

Gebrauchsanweisung



LymphoTrack[®] Dx IGH (FR1/FR2/FR3) Assays – MiSeq™

Identifikation und Nachverfolgung von Genumlagerungen von schweren B-Zell-Immunglobulinketten (IGH) mithilfe von Next-Generation Sequencing (NGS) und Illumina[®] MiSeq.

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

Schematische Darstellung des IGH-Genlocus und der Ziel-Framework-(FR-)Regionen:



Lagerbedingungen: -85 °C bis -65 °C

(DNA-Kontrollen können aus dem Assay-Kit genommen und bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden)

Katalognummer	Produkte	Menge
REF 91210009	LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay Kit A – MiSeq	8 Indizes – jeweils 5 Reaktionen
REF 91210039	LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay Panel – MiSeq	24 Indizes – jeweils 5 Reaktionen
REF 91210089	LymphoTrack Dx IGH FR2 Assay Kit A – MiSeq	8 Indizes – jeweils 5 Reaktionen
REF 91210099	LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay Panel – MiSeq	24 Indizes – jeweils 5 Reaktionen
REF 91210109	LymphoTrack Dx IGH FR3 Assay Kit A – MiSeq	8 Indizes – jeweils 5 Reaktionen
REF 91210119	LymphoTrack Dx IGH FR3 Assay Panel – MiSeq	24 Indizes – jeweils 5 Reaktionen
REF 91210129	LymphoTrack Dx IGH FR1/2/3 Assay Kit A – MiSeq	8 Indizes pro FR-Region – jeweils 5 Reaktionen
REF 91210139	LymphoTrack Dx IGH FR1/2/3 Assay Panel – MiSeq	24 Indizes – jeweils 5 Reaktionen

Inhaltsverzeichnis

1.	VERWENDUNGSZWECK	3
2.	ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES ASSAYS	3
2.1.	Hintergrund	3
2.2.	Zusammenfassung	4
3.	VERFAHRENSGRUNDLAGEN	4
3.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	4
3.2.	Amplikonaufreinigung	5
3.3.	Amplikonquantifizierung	5
3.4.	Next-Generation Sequencing (NGS)	5
3.5.	Multiplexing von Amplikons	5
3.6.	Beurteilung der somatischen <i>IGHV</i> -Hypermutation (SHM)	6
4.	REAGENZIEN	7
4.1.	Reagenzienbestandteile	7
4.2.	Warn- und Vorsichtshinweise	11
4.3.	Lagerung und Handhabung	11
5.	INSTRUMENTE	12
5.1.	Thermocycler	12
5.2.	Magnetstand	12
5.3.	Real-Time PCR-Gerät	12
5.4.	Illumina MiSeq Dx System*	12
6.	GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG VON PROBEN	13
6.1.	Vorsichtsmaßnahmen	13
6.1.	Störsubstanzen	13
6.2.	Probenanforderung und -handhabung	13
6.3.	Probenlagerung	13
7.	ASSAY-VERFAHREN	14
7.1.	Im Lieferumfang enthaltene Materialien	14
7.2.	Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)	14
7.3.	Vorbereitung der Reagenzien	15
7.4.	Amplifikation	15
7.5.	AMPure XP-Aufreinigung	16
7.6.	Quantifizierung von Amplikons	18
7.7.	Pooling und Quantifizierung der Bibliothek	19
7.8.	Verdünnung der gepoolten Bibliothek	19
7.9.	qPCR-Setup für die Bibliotheksquantifizierung	19
7.10.	Vorbereitung der Bibliothek auf den MiSeq-Sequenzierungslauf	19
7.11.	Laden der MiSeq Flow Cell (Flusszelle)	20
7.12.	Setup für MiSeq Sample Sheet (Probenblatt)	21
7.13.	MiSeq-Lauf starten	22
8.	DATENANALYSE	22
9.	ERWARTETE WERTE	22
10.	VERFAHRENSEINSCHRÄNKUNGEN	23
11.	INTERPRETATION UND BERICHTERSTELLUNG	23
12.	BEISPIELDATEN	27
13.	LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN	28
14.	FEHLERSUCHE UND -BEHEBUNG	30
15.	TECHNISCHER SUPPORT UND KUNDENDIENST	31
16.	REFERENZEN	31
17.	SYMBOLS	31
18.	HAFTUNGSHINWEIS	32
19.	LYMPHOTrack Dx <i>IGH</i> FR1/FR2/FR3 ASSAY – MiSeq: KURZANLEITUNG	33
20.	ANHANG A: ERSTELLUNG EINER SEQUENZIERUNGSBIBLIOTHEK MIT MEHREREN NGS-ZIELEN	34

1. Verwendungszweck

Verwendungszweck (LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay – MiSeq)

Der LymphoTrack Dx IGHV FR1 Assay für das Illumina MiSeq ist ein *In-vitro*-Diagnostikum für das Next-Generation Sequencing (NGS) zur Bestimmung der Häufigkeitsverteilung von IGH-Genumlagerungen sowie des Grades der somatischen Hypermutation der umgelagerten Gene bei Patienten, bei denen der Verdacht auf eine lymphoproliferative Erkrankung besteht. Dieser Assay unterstützt die Identifizierung lymphoproliferativer Erkrankungen und dient als Hilfestellung bei der Prognosestellung.

Verwendungszweck (LymphoTrack Dx IGH FR1/2/3 Assays – MiSeq)

Der LymphoTrack Dx IGHV FR1 Assay für das Illumina MiSeq ist ein *In-vitro*-Diagnostikum für das Next-Generation Sequencing (NGS) zur Bestimmung der Häufigkeitsverteilung von IGH-Genumlagerungen sowie des Grades der somatischen Hypermutation der umgelagerten Gene bei Patienten, bei denen der Verdacht auf eine lymphoproliferative Erkrankung besteht. Dieser Assay unterstützt die Identifizierung lymphoproliferativer Erkrankungen und dient als Hilfestellung bei der Prognosestellung.

Dieser LymphoTrack Dx IGH FR2 Assay ist ein *In-vitro*-Diagnostikum für das Next-Generation Sequencing (NGS) für das Illumina MiSeq-Instrument. Der Assay bestimmt die Häufigkeitsverteilung von IGH-V_H-J_H-Genumlagerungen bei Patienten, bei denen Verdacht auf eine lymphoproliferative Erkrankung besteht. Dieser Assay unterstützt die Identifizierung lymphoproliferativer Erkrankungen.

Der LymphoTrack Dx IGH FR3 Assay ist ein *In-vitro*-Diagnostikum für das Next-Generation Sequencing (NGS) für das Illumina MiSeq-Instrument. Der Assay bestimmt die Häufigkeitsverteilung von IGH-V_H-J_H-Genumlagerungen bei Patienten, bei denen Verdacht auf eine lymphoproliferative Erkrankung besteht. Dieser Assay unterstützt die Identifizierung lymphoproliferativer Erkrankungen.

