die Daten des qPCR-Laufs, um mittels folgender Gleichung die Amplikonkonzentrationen für jede Probe zu bestimmen.

$$\text{Konzentration unverdünntes Amplikon (nM)} = \frac{452 \times \text{Durchschn. Konz. (pM) Berechnet durch qPCR}}{A} \times 4$$

Die durchschnittliche Fragmentlänge (bp) für den KAPA Illumina DNA Standard (DNA-Standard) beträgt 452.

A = Die durchschnittliche Fragmentlänge der mit dem *IGK*-Assay generierten Amplikons = 410 bp. (**A = 410**). Die Sequenzlänge umfasst weitere Nukleotide, die für die Sequenzierung erforderlich sind.

**Hinweis:** Beim Multiplexing mehrerer Ziele ist bezüglich der durchschnittlichen Fragmentlänge der für andere für LymphoTrack Dx Assays – MiSeq generierte Amplikons auf Anhang A (Abschnitt 20) Bezug zu nehmen.

## 7.7. Pooling und Quantifizierung der Bibliothek

Die Menge der in die MiSeq Flow Cell (Flusszelle) geladenen Bibliotheks-DNA ist entscheidend für eine optimale Cluster-Dichte in der Flusszelle und somit für die Erzeugung qualitativ hochwertiger Daten in einem Sequenzierungslauf. **Die Quantifizierung der Bibliothek durch qPCR wird dringend empfohlen.**

- 7.7.1. Geben Sie ausgehend von der von den qPCR-Ergebnissen berechneten Amplikonkonzentration eine gleichgroße Menge Amplikons (mit Ausnahme der NTC, die vernachlässigt werden kann) hinzu.
- z. B. jedes Amplikon auf 4 nM in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{L}$  verdünnen und Verdünnungspuffer A als Verdünnungsmittel verwenden. 10  $\mu\text{L}$  von jedem 4-nM-Amplikon kombinieren.
  - Bei Proben mit einer Konzentration von  $< 4$  nM wird die höchstmögliche Menge Probe hinzugefügt (10  $\mu\text{L}$ ). Geben Sie zu diesen Proben keinen Verdünnungspuffer A.
- 7.7.2. Rörcheninhalte vorsichtig vortexen und anschließend kurz zentrifugieren.

## 7.8. Verdünnung der gepoolten Bibliothek

Ziel 1:1.000:

- Schritt A:** 2  $\mu\text{L}$  der gepoolten Bibliothek + 198  $\mu\text{L}$  Verdünnungspuffer A.  
Zehnmal auf- und abpipettieren, um gründlich zu mischen.
- Schritt B:** 20  $\mu\text{L}$  aus Schritt A + 180  $\mu\text{L}$  Verdünnungspuffer A.  
Zehnmal auf- und abpipettieren, um gründlich zu mischen.

## 7.9. qPCR-Setup für die Bibliotheksquantifizierung

Angaben zum qPCR-Setup finden Sie in Tabelle 6, Angaben zum Thermocycler-Programm in Tabelle 7.

7.9.1. Bestimmen Sie die Konzentration der gepoolten Bibliothek anhand der qPCR-Ergebnisse.

$$\text{Konzentration von unverdünntem Amplikon (nM)} = \frac{452 \times \text{Durchschn. Konz. (pM)}}{A} \text{ Berechnet durch qPCR}$$

Die durchschnittliche Fragmentlänge (bp) für den KAPA Illumina DNA Standard (DNA-Standard) beträgt 452.

A = Die durchschnittliche Fragmentlänge der mit dem *IGK*-Assay generierten Amplikons = 410 bp. (**A = 410**).  
Die Sequenzlänge umfasst weitere Nukleotide, die für die Sequenzierung erforderlich sind.

**Hinweis:** Beim Multiplexing mehrerer Ziele ist bezüglich der durchschnittlichen Fragmentlänge der für andere für LymphoTrack Dx Assays – MiSeq generierte Amplikons auf Anhang A (Abschnitt 20) Bezug zu nehmen.

## 7.10. Vorbereitung der Bibliothek auf den MiSeq-Sequenzierungslauf

Am Ende dieses Abschnitts beträgt die Konzentration der DNA-Bibliothek **8 pM für das MiSeq Reagenzkit v2** und **20 pM für das MiSeq-Reagenzkit v3** beim Multiplexing. Angaben zum Multiplexing von Amplikons aus verschiedenen LymphoTrack Dx Assays für MiSeq in einer einzigen Bibliothek finden Sie in Anhang A.

- 7.10.1. Bestimmen Sie die Konzentration der zu bearbeitenden Bibliothek ausgehend von der Konzentration der gepoolten Bibliothek der qPCR-Ergebnisse und verdünnen Sie sie, falls erforderlich:
- Sollte die Bibliothek eine Konzentration von mehr als 4 nM aufweisen, muss sie mit Verdünnungspuffer A auf 4 nM in einem Zielvolumen von 10 µL verdünnt werden.
  - Wenn die Konzentration der Bibliothek weniger als 4 nM beträgt, verwenden Sie für den nächsten Schritt 10 µL direkt aus der Bibliothek.
- 7.10.2. Gehen Sie zur Denaturierung der DNA-Bibliothek wie folgt vor.
- Bereiten Sie eine frische 0,2 N NaOH Lösung zu. Für die vollständige Denaturierung der DNA und eine optimale Cluster-Erzeugung auf dem MiSeq ist eine frische Lösung unerlässlich.
  - Geben Sie 10 µL der 0,2 N NaOH Lösung zur verdünnten Bibliothek (10 µL), die im vorherigen Schritt hergestellt wurde.

**Tabelle 8.** Denaturierung der Bibliothek

Reagenz	Volumen
Verdünnte Bibliothek	10 µL
0,2 N NaOH	10 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µL</b>

- 7.10.3. Zum Mischen der Lösung kurz vortexen und anschließend kurz zentrifugieren, um sicherzustellen, dass sich die Lösung am Boden des Röhrchens absetzt. Fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, um die dsDNA-Bibliothek in einzelsträngige DNA (ssDNA) zu denaturieren.
- 7.10.4. Geben Sie 980 µL vorgekühlten HT1-Puffer (in MiSeq-Reagenz-Kits enthalten) in das Röhrchen, das die denaturierte DNA-Bibliothek enthält.