Zur Bestimmung der Klonalität einer Probe werden Daten aller drei Framework-Regionen benötigt.

2. Zusammenfassung und Erläuterung des Assays

2.1. Hintergrund

Der Genlocus der schweren Immunglobulinkette (IGH) auf Chromosom 14 (14q32.3) umfasst 46-52 funktionelle und 30 nicht funktionelle variable Gensegmente (V_H), 27 funktionelle diversifizierende Gensegmente (D_H) und 6 funktionelle Verbindungs-Gensegmente (J_H), die über 1.250 Kilobasen verteilt sind. Die V_H-Gensegmente umfassen drei konservierte Framework-Regionen (FR) und zwei variable CDR (komplementaritätsbestimmende Regionen).

Lymphatische Zellen unterscheiden sich von anderen somatischen Zellen des Körpers; während der Entwicklung durchlaufen die Antigen-Rezeptor-Gene von lymphatischen Zellen eine somatische Genumlagerung.¹ Während der B-Zellentwicklung beispielsweise werden Gene, die IGH-Moleküle codieren, aus mehreren polymorphen Gensegmenten zusammengesetzt, die eine Umlagerung und Selektion durchlaufen, wodurch V_H-D_H-J_H-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 IGH-Umlagerungen nachweisen, für die Untersuchung bösartiger B- und T-Zell-Erkrankungen herangezogen werden.

Des Weiteren bietet der Hypermutationsstatus der variablen Region der schweren Immunglobulinketten (IGHV) wertvolle prognostische Einsichten für Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) und kleinzelligem lymphozytischem Lymphom (SLL). Das Vorhandensein einer somatischen IGHV-Hypermutation (SHM) ist definiert als Differenz von mindestens 2 % zur V_H-Gensequenz der Keimbahn, wohingegen eine Differenz von weniger als 2 % als Nachweis dafür gilt, dass keine somatische Hypermutation vorliegt. Der Status der somatischen Hypermutation für Klone ist für B-CLL klinisch relevant, da ein klarer Unterschied beim mittleren Überleben von Patienten mit und ohne somatische Hypermutation besteht. Eine Hypermutation der IGHV-Region ist stark prädiktiv für eine positive Prognose, während eine fehlende Mutation prädiktiv für eine negative Prognose ist.²

Zunächst 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 Morley³ entwickelt wurden und derzeit die Goldstandardmethode sind. Diese Assays stellen eine

Klonalität dadurch fest, dass nach der Trennung mit Gel- oder Kapillarelektrophorese amplifizierte $V_H-D_H-J_H$ -Genumlagerungen (oder unvollständige D_H-J_H -Produkte) 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_H-J_H -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

Diese LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) Assays – MiSeq (separat und im Set erhältlich) sind eine wesentliche Verbesserung im Vergleich zu bestehenden Klonalitäts-Assays, die die Fragmentanalyse anwenden, da sie *IGK*-Genumlagerungen mit einem einzelnen Multiplex-Master-Mix nachweisen und die für jede klonale Genumlagerung spezifische DNA-Sequenz identifizieren. Somit erfüllen diese Assays zwei wichtige, einander ergänzende Funktionen: Sie stellen kritische Daten über das Vorhandensein einer Klonalität bereit und identifizieren die Sequenzdaten, die für die Nachverfolgung der Klone in nachfolgenden Proben benötigt werden. Mit dem LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay können zudem detaillierte Sequenzdaten zum Grad der SHM ermittelt werden.

Jeder einzelne Multiplex-Master-Mix zielt auf einen der konservierten *IGH*-Framework-Regionen (FR1, FR2 oder FR3) in den V_H - und J_H -Regionen ab, die mit bösartigen lymphatischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Da alle drei Framework-Regionen untersucht werden, sinkt das Risiko, eine Klonalität nicht erkennen zu können, wesentlich, da eine somatische Hypermutation an den Primer-Bindungsstellen der betroffenen V_H -Gensegmente eine DNA-Amplifizierung verhindern kann.⁴ **Zur Bestimmung der Klonalität einer Probe werden Daten aller drei Framework-Regionen benötigt.**

In den Master-Mixen enthaltene Primer verfügen über Illumina-Adapter. Diese Methode ermöglicht eine One-Step-PCR und es können Amplikons mehrerer verschiedener Proben und Genziele (mit anderen LymphoTrack Dx Assays für das Illumina MiSeq System generiert, separat erhältlich) in einer MiSeq Flow Cell (Flusszelle) gepoolt werden, sodass bis zu 24 Proben (einschließlich Kontrollen) 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 und somatischer Hypermutation 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. Eine zusätzliche Positivkontrolle speziell für die somatische Hypermutation ist optional und separat erhältlich (REF 40880008).

Hinweis: Eine detailliertere Erläuterung des Locus und der zielgerichteten Sequenzierung finden Sie in Miller, JE., 2013.⁵

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 *IGH*-Populationen enthalten, verfügen über eine oder zwei

markante amplifizierte Produkte der gleichen Länge und Sequenz, die mit einer signifikanten Häufigkeit innerhalb eines verminderten polyklonalen Hintergrunds nachgewiesen werden.

3.2. Amplikonaufreinigung

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-Produkte mit 100 bp oder mehr selektiv an paramagnetische Partikel gebunden, während Verunreinigungen wie überschüssige Primer, Primer-Dimere, Salze und nicht eingebaute dNTP 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

Aufgereinigte Amplikons werden mithilfe des KAPA™ Library Quantification Kits (Bibliothekskuantifizierungskits) für Illumina-Plattformen 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 $\log_{10}$ (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

Diese Assays wurden so konzipiert, dass zwei verschiedene Multiplexing-Levels möglich sind, um den Labors Zeit und Kosten zu sparen. 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, mit der diejenigen identifiziert werden, 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. Für weitere Anweisungen siehe *Anhang A: Erstellung einer Sequenzierungsbibliothek mit mehreren NGS-Ziele* (Abschnitt 20).

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.

3.6. Beurteilung der somatischen *IGHV*-Hypermutation (SHM)

Für die Beurteilung der somatischen Hypermutationsrate der *IGHV*-Region können die LymphoTrack Dx *IGH* FR1 – Master Mixes verwendet werden. Diese haben jedoch nur einen Teil der *IGHV*-Region zum Ziel, da die Sequenz vor der Primer-Bindungsstelle nicht untersucht wird. Bei der Analyse des somatischen Hypermutationsstatus einer Probe errechnet die Bioinformatiksoftware die Mutationsrate auf Basis der prozentualen Nichtübereinstimmung der klonalen Amplikons mit den Referenzgenen der Keimbahn. Eine Vorhersage, ob die Proteintranslation im oder außerhalb des Leserasters liegt und ob Mutationen oder Genumlagerungen in einem vorzeitigen Stoppcodon resultieren, sowie der Prozentsatz der V_H Genabdeckung für die Region, auf die der Assay abzielt, werden ebenfalls angegeben.