**Tabelle 9.** Hinzugabe des HT1-Puffers

Reagenz	Volumen
Denaturierte Bibliothek	20 µL
HT1-Puffer	980 µL
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>1000 µL</b>

- 7.10.5. Zum Mischen kurz vortexen, dann verdünnte und denaturierte DNA-Bibliothekslösung pulszentrifugieren.
- 7.10.6. Verdünnte und denaturierte DNA-Bibliothekslösung anschließend auf Eis legen, bis Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren können.
- 7.10.7. Nehmen Sie die verdünnte ssDNA-Bibliothek vom Eis und folgen Sie den nächsten Schritten, um die Bibliothek für die Beladung des MiSeq-Geräts weiter zu verdünnen:

Beim Multiplexing mehrerer Ziele ist bezüglich Beladungskonzentration und MiSeq-Reagenzkit auf Anhang A (Abschnitt 20) Bezug zu nehmen.

**Für die MiSeq Control Software (Kontrollsoftware) (MCS v2.6 oder neuer):**

Die Konzentration der DNA-Bibliothek für das MiSeq-Reagenzkit v2 beträgt **8 pM**.

Beim Multiplexing beträgt die Konzentration der DNA-Bibliothek **20 pM** für das MiSeq-Reagenzkit v3.

- Sollte die Konzentration der verdünnten ssDNA-Bibliothek 40 pM betragen (die ursprüngliche Konzentration betrug 4 nM), verdünnen Sie sie wie folgt, bis die gewünschte MiSeq-Beladungskonzentration erreicht ist:

**Tabelle 10.** Vorbereitung der Bibliothek für die Beladung des MiSeq-Geräts

Zielkonzentrationen	8 pM
Denaturierte Bibliothek	200 µL
HT1-Puffer	800 µL
NaOH-Zielkonzentration (mM)	0,40 mM

- Sollte die Konzentration der verdünnten ssDNA-Bibliothek weniger als 40 pM betragen (die ursprüngliche Konzentration betrug weniger als 4 nM), verdünnen Sie die denaturierte DNA, bis die erforderliche Konzentration für den MiSeq (z. B. 8 pM) erreicht ist.
  - Stellen Sie sicher, dass die endgültige NaOH-Konzentration nicht mehr als 1,0 mM beträgt.
- 7.10.8. Die fertige Bibliothek 5-mal zum Mischen umkehren und dann pulsentrifugieren.
- 7.10.9. Legen Sie die fertig aufbereitete Bibliothek auf Eis, bis sie in die MiSeq Reagent Cartridge (Reagenzkartusche) eingelegt wird.

#### 7.11. Laden der MiSeq Flow Cell (Flusszelle)

Geben Sie 600 µL der fertig präparierten Bibliothek in eine MiSeq Reagent Cartridge.

#### 7.12. Setup für MiSeq Sample Sheet (Probenblatt)

Informationen zur Erstellung von Musterblättern finden Sie in der neuesten Illumina-Dokumentation. Laden Sie das Probenblatt auf das MiSeq-Gerät hoch. Wenn Sie Software verwenden, die mit Illumina assoziiert ist (z. B. Local Run Manager [LRM]), wählen Sie *TruSeq Nano DNA (Nano-DNA)* für das Library Prep Kit (Kit für die Bibliotheksvorbereitung) und *TruSeq DNA Single Indexes Set A B (DNA-Einzelindizes Satz A B)* für das Index Kit (Index-Kit) aus.

##### Zeichen im Probennamen:

- Erstellen Sie bei der Benennung jeder Probe einen eindeutigen Namen und eine eindeutige Kennung. Wenn Sie Probeduplikate analysieren, kann ein ähnlicher Name verwendet werden (z. B. Probe1a und Probe1b).
- Wenn mehrere Proben, die gemeinsam in der gleichen Flusszelle verarbeitet werden, nicht über eindeutige Namen verfügen, wird nur eine Probe während des Analyseverfahrens von der LymphoTrack Dx Software – MiSeq analysiert.
- Verwenden Sie bei der Vorbereitung des Probenblatts nur alphanumerische Zeichen und Bindestriche (A-Z, a-z, 0-9, ., -) dass Sie bei Erstellung des Sample-Sheets.

##### Probenbenennung beim Multiplexing:

Jeder Index kann im Sample Sheet (Probenblatt) nur einmal genannt werden. Somit müssen alle Nachverfolgungsdaten von Proben, die mit mehreren Zielen und unter dem gleichen Index sequenziert werden, im gleichen Feld „Sample-ID“ (Proben-ID) genannt werden (was in den FASTQ-Dateinamen übernommen wird).

Verfolgen Sie alle Proben und Ziele, die während eines MiSeq-Laufs unter dem gleichen Index sequenziert werden. Dieser Satz Proben/Ziele sollte eine eindeutige Kennzeichnung erhalten, die im Feld „Sample ID“ (Proben-ID) im Probenblatt zu verzeichnen ist. Beachten Sie bei der Festlegung einer Namenskonvention, dass die Sample-ID (Proben-ID) auf **40 Zeichen beschränkt** ist.



Das Feld *Sample Name (Probenname)* im *Sample Sheet (Probenblatt)* wird standardmäßig anstelle der *Sample ID (Proben-ID)* in den FASTQ-Dateinamen aufgenommen, wenn das Feld ausgefüllt wird. Lassen Sie das Feld leer oder kopieren Sie die für die *Sample ID (Proben-ID)* eingegebenen Daten in dieses Feld. Werden Alternativdaten in das Feld für *Sample Name (Probenname)* eingegeben, stellen Sie sicher, dass eine eindeutige Kennzeichnung vorhanden ist und der Name den oben aufgeführten Empfehlungen für die Nachverfolgung von Proben entspricht.

**Achtung!**

Adaptersequenzen werden von der LymphoTrack Dx Software – MiSeq nicht erkannt.

- Wenn Sie mit Illumina verbundene Software verwenden (z. B. Local Run Manager [LRM]), bei der Erstellung des Probenblatts muss Adapter trimming (Adapter-Trimming) aktiviert sein.