4. Reagenzien

4.1. Reagenzienbestandteile

Tabelle 1. Verfügbare Kits

Katalognummer	Beschreibung	Anzahl der Index-Master-Mixe	Reaktionen insgesamt
 91210009	LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay-Kit A – MiSeq	8 Indizes – jeweils 5 Sequenzierungsläufe	40
 91210039	LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay-Panel – MiSeq	24 Indizes – jeweils 5 Sequenzierungsläufe	120
 91210089	LymphoTrack Dx IGH FR2 Assay-Kit A – MiSeq	8 Indizes – jeweils 5 Sequenzierungsläufe	40
 91210099	LymphoTrack Dx IGH FR2 Assay-Panel – MiSeq	24 Indizes – jeweils 5 Sequenzierungsläufe	120
 91210109	LymphoTrack Dx IGH FR3 Assay-Kit A – MiSeq	8 Indizes – jeweils 5 Sequenzierungsläufe	40
 91210119	LymphoTrack Dx IGH FR3 Assay-Panel – MiSeq	24 Indizes – jeweils 5 Sequenzierungsläufe	120
 91210129	LymphoTrack Dx IGH FR1/2/3 Assay-Kit A – MiSeq	(8+8+8) Indizes – jeweils 5 Sequenzierungsläufe	40+40+40
 91210139	LymphoTrack Dx IGH FR1/2/3 Assay-Panel – MiSeq	(24+24+24) Indizes – jeweils 5 Sequenzierungsläufe	120+120+120

Tabelle 2. Komponenten des LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay-Kits

Reagenz	Reagenzienbestandteile	Verpackungseinheit	91210009 Anzahl der Einheiten	91210039 Anzahl der Einheiten	Lagertemperatur	Anmerkungen
Master-Mixe[‡]	IGH FR1 MiSeq 01	250 µL	1	1		Keine Angabe
	IGH FR1 MiSeq 02		1	1		
	IGH FR1 MiSeq 03		1	1		
	IGH FR1 MiSeq 04		1	1		
	IGH FR1 MiSeq 05		1	1		
	IGH FR1 MiSeq 06		1	1		
	IGH FR1 MiSeq 07		1	1		
	IGH FR1 MiSeq 08		1	1		
	IGH FR1 MiSeq 09		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 10		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 11		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 12		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 13		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 14		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 15		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 16		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 18		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 19		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 20		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 21		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 22		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 23		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 25		0	1		
	IGH FR1 MiSeq 27		0	1		
Positivkontrolle	IGH POS (+)  40880009	45 µL	1	3	 oder 	IGH V1-46_03 / IGH J4_02 DNA verdünnt in Tonsillen-DNA
Negativkontrolle	NGS NEG (-)  40920018	45 µL	1	3		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.

Tabelle 3. Komponenten des LymphoTrack Dx IGH FR2 Assay-Kits

Reagenzien	Reagenzienbestandteile	Verpackungseinheit	91210089 Anzahl der Einheiten	91210099 Anzahl der Einheiten	Lagertemperatur	Anmerkungen
Master-Mixe†	IGH FR2 MiSeq 01	250 µL	1	1	 -85°C oder -65°C	Keine Angabe
	IGH FR2 MiSeq 02		1	1		
	IGH FR2 MiSeq 03		1	1		
	IGH FR2 MiSeq 04		1	1		
	IGH FR2 MiSeq 05		1	1		
	IGH FR2 MiSeq 06		1	1		
	IGH FR2 MiSeq 07		1	1		
	IGH FR2 MiSeq 08		1	1		
	IGH FR2 MiSeq 09		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 10		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 11		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 12		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 13		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 14		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 15		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 16		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 18		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 19		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 20		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 21		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 22		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 23		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 25		0	1		
	IGH FR2 MiSeq 27		0	1		
Positivkontrolle	IGH POS (+) (REF 40880009)	45 µL	1	3	 2°C oder 8°C	IGH V1-46_03 / IGH J4_02 DNA verdünnt in Tonsillen-DNA
Negativkontrolle	NGS NEG (-) (REF 40920018)	45 µL	1	3	 -85°C oder -65°C	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.

Tabelle 4. Komponenten des LymphoTrack Dx IGH FR3 Assay-Kits

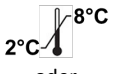
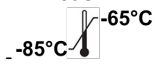
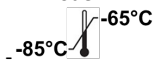
Reagenzien	Reagenzienbestandteile	Verpackungseinheit	91210109 Anzahl der Einheiten	91210119 Anzahl der Einheiten	Lagertemperatur	Anmerkungen
Master-Mixe[†]	IGH FR3 MiSeq 01	250 µL	1	1		Keine Angabe
	IGH FR3 MiSeq 02		1	1		
	IGH FR3 MiSeq 03		1	1		
	IGH FR3 MiSeq 04		1	1		
	IGH FR3 MiSeq 05		1	1		
	IGH FR3 MiSeq 06		1	1		
	IGH FR3 MiSeq 07		1	1		
	IGH FR3 MiSeq 08		1	1		
	IGH FR3 MiSeq 09		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 10		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 11		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 12		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 13		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 14		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 15		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 16		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 18		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 19		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 20		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 21		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 22		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 23		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 25		0	1		
	IGH FR3 MiSeq 27		0	1		
Positivkontrolle	IGH POS (+) (REF 40880009)	45 µL	1	3	 oder 	IGH V1-46_03 / IGH J4_02 DNA verdünnt in Tonsillen-DNA
Negativkontrolle	NGS NEG (-) (REF 40920018)	45 µL	1	3		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.					

Tabelle 5. Komponenten des LymphoTrack Dx IGH FR1/2/3 Assay-Kits

FR1-Master-Mixe [†]	FR2-Master-Mixe [†]	FR3-Master-Mixe [†]	Verpackungseinheit	91210129 Anzahl der Einheiten pro FR	91210139 Anzahl der Einheiten pro FR
IGH FR1 MiSeq 01	IGH FR2 MiSeq 01	IGH FR3 MiSeq 01	250 µL	1	1
IGH FR1 MiSeq 02	IGH FR2 MiSeq 02	IGH FR3 MiSeq 02		1	1
IGH FR1 MiSeq 03	IGH FR2 MiSeq 03	IGH FR3 MiSeq 03		1	1
IGH FR1 MiSeq 04	IGH FR2 MiSeq 04	IGH FR3 MiSeq 04		1	1
IGH FR1 MiSeq 05	IGH FR2 MiSeq 05	IGH FR3 MiSeq 05		1	1
IGH FR1 MiSeq 06	IGH FR2 MiSeq 06	IGH FR3 MiSeq 06		1	1
IGH FR1 MiSeq 07	IGH FR2 MiSeq 07	IGH FR3 MiSeq 07		1	1
IGH FR1 MiSeq 08	IGH FR2 MiSeq 08	IGH FR3 MiSeq 08		1	1
IGH FR1 MiSeq 09	IGH FR2 MiSeq 09	IGH FR3 MiSeq 09		0	1
IGH FR1 MiSeq 10	IGH FR2 MiSeq 10	IGH FR3 MiSeq 10		0	1
IGH FR1 MiSeq 11	IGH FR2 MiSeq 11	IGH FR3 MiSeq 11		0	1
IGH FR1 MiSeq 12	IGH FR2 MiSeq 12	IGH FR3 MiSeq 12		0	1
IGH FR1 MiSeq 13	IGH FR2 MiSeq 13	IGH FR3 MiSeq 13		0	1
IGH FR1 MiSeq 14	IGH FR2 MiSeq 14	IGH FR3 MiSeq 14		0	1
IGH FR1 MiSeq 15	IGH FR2 MiSeq 15	IGH FR3 MiSeq 15		0	1
IGH FR1 MiSeq 16	IGH FR2 MiSeq 16	IGH FR3 MiSeq 16		0	1
IGH FR1 MiSeq 18	IGH FR2 MiSeq 18	IGH FR3 MiSeq 18		0	1
IGH FR1 MiSeq 19	IGH FR2 MiSeq 19	IGH FR3 MiSeq 19		0	1
IGH FR1 MiSeq 20	IGH FR2 MiSeq 20	IGH FR3 MiSeq 20		0	1
IGH FR1 MiSeq 21	IGH FR2 MiSeq 21	IGH FR3 MiSeq 21		0	1
IGH FR1 MiSeq 22	IGH FR2 MiSeq 22	IGH FR3 MiSeq 22		0	1
IGH FR1 MiSeq 23	IGH FR2 MiSeq 23	IGH FR3 MiSeq 23		0	1
IGH FR1 MiSeq 25	IGH FR2 MiSeq 25	IGH FR3 MiSeq 25		0	1
IGH FR1 MiSeq 27	IGH FR2 MiSeq 27	IGH FR3 MiSeq 27		0	1
Kontroll-DNA [*]		Anmerkungen	Verpackungseinheit	91210129 Anzahl der Einheiten	91210139 Anzahl der Einheiten
IGH POS (+) (REF 40880009)		IGH V1-46_03 / IGH J4_02 DNA verdünnt in Tonsillen-DNA	45 µL	2	6
NGS NEG (-) (REF 40920018)		Tonsillen-DNA, maximale Sequenzhäufigkeit kann je nach Charge schwanken	45 µL	2	6

***Hinweis:** Die Lagertemperatur für Master-Mixe beträgt -85 °C bis -65 °C.

***Hinweis:** Die Lagertemperatur für die Kontrollen beträgt 2 °C bis 8 °C oder -85 °C bis -65 °C.

Hinweis: Für die Herstellung dieser Kits werden keine Konservierungsstoffe 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 für die *In-vitro*-Diagnostik vorgesehen.
- Verwenden Sie das 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 unbedingt 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 den 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:
 - Temperaturbereich: 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 96 (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 PCR-Aufreinigungsverfahren finden Sie in Abschnitt 7.5 *AMPure XP-Aufreinigung*.

5.3. Real-Time PCR-Gerät

- 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 Dx System*

- 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-Flusszelle*, 7.12 *Erstellen des Probenblatts* und 7.13 *Starten eines MiSeq-Laufs*.

*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. Alle sind in Einklang mit Ihren institutsinternen Vorschriften für blutübertragbare Krankheitserreger bzw. gemäß biologischer Schutzstufe 2 zu handhaben.

6.1. Störsubstanzen

Folgende Substanzen stören bekanntermaßen die PCR:

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

6.2. 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.

6.3. Probenlagerung

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

7. Assay-Verfahren

7.1. Im Lieferumfang enthaltene Materialien

Die im Lieferumfang enthaltenen Materialien sind Tabelle 2 bis Tabelle 5 zu entnehmen.

7.2. Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Tabelle 6. Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

Reagenz/Material	Erforderliche oder empfohlene Reagenzien/Hersteller	Katalognummer	Anmerkungen
DNA-Polymerase	Roche: - EagleTaq™ DNA Polymerase (DNA-Polymerase) oder Invivoscribe: - FalconTaq DNA Polymerase (DNA-Polymerase) oder gleichwertig	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: Agencourt AMPure XP	A63880	Keine Angabe
PCR-Aufreinigung	Thermo Fisher Scientific: - Ambion Magnetic Stand (Magnetstand) 96 - DynaMag-96 Side Skirted Magnet (Magnet mit Seitenumrandung) oder Beckman Coulter: - Agencourt SPRI Plate, 96 Ring Super Magnet Plate (Ring-Super-Magnetplatte) oder ein vergleichbares Gerät	AM10027 12027 oder A32782	Keine Angabe
Amplikon- und Bibliotheksquantifizierung	KAPA Biosystems: KAPA Library Quantification Kit (Bibliotheksquantifizierungskit) – Illumina	KK4824	Keine Angabe
MiSeq-Lauf	Illumina: - MiSeq v2-Reagenzkit (500 Zyklen) oder v3-Kit (600 Zyklen) beim Multiplexing Wenn nur IGH FR3 sequenziert wird: MiSeq v2-Reagenzkit (300 Zyklen) oder v2-Kit (500 Zyklen)	MS-102-2003 oder MS-102-3003 MS-102-2002 oder MS-102-2003	Standard-Flusszelle
MiSeq-Software	- MiSeq Control Software (Kontrollsoftware) v2.6 oder neuere - Local Run Manager v2.0 oder neuere	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 die Proben mit dem Specimen Control Size Ladder Master Mix (Master Mix Probengröße-Kontrollskala) von Invivoscribe getestet 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 generiert 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 Matriz 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 Proben-DNA (mit einer Mindestkonzentration von 10 ng/µl), Kontroll-DNA oder hochreines Wasser (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 7. Reaktions-Setup

Reagenz	Volumen
Master-Mix	45 µL
Taq-DNA-Polymerase	0,2 µL
Proben- oder Kontroll-DNA	5 µL
Gesamtvolumen	50,2 µl

7.4. Amplifikation

- 7.4.1. Proben mit dem PCR-Programm aus Tabelle 8 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 8. 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. PCR-Platte aus dem Thermocycler nehmen. Werden die folgenden Schritte nicht unmittelbar im Anschluss ausgeführt, lagern Sie die amplifizierten 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 wurde während der Assay-Validierung mit dem Agencourt AMPure XP PCR Purification System (PCR-Aufreinigungssystem) 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 die Anzahl der aufzureinigenden Proben ist)
- 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 μL des aliquotierten und auf **Raumtemperatur** befindlichen 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-96 (Magnetstand) 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 μL eingestellten P200-Pipette (oder einer gleichwertigen Mehrkanalpipette) den klaren Überstand absaugen und entsorgen.
- Mit einer P10-Pipette (oder einer ähnlichen Mehrkanalpipette) mit der Einstellung 10 μL etwaigen übrigen Überstand absaugen.
 - Vermeiden Sie, Magnetpartikel zu entfernen.