**Tabelle 11.** Indizes, die mit LymphoTrack Dx Assay-Mastermischungen verwendet werden

LymphoTrack Dx Assay – MiSeq PCR Master Mix Index	Indexsequenz	TruSeq DNA Single Indexes Set A B (DNA-Einzelindizes Satz A B) (LRM „Index Kit“ [Index-Kit])
id01	ATCACG	AR001
id02	CGATGT	AR002
id03	TTAGGC	AR003
id04	TGACCA	AR004
id05	ACAGTG	AR005
id06	GCCAAT	AR006
id07	CAGATC	AR007
id08	ACTTGA	AR008
id09	GATCAG	AR009
id10	TAGCTT	AR010
id11	GGCTAC	AR011
id12	CTTGTA	AR012
id13	AGTCAA	AR013
id14	AGTTCC	AR014
id15	ATGTCA	AR015
id16	CCGTCC	AR016
id18	GTCCGC	AR018
id19	GTGAAA	AR019
id20	GTGGCC	AR020
id21	GTTTCG	AR021
id22	CGTACG	AR022
id23	GAGTGG	AR023
id25	ACTGAT	AR025
id27	ATTCCT	AR027

### 7.13. MiSeq-Lauf starten

Starten Sie den MiSeq-Lauf, indem Sie den Anweisungen der MiSeq Control Software (Kontrollsoftware) folgen. Die ungefähren MiSeq-Laufzeiten sind in Tabelle 12 angegeben.

**Tabelle 12.** MiSeq-Laufzeiten

MiSeq-Reagenz-Kit	Lese-Länge	MCS-Version	MiSeq-Gesamtlaufzeit
v2	2 x 251 bp	v2.6 oder neuer	ca. 39 Stunden
v3	2 x 301 bp	v2.6 oder neuer	ca. 56 Stunden

**Hinweis:** Wenn ein Kit mit weniger Zyklen verwendet wird, reicht das nicht aus, um die für diesen Assay erforderlichen Lese-Längen zu generieren.

## 8. Datenanalyse

Der LymphoTrack Dx *IGK* Assay – MiSeq wurde für die Erstellung von Sequenzierungsdaten entwickelt, die mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq analysiert werden können. Die Software befindet sich auf der zugehörigen CD (REF 95000009), die im Lieferumfang enthalten ist. Diese CD enthält detaillierte Anweisungen zur Installation und Verwendung der Software.

## 9. Erwartete Werte

Die von der Software generierten Berechnungswerte werden für die Ermittlung des Assay-Ergebnisses auf das nächste Zehntel gerundet.

- IGK Positivkontrolle, häufigste Lesevorgänge in %  $\geq 5,0$  %
- NGS Negativkontrolle, häufigste Lesevorgänge in %  $< 3,0$  %
- Validität des MiSeq-Laufs\*:
  - % Q30  $> 75$  % für v2 (2x251)
  - % Q30  $> 70$  % für v3 (2x301)

**\*Hinweis:** Q30 aller analytischen Validierungen erfüllt die oben genannten Kriterien der Spezifikation für Illumina MiSeq Q30. Der Q30-Wert kann jedoch abhängig von der Probenqualität variieren. Sollte der Q30-Wert unter dem Spezifikationswert für Illumina Q30 liegen, prüfen Sie den Index-Q30-Wert des LymphoTrack Dx Berichts nach der Datenanalyse mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq. Sollte ein Index-Q30-Wert des LymphoTrack Dx Berichts die Illumina-Spezifikation ebenfalls nicht erfüllen, ist anzunehmen, dass der Index ungültig ist.

MiSeq v2 Chemie wurde für diesen Einzelziel-Assay validiert. MiSeq v3 Chemie wurde für das Multiplexing von Assays validiert.

## 10. Verfahrenseinschränkungen

- Dieser Assay identifiziert nicht 100 % der klonalen Zellpopulationen.
- Die meisten Technologien weisen an oder in der Nähe der analytischen Nachweisgrenze (LOD) ein höheres Varianzlevel auf. Dies gilt auch für das Next-Generation Sequencing. Liegt ein Ergebnis in der Nähe der analytischen Nachweisgrenze (LOD) eines Assays, werden Folgetests empfohlen.
- PCR-basierte Assays werden vom Abbau der DNA oder der Hemmung der PCR-Amplifikation durch Heparin oder andere Wirkstoffe beeinflusst, die sich in der analysierten Probe befinden könnten.
- Die Ergebnisse molekularer Klonalitätstests müssen immer unter Berücksichtigung klinischer, histologischer und immunphänotypischer Daten interpretiert werden.

## 11. Interpretation und Berichterstellung

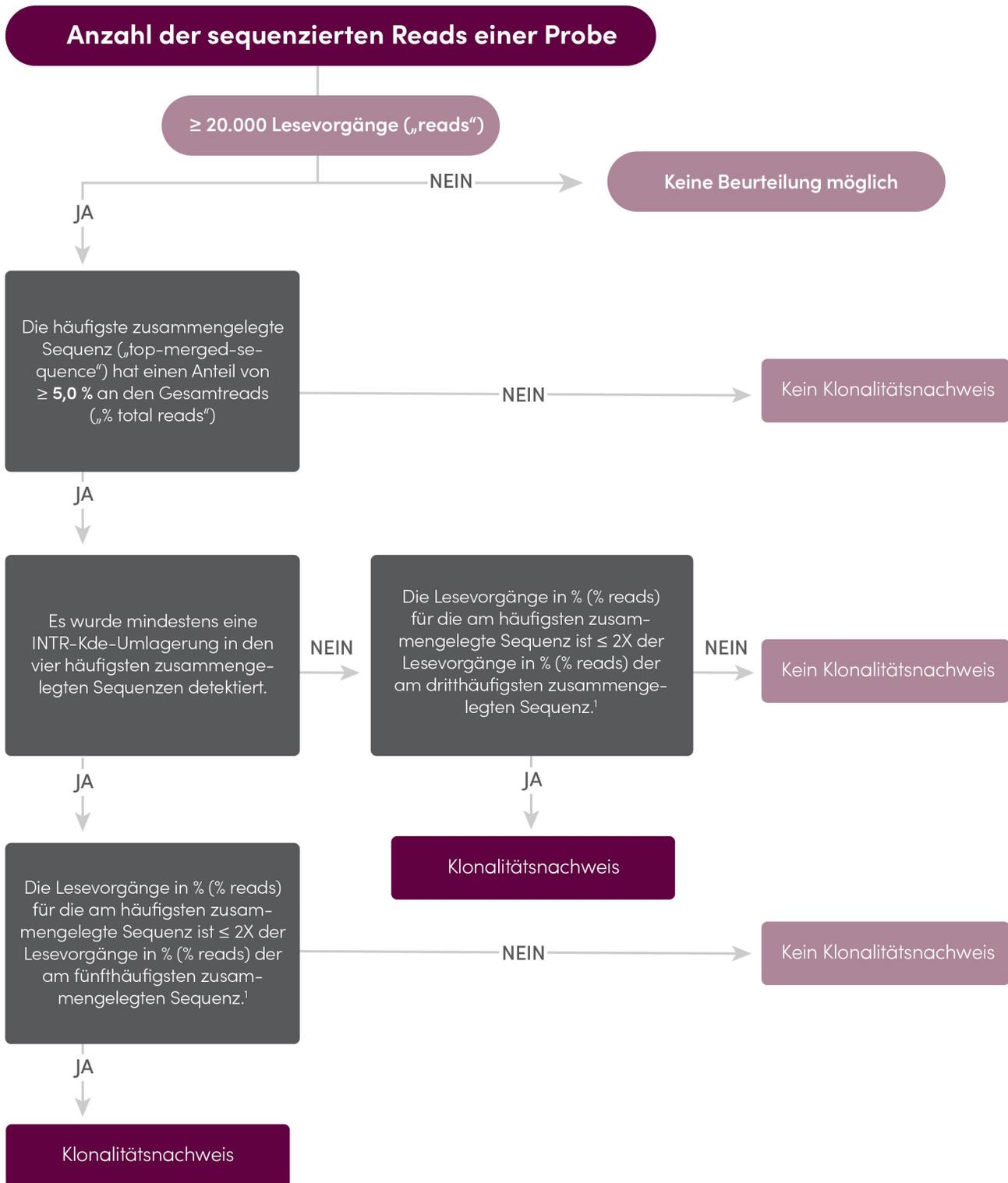
Verwenden Sie den Bericht *Merged Read Summary* (*zusammengelegte Lesevorgangszusammenfassung*), um die häufigsten zusammgelegten Lesevorgangssequenzen und deren Häufigkeit zu bestimmen, bevor anhand der unten stehenden Kriterien die Klonalität analysiert wird. Weitere Informationen zum Bericht „*Merged Read Summary*“ (*Zusammengelegte Lesevorgangszusammenfassung*) finden Sie in Abschnitt 8: „*Datenanalyse*“. Bei einigen klonalen Prozessen kann es dazu kommen, dass zwei oder mehr Klone nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind dominante Populationen mit einer kleinen, subklonalen Population oder das Vorhandensein mehrerer lymphoproliferativer Erkrankungen. Somit ist es besonders wichtig, dass solche Ergebnisse im klinischen Kontext interpretiert werden.

\* Gehen Sie bei der Interpretation einer vermutlich klonalen Sequenz mit Vorsicht vor, wenn der Wert für ein V-, D- und/oder J-Gen „none“ (keine) lautet. Der Wert „none“ wird dann zugewiesen, wenn ein Alignment den Qualitäts-Mindestwert aufgrund eines dürrtigen Alignments nicht erfüllt.

Tabelle 13. Interpretationskriterien

Kriterium 1	Kriterium 2	Kriterium 3	Ergebnis
Die Gesamtzahl der Lesevorgänge pro Probe beträgt $\geq 20.000$ .	Die häufigste zusammgelegte Sequenz hat einen Anteil von $\geq 5,0\%$ an den Gesamtlesevorgängen.	Es wurde mindestens eine INTR-Kde-Umlagerung in den vier am häufigsten zusammgelegten Sequenzen nachgewiesen und die Lesevorgänge in % für die am häufigsten zusammgelegte Sequenz beträgt $> 2X$ der Lesevorgänge in % der am fünfthäufigsten zusammgelegten Sequenz. <sup>1</sup>	Klonalitätsnachweis ERBRACHT
		Es wurde mindestens eine INTR-Kde-Umlagerung in den vier häufigsten zusammgelegten Sequenzen detektiert und die Lesevorgänge in % der häufigsten zusammgelegten Sequenz ist $\leq 2X$ der Lesevorgänge in % der am fünfthäufigsten zusammgelegten Sequenz. <sup>1</sup>	Kein Klonalitätsnachweis erbracht
		Es wurden keine INTR-Kde-Umlagerungen in den vier häufigsten zusammgelegten Sequenzen detektiert und die Lesevorgänge in % für die am häufigsten zusammgelegte Sequenz ist $> 2X$ der Lesevorgänge in % der am dritthäufigsten zusammgelegten Sequenz. <sup>1</sup>	Klonalitätsnachweis ERBRACHT
		Es wurden keine INTR-Kde-Umlagerungen in den vier häufigsten zusammgelegten Sequenzen detektiert und die Lesevorgänge in % für die am häufigsten zusammgelegte Sequenz ist $\leq 2X$ der Lesevorgänge in % der am dritthäufigsten zusammgelegten Sequenz. <sup>1</sup>	Kein Klonalitätsnachweis erbracht
Die Gesamtzahl der Lesevorgänge pro Probe beträgt $< 20.000$ .	Die häufigste zusammgelegte Sequenz hat einen Anteil von $< 5,0\%$ an den Gesamtlesevorgängen.	Keine Angabe	Kein Klonalitätsnachweis erbracht
	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Beurteilung möglich

<sup>1</sup>Die von der Software erzeugten Berechnungswerte werden für den Vergleich auf das nächste Zehntel eines Prozents gerundet.



<sup>1</sup>Die durch die Software erzeugten Berechnungswerte werden für den Vergleich auf das nächste Hundertstel eines Prozents gerundet.

Abbildung 2: Interpretation von Daten ausgehend von den Kriterien inTabelle 13.

## 12. Beispieldaten

### LymphoTrack Dx Report for assay IGK

Sample name: IGK\_positive\_S1\_L001\_001\_combined

Total Read Count: 486295

IndexQ30: 90.19

Caution: Do not edit fields and save.

#### Top 10 Merged Read Summary

Rank	Sequence	Length	Merge count	V-gene	J-gene	% total reads	Cumulative %	V-coverage	CDR3 seq
1	AGCAGGGCCACTGGCA	222	60804	IGKV3D-20_01	IGKDEL	12.50	12.50	96.95	not found
2	AGAGTATTTATAACTG	226	6103	IGKV1-5_03	IGKJ1_01	1.25	13.76	89.52	CAACAGTATCAGAGT
3	AGCAGGGCCACTGGCA	149	2289	IGKV3D-20_01	IGKJ1_01	0.47	14.23	97.71	CAGCAGTATGGTAGCT
4	AGAGCCGCGGTCTTT	235	1706	IGKINTR	IGKDEL	0.35	14.58	100.00	not found
5	AACAGGGCCACTGGC	152	1283	IGKV3-11_01	IGKJ4_01	0.26	14.84	100.00	CAGCAGCGTAGCAAC
6	AGAGCCGCGGTCTTT	236	1117	IGKINTR	IGKDEL	0.23	15.07	100.00	not found
7	ACCAGGGCCACTGGT	152	925	IGKV3-15_01	IGKJ1_01	0.19	15.26	100.00	CAGCAGTATAATAACT
8	AGAGCCGCGGTCTTT	235	880	IGKINTR	IGKDEL	0.18	15.44	100.00	not found
9	AGAGCCGCGGTCTTT	236	619	IGKINTR	IGKDEL	0.13	15.57	100.00	not found
10	AGAGCCGCGGTCTTT	236	601	IGKINTR	IGKDEL	0.12	15.70	100.00	not found