Waschen:

- 7.5.7. Während die Platte auf dem Magnetstand belassen wird, 200 μL einer 80-prozentigen Ethanolllösung zu jeder Probe hinzugeben. Dreißig Sekunden bei Raumtemperatur inkubieren.
- Mit einer auf 195 μL eingestellten P200-Pipette (oder einer gleichwertigen Mehrkanalpipette) das Ethanol absaugen und entsorgen.
 - Mit einer auf 10 μL eingestellten P10-Pipette (oder einer Mehrkanalpipette) überschüssiges 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 µl 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 µl 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 °C lagern oder mit dem nächsten Schritt fortfahren.
- Die Gelbilder in den Abbildungen 1 bis 3 veranschaulichen die Wirksamkeit einer typischen Aufreinigung (gezeigt werden die Amplikons vor und nach der Aufreinigung) mit den *IGH* FR1, *IGH* FR2 bzw. *IGH* FR3 MiSeq Master-Mixen.

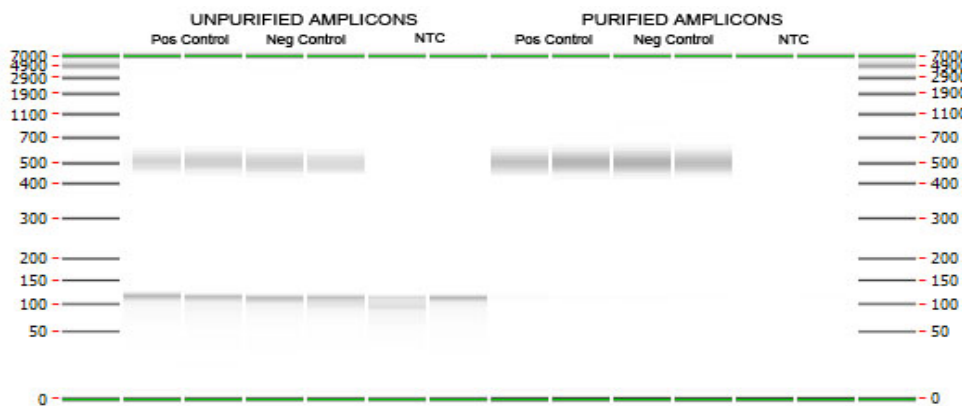


Abbildung 1: Beispiel eines Aufreinigungsergebnisses für Amplikons, die mit den **LymphoTrack Dx *IGH* FR1 MiSeq Master Mixen** generiert wurden. Die Aufnahme entstand durch die Analyse von nicht aufgereinigten und aufgereinigten Produkten mit dem LabChip GX.

Abbildung 2: Beispiel eines Aufreinigungsergebnisses für Amplikons, die mit den **LymphoTrack Dx *IGH* FR2 MiSeq Master-Mixen** generiert wurden. Die Aufnahme entstand durch die Analyse von nicht aufgereinigten und aufgereinigten Produkten mit dem LabChip GX.

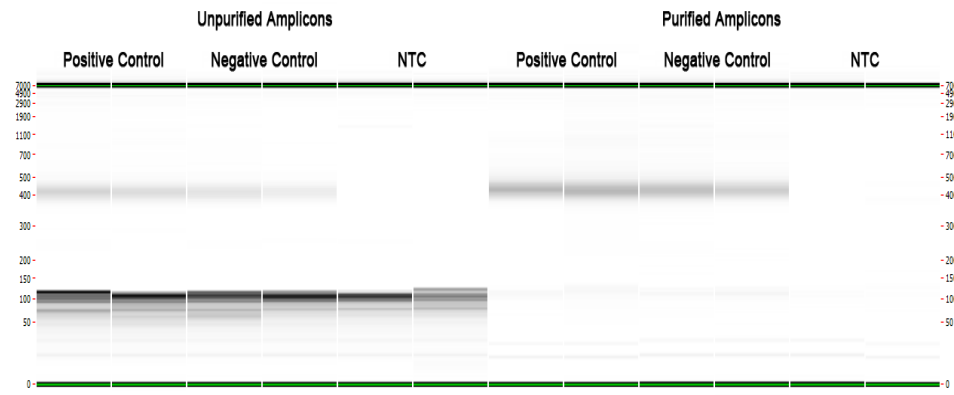
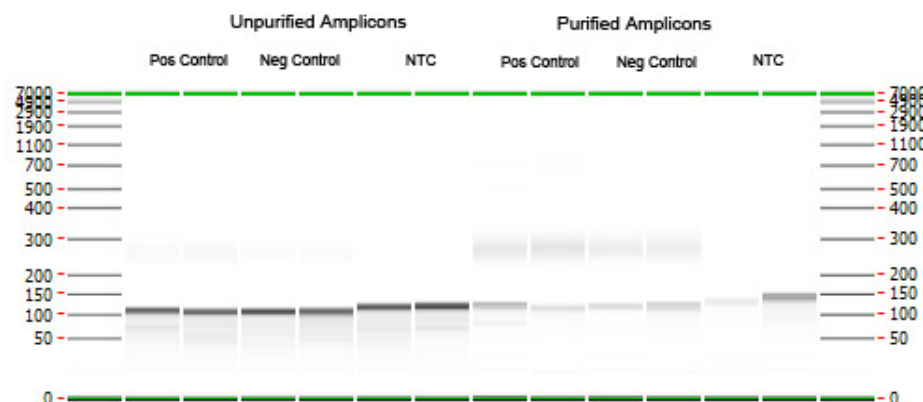


Abbildung 3: Beispiel eines Aufreinigungsergebnisses für Amplikons, die mit den **LymphoTrack Dx *IGH* FR3 MiSeq Master Mixen** generiert wurden. Die Aufnahme entstand durch die Analyse von nicht aufgereinigten und aufgereinigten Produkten mit dem LabChip GX.



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 No-Template-Kontrollen mit dem KAPA Library Quantification Kit (Bibliothekquantifizierungskit) (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 µL aufgereinigtes Amplikon-Eluat + 198 µL Verdünnungspuffer A.
Zehnmal auf- und abpipettieren, um gründlich zu mischen.
- Schritt B:** 5 µL von Schritt A + 195 µL Verdünnungspuffer A.
Zehnmal auf- und abpipettieren, um gründlich zu mischen.

7.6.2. Führen Sie gemäß Tabelle 9 einen qPCR-Lauf für die Amplikon-Quantifizierung jeder Reaktion durch (weitere Anweisungen finden Sie im Handbuch des KAPA Library Quantification Kit (Bibliothekquantifizierungskit)):

Tabelle 9. qPCR-Setup

Reagenz	Volumen
Wasser (PCR-grade)	3,6 µL
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix mit Primer-Premix	12,0 µL
ROX	0,4 µL
Verdünnte Amplikons oder Standard (1–6)	4,0 µL
Gesamtvolumen	20,0 µL

7.6.3. Angaben zum Thermocycler-Programm für die qPCR finden Sie in Tabelle 10.

Tabelle 10. qPCR-Programm

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

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

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

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

Beim Multiplexing mehrerer Ziele ist bezüglich des qualifizierenden 20-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.