Abbildung 3: Diese Tabelle wurde mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq erstellt und zeigt die 10 häufigsten Lesevorgänge der Lesevorgangszusammenfassung, zusammgelegt mit den 500 häufigsten Lesevorgängen. Lesevorgänge werden dann zusammgelegt, wenn sich lediglich 1 oder 2 Basenpaare (bp) voneinander unterscheiden. Sequenzen wurden mit dem LymphoTrack Dx IGK Assay – MiSeq generiert und mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq (REF 95000009) analysiert.

## 13. Leistungseigenschaften

Der LymphoTrack Dx IGK Assay – MiSeq und herkömmliche Kapillarelektrophorese-Assays (IdentiClone® IGK Clonality Assay (Röhre A+B) – ABI-Nachweis, Katalognr. REF 91020021), wurden miteinander verglichen; die Übereinstimmung (prozentuale Gesamtübereinstimmung), die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) und die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) betragen 98 % (55/56 Fälle), 95 % bzw. 100 %.

Tabelle 14. Vergleich zwischen dem LymphoTrack Dx IGK Assay – MiSeq und dem IdentiClone IGK Gene Clonality Assay (Genklonalitäts-Assay) – ABI

		IdentiClone IGK Clonality-Assay – ABI	
		Klonal	Nicht klonal
LymphoTrack Dx IGK Assay – MiSeq	Klonal	19	0
	Nicht klonal	1	35

Die analytische Performance des LymphoTrack Dx IGK Assays – MiSeq wurde geprüft, indem Tonsillen-DNA mit klonaler Zelllinien-DNA gespickt und in verschiedenen Verdünnungsgraden untersucht wurde. Die Nachweisgrenze (LOD) lag bei einer DNA-Verdünnung von 5 %. Die höchsten prozentualen Lesevorgänge der Tonsillen-DNA betragen < 1,24 %. Die lineare Regression  $R^2$  betrug bei einer DNA-Verdünnung zwischen 0 und 10 % > 0,90. Der Variationskoeffizient (CV%) von acht Läufen mit zwei Anwendern, zwei Reagenzienchargen und zwei Instrumenten betrug weniger als 25 % bei der Untersuchung einer DNA-Verdünnung von 10 % und 20 %.

## 14. Fehlersuche und -behebung

**Tabelle 15.** Fehlersuche und -behebung

Tritt auf während	Fehler	Maßnahme
Vorbereitung der Proben und Reagenzien	Proben-DNA-Menge beträgt weniger als 50 ng mit einer Methode auf dsDNA-Basis	Probe nicht untersuchen
Präparation der Proben und Vorbereitung der Reagenzien	Die Integrität der DNA-Probe ist gering	Probe mit der Specimen Control Size Ladder (Probengröße-Kontrollskala) von Invivoscribe untersuchen  (REF 20960021 für ABI-Detektion oder REF 20960020 für Gel-Nachweis)
Quantifizierung der Amplikons mit dem KAPA Library Quantification Kit (Bibliotheksquantifizierungskit)	$\Delta Ct < 4,0$ $\Delta Ct = Ct (NTC) - Ct (Kontrolle)$	Standardkurve in qPCR prüfen. Auf Kontamination prüfen und KAPA-qPCR für alle Proben und Kontrollen wiederholen. Sollte erneut der Wert $\Delta Ct < 4,0$ festgestellt werden, wiederholen Sie PCR und qPCR für alle Proben und Kontrollen.
Bibliothekserstellung durch Amplikonquantifizierung und -pooling	Amplikonkonzentration beträgt weniger als 1 nM	Prüfen Sie die Standardkurve in qPCR und wiederholen Sie das PCR-Verfahren, wenn der Wert weniger als 1 nM beträgt
MiSeq-Laufvorbereitung	Probenblatt nicht gefunden	Siehe Fehlerbehebungsleitfaden von Illumina Oder rufen Sie den technischen Kundendienst von Illumina an +1-800-809-4566
	Falsch formatiertes Probenblatt	
	Strömungsprüfung fehlgeschlagen	
	Zu wenig Speicherplatz	
	Abfallbehälter leeren	
	Netzwerkverbindung abgerissen	
	RFID-Fehler	
MiSeq-Lauf	%Q30 < 75 % for v2 (2x251)* %Q30 < 70 % für v3 (2x301)*	Rufen Sie den technischen Kundendienst von Invivoscribe an +1-858-224-6600
CD-Installation	LymphoTrack Dx Software lässt sich nicht ordnungsgemäß installieren	Rufen Sie den technischen Kundendienst von Invivoscribe an +1-858-224-6600
Datenanalyse	LymphoTrack Dx Software wird plötzlich angehalten	Rufen Sie den technischen Kundendienst von Invivoscribe an +1-858-224-6600
Datenanalyse	Die positive Kontrolle erkennt keine klonale Sequenz	Rufen Sie den technischen Kundendienst von Invivoscribe an +1-858-224-6600
Nicht-Template-Kontrolle (NTC)	NTC zeigt nach PCR eine Amplifikation	Assay wiederholen

\* Q30-Wert aller analytischen Validierungen erfüllte die oben genannten Kriterien der Illumina MiSeq-Spezifikation für den Q30-Wert. Der Q30-Wert kann jedoch abhängig von der Probenqualität variieren. Sollte der Q30-Wert unter dem Spezifikationswert für Illumina Q30 liegen, prüfen Sie den Index-Q30-Wert des LymphoTrack Dx Berichts nach der Datenanalyse mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq. Sollte ein Index-Q30-Wert des LymphoTrack Dx Berichts die Illumina-Spezifikation ebenfalls nicht erfüllen, ist anzunehmen, dass der Index ungültig ist.