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

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

Die durchschnittliche Fragmentlänge der mit dem **IGH FR1** Assay generierten Amplikons beträgt 450 bp (**A = 450**).

Die durchschnittliche Fragmentlänge der mit dem **IGH FR2** Assay generierten Amplikons beträgt 390 bp (**A = 390**).

Die durchschnittliche Fragmentlänge der mit dem **IGH FR3** Assay generierten Amplikons beträgt 260 bp (**A = 260**).

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

7.7. Pooling und Quantifizierung der Bibliothek

Die Menge der in die MiSeq 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.**

Es wird empfohlen, einen separaten Pool für jeden LymphoTrack Dx Assay und das entsprechende Ziel (*IGH* FR1, FR2 oder FR3) zu erstellen. Nach der abschließenden Quantifizierung einer gepoolten Bibliothek für jedes Ziel gemäß Abschnitt 7.9 können LymphoTrack Dx Assays einzeln sequenziert (siehe Anweisungen in Abschnitt 7.10) oder gemeinsam gemultiplext werden (siehe Anweisungen in Anhang A).

- 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. 4 nM jedes Amplikons in einem Gesamtvolumen von 10 µL kombinieren und Verdünnungspuffer A als Verdünnungsmittel verwenden.
 - Bei Proben mit einer Konzentration von < 4 nM wird die höchstmögliche Menge Probe hinzugefügt (10 µL). Geben Sie zu diesen Proben keinen Verdünnungspuffer A.
- 7.7.2. Röhrcheninhalte vorsichtig vortexen und anschließend kurz zentrifugieren.

7.8. Verdünnung der gepoolten Bibliothek

Ziel 1:1.000:

- Schritt A:** 2 µL der gepoolten Bibliothek + 198 µL Verdünnungspuffer A.
Zehnmal auf- und abpipettieren, um gründlich zu mischen.
- Schritt B:** 20 µL aus Schritt A + 180 µL 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 9 und für das Thermocycler-Programm in Tabelle 10.

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

$$\text{Konzentration des unverdünnten Amplikons (nM)} = \frac{452 \times \text{Durchschn. Konz. (pM) Berechnet durch qPCR}}{A}$$

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

Die durchschnittliche Fragmentlänge der mit dem *IGH* FR1 Assay generierten Amplikons beträgt 450 bp (A = 450).

Die durchschnittliche Fragmentlänge der mit dem *IGH* FR2 Assay generierten Amplikons beträgt 390 bp (A = 390).

Die durchschnittliche Fragmentlänge der mit dem *IGH* FR3 Assay generierten Amplikons beträgt 260 bp (A = 260).

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 **12 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 11. Denaturierung der Bibliothek

Reagenz	Volumen
Verdünnte Bibliothek	10 µL
0,2 N NaOH	10 µL
Gesamtvolumen	20 µL

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-Reagenzkits enthalten) in das Röhrchen, das die denaturierte DNA-Bibliothek enthält.

Tabelle 12. Hinzugabe des HT1-Puffers

Reagenz	Volumen
Denaturierte Bibliothek	20 µL
HT1-Puffer	980 µL
Gesamtvolumen	1000 µL

7.10.5. Zum Mischen kurz vortexen, dann verdünnte und denaturierte DNA-Bibliothekslösung pulszentrifugieren.

7.10.6. Verdünnte und denaturierte DNA-Bibliothekslösung bis zum nächsten Schritt auf Eis legen.

7.10.7. Die verdünnte ssDNA-Bibliothek vom Eis nehmen und die nächsten Schritte befolgen, 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 12 pM.

Die Konzentration der DNA-Bibliothek für das MiSeq-Reagenzkit v3 beträgt 20 pM.

- 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 13. Vorbereitung der Bibliothek für die Beladung des MiSeq-Geräts

Zielkonzentrationen	12 pM	20 pM
Denaturierte Bibliothek	300 µL	500 µL
HT1-Puffer	700 µL	500 µL
NaOH-Zielkonzentration (mM)	0,60 mM	1,0 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. 12 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 pulszentrifugieren.

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 aufbereiteten Bibliothek in eine MiSeq Reagent Cartridge (Reagenzkartusche).

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 Probenduplikate 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; darf nicht mehr als ein Leerzeichen auf einmal eingegeben werden.

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 **20 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 14. 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-B
id02	CGATGT	AR002-A
id03	TTAGGC	AR003-B
id04	TGACCA	AR004-A
id05	ACAGTG	AR005-A
id06	GCCAAT	AR006A
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-A

Tabelle 14. 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])
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 auf dem MiSeq-Gerät folgen. In der nachfolgenden Tabelle finden Sie ungefähre Angaben zu den MiSeq-Laufzeiten.

Tabelle 15. MiSeq-Laufzeiten

MiSeq-Reagenz-Kit	Lese-Länge	MCS-Version	MiSeq-Gesamtlaufzeit
v2	2x151 bp (nur FR3)	v2.6 oder neuer	~ 24 Stunden
	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

Die LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) Assays – MiSeq wurden 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.

- *IGH* Positivkontrolle häufigste Lesevorgänge in % $\geq 2,5$ %
- NGS, Negativkontrolle, häufigste Lesevorgänge in % $< 1,0$ %
- *IGH* Positivkontrolle SHM (**REF** 40880008, separat erhältlich), häufigste Lesevorgänge in % $\geq 2,5$ %
- Validität des MiSeq-Laufs
 - % Q30 > 80 % für v2 (2x151)
 - % 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

- Mit diesen Assays können nicht 100 % der klonalen Zellpopulationen identifiziert werden.
- 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.
- Der LymphoTrack Dx *IGH* FR1-Assay – MiSeq zielt nur auf einen Teil des *IGHV*-Bereichs ab, da die Sequenz vor der Primer-Bindungsstelle nicht untersucht wird. Der LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Assay für somatische Hypermutation für Illumina MiSeq ([REF](#) 91210059 oder [REF](#) 91210069) ist separat erhältlich, wenn eine vollständige *IGHV*-Sequenzierung erforderlich ist.

11. Interpretation und Berichterstellung

Der Bericht *Merged Read Summary* (*Zusammengelegte Lesevorgangsübersicht*) kann dazu genutzt werden, die häufigsten zusammengelegten 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 im Abschnitt „Datenanalyse“. Bei einigen klonalen Prozessen kann es dazukommen, 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.