## 15. Technischer Support und Kundendienst

Vielen Dank, dass Sie sich für unseren LymphoTrack Dx *IGK* Assay – MiSeq entschieden haben. Wir schätzen Ihre Treue. Wir helfen Ihnen gerne, diesen Assay zu verstehen, und bieten Ihnen durchgehend von montags bis freitags technischen Support an, damit Sie die Assays effizient in Ihrem Labor durchführen können.

### Kontaktdaten



Invivoscribe, Inc

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | California 92121-2711 | USA

Telefon: +1 858 224-6600 | Fax: +1 858 224-6601 | Geschäftszeiten: 7:00 Uhr bis 17:00 Uhr PST/PDT

Technischer Kundendienst: [support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com) | Kundenbetreuung: [sales@invivoscribe.com](mailto:sales@invivoscribe.com) | Webseite: [www.invivoscribe.com](http://www.invivoscribe.com)

## 16. Referenzen

1. Dongen, JJM van *et al.*, (2003) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17, 2257–2317.
2. Tonegawa, S. (1983). Somatic Generation of Antibody Diversity. *Nature* 302, 575–581.
3. Trainor, KJ. *et al.*, (1990). Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 75, 2220-2222.
4. Miller, J.E. (2013). Principle of Immunoglobulin and T Cell Receptor Gene Rearrangement. In Cheng, L., Zhang, D., Eble, JN. (Eds), *Molecular Genetic Pathology* (2<sup>nd</sup> Ed., sections 30.2.7.13 and 30.2.7.18). New York, USA: Springer Science & Business Media.
  - Gebrauchsanweisung für die LymphoTrack Dx Software – MiSeq (REF 95000009)
  - <https://www.beckmancoulter.com>
  - <http://www.illumina.com>
  - <http://www.kapabiosystems.com>
  - <http://www.thermofisher.com>

## 17. Symbole

Auf den Etiketten der Invivoscribe-NGS-Diagnostikprodukte befinden sich die folgenden Symbole.

	Katalognummer		Verfallsdatum
	Reagenzvolumen		Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft
	Chargennummer		Gebrauchsanweisung Beachten
	Lagerbedingungen		In-vitro-Diagnostikum
	Eindeutige Geräteerkennung		Hersteller
	UK-Konformität Geprüft		Verantwortliche Person im Vereinigten Königreich
	Bevollmächtigter Schweizer Vertreter		Europäische Konformität
	Computerprogramm		

## 18. Haftungshinweis

Dieses Produkt ist durch eines oder mehrere der folgenden Patente und angemeldeten Patente geschützt, die Eigentum von Invivoscribe, Inc. (IVS) sind oder für die das Unternehmen über eine exklusive Lizenz verfügt. Patent Nummer 7,785,783 in den Vereinigten Staaten von Amerika, Patent Nummer 8,859,748 in den Vereinigten Staaten von Amerika (gemeinsam mit Teilanträgen, die sich auf den gleichen Originalantrag beziehen), Europäisches Patent der Nummer EP 1549764B1 (validiert in 16 Ländern und gestützt durch die verwandten Europäischen Patente der Nummern 2418287A3 und EP 2460889A3), Patent Nummer JP04708029B2 in Japan, Patentanmeldung Nummer 2006-529437 in Japan, Patentanmeldung Nummer PI0410283.5 in Brasilien, Patent Nummer CA2525122 in Kanada, Patent Nummer IN243620 in Indien, Patent Nummer MX286493 in Mexiko, Patent Nummer CN1806051 in China und Patent Nummer 101215194 in Korea.

Für die Nutzung dieses Produkts ist unter Umständen der Einsatz von Verfahren für Nukleinsäureamplifikation (beispielsweise Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erforderlich. Der Nutzer ist für jegliche notwendige Lizenzierung zur Durchführung von Amplifikationsmethoden oder zum Nutzen von Amplifikationsenzymen oder Geräten, welche durch von Drittparteien gehaltenen Patente geschützt sind, verantwortlich, und Invivoscribe Technologies, Inc. erteilt weder ausdrücklich noch stillschweigend eine derartige Lizenz.

©2024 Invivoscribe, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Die in diesem Dokument genannten Handelsmarken sind Eigentum von Invivoscribe, Inc. und/oder deren Tochterunternehmen oder (falls Handelsmarken Dritter genannt werden) der entsprechenden Eigentümer.

ILLUMINA® und MISEQ™ sind eingetragene Handelsmarken von Illumina, Inc.

BECKMAN COULTER®, AGENCOURT®, AMPURE® und SPRIPLATE® sind eingetragene Handelsmarken von Beckman Coulter, Inc.

ROCHE® ist eine eingetragene Handelsmarke und EAGLETAQ™ ist eine Handelsmarke von Roche.

VERITI®, SYBR®, AMBION®, APPLIED BIOSYSTEMS® und LIFE TECHNOLOGIES® sind eingetragene Handelsmarken von Thermo Fisher Scientific und deren Tochterunternehmen.

KAPA™ ist eine Handelsmarke von Kapa Biosystems.

MICROSOFT®, WINDOWS® und EXCEL® sind eingetragene Handelsmarken der Microsoft Corporation.

## 19. LymphoTrack Dx IGH Assay - MiSeq: Kurzanleitung

- 19.1. Mit behandschuhten Händen Master-Mixe aus dem Gefrierschrank nehmen. Die Röhrchen auftauen lassen; dann vorsichtig vortexieren. Unter einer Sicherheitshaube oder in einer „Dead-Air-Box“ 45 µL Master-Mix in die einzelnen Wells einer PCR-Platte pipettieren. Ein Well für jeden Master-Mix und ein Master-Mix pro Probe, Positiv-, Negativ- oder Nicht-Template-Kontrolle.
- 19.2. Geben Sie 0,2 µL Taq-DNA-Polymerase (bei 5 U/µL) zu jedem Master-Mix hinzu.
- 19.3. Geben Sie 5 µL DNA-Probe (mit einer Mindestkonzentration von 10 ng/µL) und 5 µL je Kontrollprobe in Wells, die den entsprechenden Master-Mix enthalten, und mischen Sie, indem Sie 5- bis 10-mal auf- und abpipettieren.
- 19.4. Geben Sie 5 µL Wasser in Molekularbiologie-Qualität in das Well mit dem entsprechenden Master-Mix für die Nicht-Template-Kontrolle und mischen Sie, indem Sie 5- bis 10-mal auf- und abpipettieren.
- 19.5. Amplifizieren Sie die Ziel-DNA mit dem folgenden Thermocycler-Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklus
1	95 °C	7 Minuten	1
2	95 °C	45 Sekunden	29x
3	60 °C	45 Sekunden	
4	72 °C	90 Sekunden	
5	72 °C	10 Minuten	1
6	15 °C	∞	1