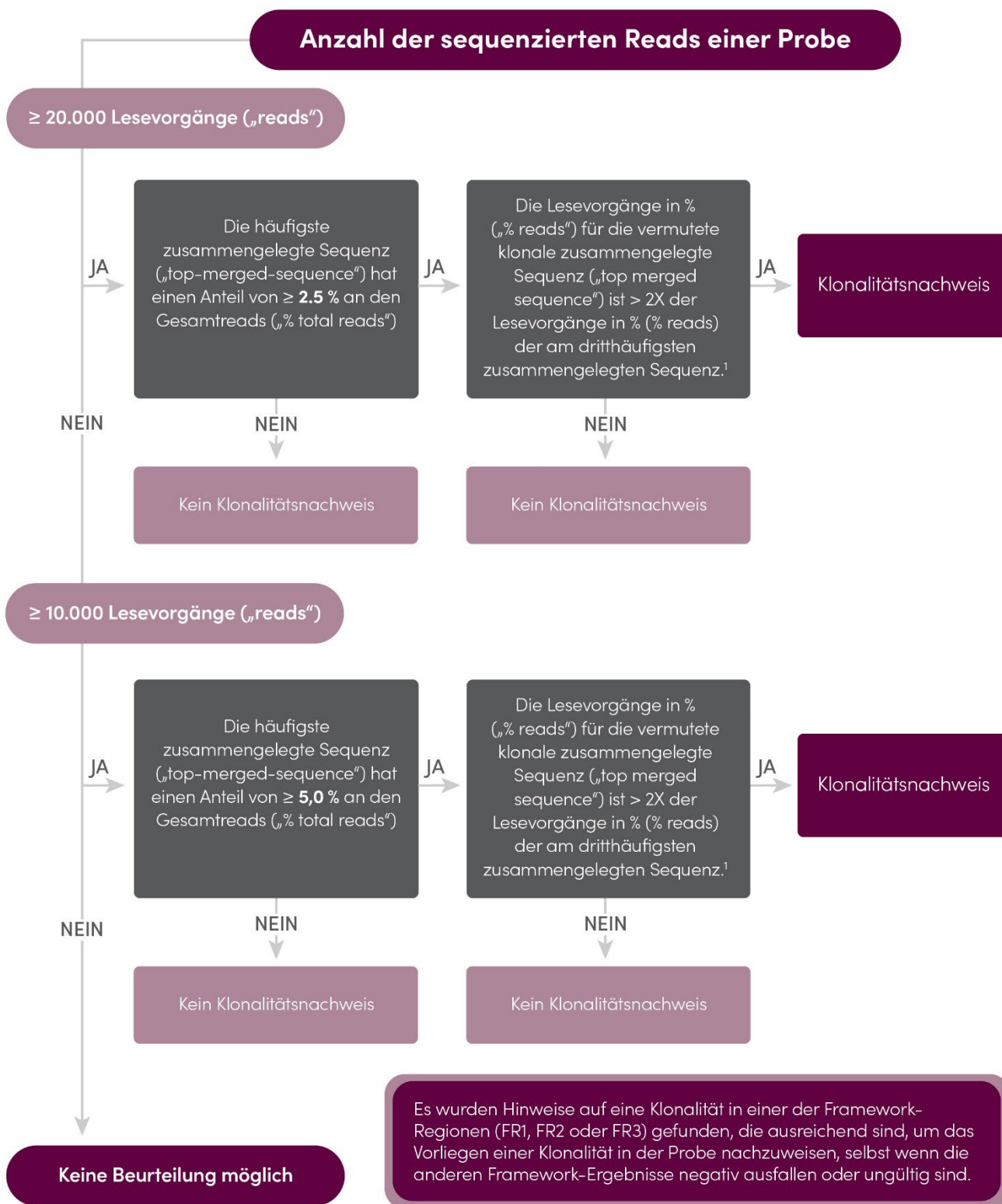
* Gehen Sie bei der Interpretation einer vermutlich klonalen Sequenz mit Vorsicht vor, wenn der Wert für ein V-, D- und/oder J-Gen „none“ (keine) lautet. Der Wert „none“ wird dann zugewiesen, wenn ein Alignment den Qualitäts-Mindestwert aufgrund eines dürftigen Alignments nicht erfüllt.

Zur Bestimmung der Klonalität einer Probe sind die Daten aller drei Framework-Regionen zu untersuchen. Es wurden Hinweise auf eine Klonalität in einer der Framework-Regionen (FR1, FR2 oder FR3) gefunden, die ausreichend sind, um das Vorliegen einer Klonalität in der Probe nachzuweisen, selbst wenn die anderen Framework-Ergebnisse negativ ausfallen oder ungültig sind.

Tabelle 16. Interpretationskriterien

Kriterium 1	Kriterium 2	Kriterium 3	Ergebnis
Die Gesamtzahl der Lesevorgänge pro Probe beträgt ≥ 20.000 .	Die am häufigsten zusammengelegte Sequenz hat einen Anteil von ≥ 2,5 % an den Gesamtlesevorgängen.	Die Lesevorgänge in % für die vermutete klonale zusammengelegte Sequenz betragen > 2X der Lesevorgänge in % der am dritthäufigsten zusammengelegten Sequenz. ¹	Klonalitätsnachweis ERBRACHT
		Die Lesevorgänge in % für die vermutete klonale zusammengelegte Sequenz betragen ≤ 2X der Lesevorgänge in % der am dritthäufigsten zusammengelegten Sequenz. ¹	Kein Klonalitätsnachweis erbracht
Die Gesamtzahl der Lesevorgänge pro Probe beträgt ≥ 10.000 und < 20.000 .	Die häufigste zusammengelegte Sequenz hat einen Anteil von ≥ 5,0 % an den Gesamtlesevorgängen.	Die Lesevorgänge in % für die vermutete klonale zusammengelegte Sequenz betragen > 2X der Lesevorgänge in % der am dritthäufigsten zusammengelegten Sequenz. ¹	Klonalitätsnachweis ERBRACHT
		Die Lesevorgänge in % für die vermutete klonale zusammengelegte Sequenz betragen ≤ 2X der Lesevorgänge in % der am dritthäufigsten zusammengelegten Sequenz. ¹	Kein Klonalitätsnachweis erbracht
Die Gesamtzahl der Lesevorgänge pro Probe beträgt < 10.000 .	Keine Angabe	Keine Angabe	Keine Beurteilung möglich

¹Die von der Software generierten Berechnungswerte werden für den Vergleich auf das nächste Zehntel eines Prozents gerundet.



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

Abbildung 4: Interpretation von Daten ausgehend von den Kriterien in Tabelle 16.

Nachdem Klonalität nachgewiesen wurde, können die Proben bei Bedarf mithilfe des LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assays – MiSeq auf Anzeichen einer somatischen Hypermutation (SHM) untersucht werden. Die SHM-Interpretationskriterien unten sind Vorschläge für den Einsatz der Immunglobulin-Gensequenzanalyse für die CLL-Prognose, die auf aktuellen Forschungsarbeiten basiert.⁶

Für die Interpretation der SHM können die beiden häufigsten zusammengelegten Sequenzen mithilfe der Klonalitätskriterien des vorangegangenen Abschnitts auf ihre Klonalität untersucht werden. Jede zusammengelegte Sequenz, bei der eine Klonalität festgestellt wird, kann anhand der unten aufgeführten SHM-Kriterien (das zugehörige Flussdiagramm befindet sich in Abbildung 5) beurteilt werden. Wenn der SHM-Mutationsstatus dem Grenzwert von 2 % entspricht bzw. ungefähr entspricht, führen Sie die Probe mit dem LymphoTrack Dx *IGHV* Leader Assay für somatische Hypermutation – MiSeq durch, der auf die vollständige *IGHV*-Gensequenz abzielt.

Tabelle 17. Empfohlene SHM-Interpretationskriterien

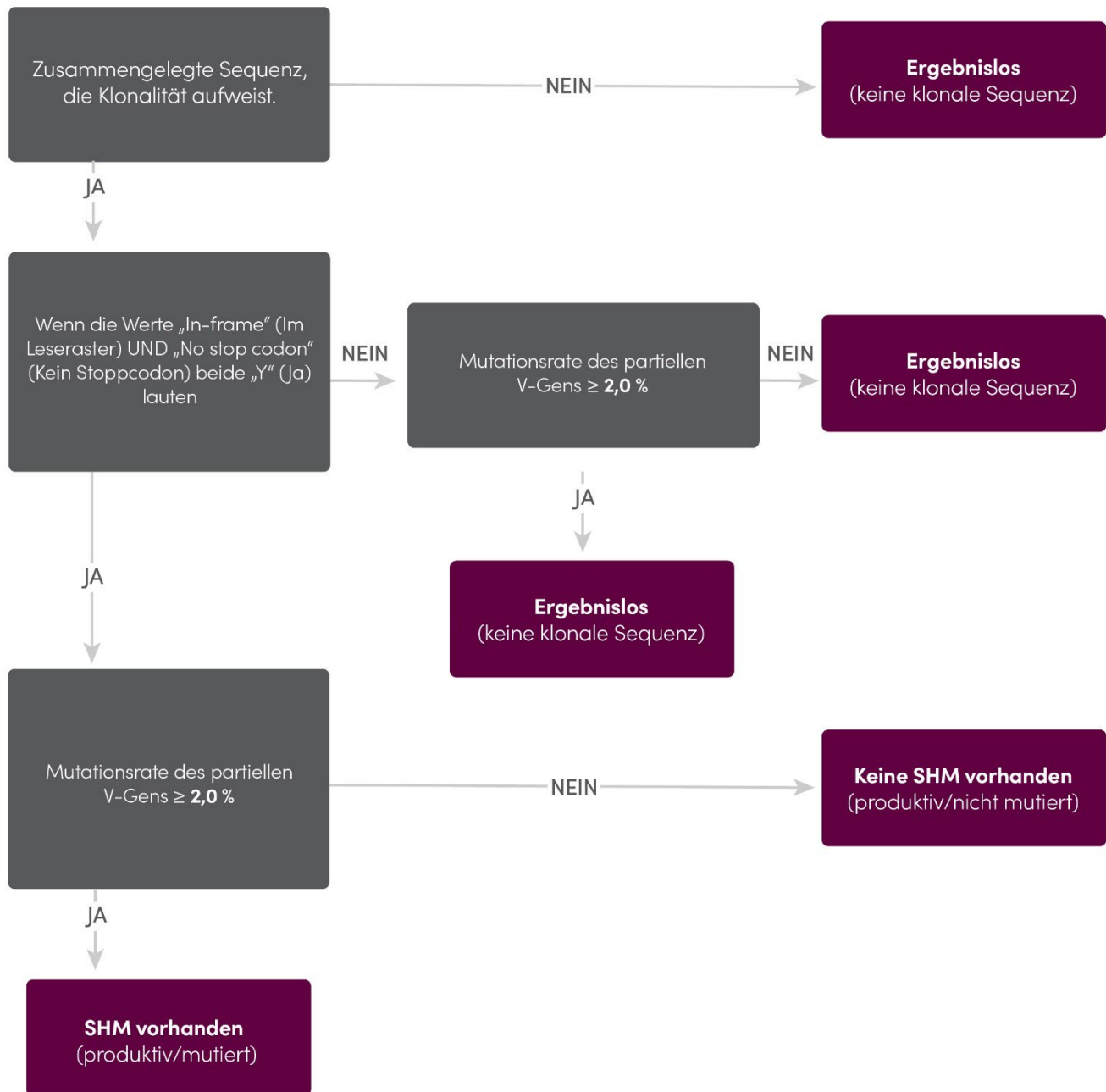
Kriterium 1	Kriterium 2	Kriterium 3	Ergebnis
Es gibt eine zusammengelegte Sequenz, die Anzeichen von Klonalität aufweist.	Wenn die Werte für „In-frame“ (Leseraster) UND „No stop codon“ (Kein Stoppcodon) beide „Y“ (Ja) lauten	Mutationsrate des partiellen V-Gens $\geq 2,0\%$	SHM VORHANDEN (produktiv/mutiert)
		Mutationsrate des partiellen V-Gens $< 2,0\%$	Keine SHM vorhanden (produktiv/nicht mutiert)
	Wenn einer der Werte (oder beide) „In-frame“ (Im Leseraster) ODER „No stop codon“ (Kein Stoppcodon) „N“ (Nein) lautet bzw. lauten	Mutationsrate des partiellen V-Gens $\geq 2,0\%$	Unschlüssig (unproduktiv/mutiert)
		Mutationsrate des partiellen V-Gens $< 2,0\%$	Unschlüssig (unproduktiv/nicht mutiert)
Es gibt keine zusammengelegte Sequenz, die Klonalität aufweist.	Keine Angabe	Keine Angabe	Unschlüssig (keine klonale Sequenz)

Liegen für eine Probe zwei zusammengelegte Sequenzen vor, die beide Anzeichen von Klonalität aufweisen, sollte jede anhand der Tabelle unten beurteilt werden, um das endgültige SHM-Ergebnis der Probe zu bestimmen.

Tabelle 18. Empfohlene SHM-Interpretationskriterien für doppelte Umlagerungen

Kriterium 1	Klonale Sequenz A	Klonale Sequenz B	Ergebnis
Doppelte Umlagerungen	SHM VORHANDEN (produktiv/mutiert)	SHM VORHANDEN (produktiv/mutiert)	SHM VORHANDEN
	SHM VORHANDEN (produktiv/mutiert)	Keine SHM vorhanden (produktiv/nicht mutiert)	Unschlüssig
	SHM VORHANDEN (produktiv/mutiert)	Unschlüssig (unproduktiv/mutiert)	SHM VORHANDEN
	SHM VORHANDEN (produktiv/mutiert)	Unschlüssig (unproduktiv/nicht mutiert)	SHM VORHANDEN
	Keine SHM vorhanden (produktiv/nicht mutiert)	Keine SHM vorhanden (produktiv/nicht mutiert)	Keine SHM vorhanden
	Keine SHM vorhanden (produktiv/nicht mutiert)	Unschlüssig (unproduktiv