- 19.6. PCR-Platte aus dem Thermocycler nehmen.
- 19.7. Die PCR-Produkte mit dem Agencourt AMPure XP PCR Purification System (PCR-Aufreinigungssystem) aufreinigen. Geben Sie 50 µL Magnetpartikel zu jeder 50-µl-Reaktion, eluieren Sie die DNA in 25 µL Eluat.
- 19.8. Quantifizieren Sie die Amplikons mit dem KAPA Library Quantification Kit (Bibliotheksquantifizierungskit) gemäß Kit-Anweisungen. Verdünnen Sie die Amplikons im Verhältnis 1:4.000, bevor Sie mit dem qPCR-Verfahren fortfahren.
- 19.9. Gleiche Amplikonmengen von Proben (nicht jedoch die Nicht-Template-Kontrolle) poolen, im Verhältnis 1:1.000 verdünnen und die Bibliothek mit dem KAPA Library Quantification Kit (Bibliotheksquantifizierungskit) quantifizieren.
- 19.10. Die Bibliothek auf eine Konzentration von 8 pM für das MiSeq Reagenzkit v2 und 20 pM für das MiSeq-Reagenzkit v3 bei Multiplexing (MCS v2.6 oder neuer) denaturieren und verdünnen.
- 19.11. Geben Sie 600 µL der denaturierten und verdünnten Bibliothek in die MiSeq Reagent Cartridge (Reagenzkartusche).
- 19.12. Richten Sie ein MiSeq-Probenblatt ein und laden Sie das Probenblatt auf das Gerät hoch (falls erforderlich).
- 19.13. Starten Sie den MiSeq-Lauf.
- 19.14. Analysieren und visualisieren Sie die erhaltenen Daten mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq.

## 20. Anhang A: Erstellung einer Sequenzierungsbibliothek mit mehreren NGS-Zielen

Wenn mehrere Ziele parallel mit einem unterschiedlichen LymphoTrack Dx Assay – MiSeq ausgeführt werden, ist es wichtig, auf die unterschiedlichen Verfahren bei jedem Assay zu achten. Beispielsweise verwendet der *IGHV* Leader Assay 32 PCR-Zyklen und sollte auf einen separaten Thermocycler-Lauf gesetzt werden als andere LymphoTrack Dx Assays, die nur 29 PCR-Zyklen verwenden. Tabelle 16 unten zeigt diese Verfahrensunterschiede im Überblick. Vollständige Anleitungen sind der Gebrauchsanweisung zum betreffenden LymphoTrack Dx Assay – MiSeq zu entnehmen.

**Tabelle 16** Zykluseinstellungen und Reagenzkits für einen Einzelziel-MiSeq-Lauf

Verfahren Schritt	Beschreibung	LymphoTrack Dx Assay – MiSeq						
		<i>IGHV</i> Leader	<i>IGH</i> FR1	<i>IGH</i> FR2	<i>IGH</i> FR3	<i>IGK</i>	<i>TRG</i>	<i>TRB</i>
7.4.1	Anzahl PCR-Zyklen	32	29	29	29	29	29	29
7.5.1	Volumen AMPure XP Reagenz (Verhältnis)	50 µL (1:1 Verhältnis)	50 µL (1:1 Verhältnis)	50 µL (1:1 Verhältnis)	50 µL (1:1 Verhältnis)	50 µL (1:1 Verhältnis)	50 µL (1:1 Verhältnis)	35 µL (0,7:1 Verhältnis)
7.6.4	Kontaminationsprüfung ΔCt-Wert = Ct (NTC) – Ct (Kontrolle)	ΔCt ≥ 4,0	ΔCt ≥ 4,0	ΔCt ≥ 4,0	ΔCt ≥ 4,0	ΔCt ≥ 4,0	ΔCt ≥ 4,0	ΔCt ≥ 3,0
7.6.5 und 7.9.1	A (durchschnittliche Fragmentlänge)	660 bp	450 bp	390 bp	260 bp	410 bp	300 bp	400 bp
7.10.7	Ladekonzentration	12 - 20 pM	12 pM	12 pM	12 pM	8 pM	12 pM	12 pM
	MiSeq-Reagenzkit für Einzelzielsequenzierung*	v3 (600)	v2 (500)	v2 (500)	v2 (300) v2 (500)	v2 (500)	v2 (300) v2 (500)	v2 (500)
7.12	Probenblatt-Einstellungen für: Zyklen Lesevorgang 1* Zyklen Lesevorgang 2*	301	251	251	151	251	151	251

**\*Hinweis:** MiSeq v2 Chemie wurde für diesen Einzelziel-Assays validiert. MiSeq v3 Chemie wurde für *IGHV* Leader und das Multiplexing von Assays validiert.

Zwei oder mehr Sequenzierungsbibliotheken, die mit den gleichen LymphoTrack Genziel-Master-Mixen hergestellt wurden (z. B. zwei *TRG*-Sequenzierungsbibliotheken aus der gleichen oder aus verschiedenen Kit-Chargen) können ebenfalls gemeinsam in einer einzigen Sequenzierungsbibliothek kombiniert werden, solange jeder Index für den Master-Mix nur einmal pro Sequenzierungslauf enthalten ist. Angaben zu den Zykluseinstellungen und dazu, welche Illumina MiSeq-Reagenzkits für die Kombination verschiedener Genziele verwendet werden können, finden Sie in der folgenden Tabelle. Es wird empfohlen, das MiSeq Reagenzkit v3 zu verwenden, wenn alle 7 Ziele gemeinsam sequenziert werden, um ausreichend Lesevorgänge pro Probe zu erhalten.

**Tabelle 17** Zykluseinstellungen und Reagenzkits für einen MiSeq-Lauf mit mehreren Zielen

Multiplexing von Genzielen	Sample-Sheet-Einstellungen	MiSeq-Reagenzkit	Ladekonzentration	Katalognummer
Nur <i>IGH</i> FR3 und <i>TRG</i> gemeinsam	151 Zyklen Lesevorgang 1 151 Zyklen Lesevorgang 2	v2-Kit (300 Zyklen) oder v2-Kit (500 Zyklen)	12 pM (v2) oder 20 pM (v3)	MS-102-2002 oder MS-102-2003
Beliebige Kombination der folgenden Ziele: <i>IGH</i> FR1, <i>IGH</i> FR2, <i>IGH</i> FR3, <i>IGK</i> , <i>TRB</i> und <i>TRG</i>	251 Zyklen Lesevorgang 1 251 Zyklen Lesevorgang 2	v2-Kit (500 Zyklen) bis zu 4 Ziele oder v3-Kit (600 Zyklen)	12 pM (v2) oder 20 pM (v3)	MS-102-2003 oder MS-102-3003
Bei beliebiger Kombination dieser Assays mit <i>IGHV</i> Leader	301 Zyklen Lesevorgang 1 301 Zyklen Lesevorgang 2	v3-Kit (600 Zyklen)	20 pM (v3)	MS-102-3003

**20.1.** Bestimmen Sie die Konzentration der einzelnen Bibliotheken (z. B. *IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* und *TRG*).

## 20.2. Bestimmen Sie, welche Menge jeder Bibliothek denaturiert werden soll.

In der unten stehenden Tabelle sind die Fälle A, B, C, D, E und F verschiedene Beispiele für das Multiplexing von Assays (z. B. ist Fall A ein Multiplex aus *IGHV* Leader, *IGH* FR1, *IGH* FR2, *IGH* FR3, *IGK*, *TRB* und *TRG*). T, U, V, W, X, Y und Z entsprechen dem Volumen  $\mu\text{L}$ .

n	=	Anzahl der Ziele, die in eine MiSeq-Kartusche geladen werden
T	=	40 fmol / [n x <i>IGHV</i> Leader Bibliothekskonzentration (nM)]
U	=	40 fmol / [n x <i>IGH</i> FR1 Bibliothekskonzentration (nM)]
V	=	40 fmol / [n x <i>IGH</i> FR2 Bibliothekskonzentration (nM)]
W	=	40 fmol / [n x <i>IGH</i> FR3 Bibliothekskonzentration (nM)]
X	=	40 fmol / [n x <i>IGK</i> Bibliothekskonzentration (nM)]
Y	=	40 fmol / [n x <i>TRG</i> Bibliothekskonzentration (nM)]
Z	=	40 fmol / [n x <i>TRB</i> Bibliothekskonzentration (nM)]

**Hinweis:** Der Wert 40 fmol entspricht den 20  $\mu\text{L}$  2 nM am Ende von Schritt 20.3.

**Tabelle 18.** Berechnung der einzelnen Bibliothekseinsätze zur Erzeugung einer Sequenzierungsbibliothek mit mehreren Genzielen für den MiSeq-Lauf

Bibliothek		Volumen der einzelnen Bibliothek ( $\mu\text{L}$ )						
Assay-Name	Konzentration (nM)		Fall A n = 7	Fall B n = 6	Fall C n = 5	Fall D n = 4	Fall E n = 3	Fall F n = 2
<i>IGHV</i> Leader	2,3	T	2,5	2,9	3,5	4,3		
<i>IGH</i> FR1	1,5	U	3,8	4,4	5,3	6,7	8,9	
<i>IGH</i> FR2	4	V	1,4	1,7	2	2,5	3,3	
<i>IGH</i> FR3	2,1	W	2,7	3,2	3,8	4,8	6,4	
<i>IGK</i>	3,5	X	1,6	1,9	2,3			5,7
<i>TRG</i>	2,6	Y	2,2	2,6				7,7
<i>TRB</i>	2	Z	2,9					
		T+U+V+W+X+Y+Z	17,1	16,7	16,9	18,3	18,6	13,4

## 20.3. Die kombinierten Bibliotheken auf 2 nM denaturieren.

- Fügen Sie Reagenzien gemäß Tabelle 19 basierend auf der im vorigen Schritt festgelegten Menge hinzu.

Wenn  $T+U+V+W+X+Y+Z > 18$ , wie beispielsweise in den Fällen D und E aus Tabelle 18, mischen Sie zunächst die entsprechenden Bibliotheken und fügen Sie dann 18  $\mu\text{L}$  zur denaturierenden Lösung hinzu, wie in der folgenden Tabelle gezeigt.

**Tabelle 19.** Denaturierung der Bibliothek

Reagenz	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
<i>IGHV</i> Leader-Bibliothek	T
<i>IGH</i> FR1-Bibliothek	U
<i>IGH</i> FR2-Bibliothek	V
<i>IGH</i> FR3-Bibliothek	W
<i>IGK</i> -Bibliothek	X
<i>TRG</i> -Bibliothek	Y
<i>TRB</i> -Bibliothek	Z
1 N NaOH	2
10 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, 0,05 % Tween-20	18 – (T+U+V+W+X+Y+Z)
<b>Gesamt</b>	<b>20</b>

Zum Mischen der Lösung kurz vortexen und anschließend kurz zentrifugieren, um sicherzustellen, dass sich die Lösung am Boden des Röhrchens absetzt. Fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, um die kombinierte DNA-Bibliothek in einzelsträngige DNA zu denaturieren.

20.4. Die denaturierte Bibliothek auf eine Konzentration von 40 pM verdünnen.

Geben Sie 980 µl vorgekühlten HT1-Puffer (im MiSeq-Reagenz-Kit enthalten) in das Röhrchen, das die 20 µl der denaturierten DNA-Bibliothek enthält. Kurz vortexen, um die Bestandteile zu mischen, und die Probe dann pulszentrifugieren.

20.5. Bereiten Sie die denaturierte Probe für die Übertragung in das MiSeq-Gerät vor.

Verdünnen Sie die Bibliothek auf eine Konzentration von 12 pM für das MiSeq-Reagenzkit v2 und 20 pM für das MiSeq-Reagenzkit v3 (MCS v2.6 oder neuer), siehe Tabelle 20. Zum Mischen kurz vortexen, und die Probe dann pulszentrifugieren.

**Tabelle 20.** Vorbereitung der kombinierten Bibliothek für die Beladung des MiSeq-Geräts

Reagenz	Volumen	
	12 pM	20 pM
40-pM-Bibliothek	300 µL	500 µL
Gekühlter HT1-Puffer	700 µL	500 µL
<b>Gesamt</b>	<b>1000 µL</b>	<b>1000 µL</b>

20.6. Geben Sie 600 µL der kombinierten denaturierten Bibliothek aus dem vorangegangenen Schritt in eine MiSeq Reagent Cartridge (Reagenzkartusche).

20.7. Richten Sie ein MiSeq-Probenblatt ein und laden Sie das Probenblatt auf das Gerät hoch (falls erforderlich).

20.8. Starten Sie den MiSeq-Lauf.

20.9. Analysieren und visualisieren Sie die generierten Daten mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq.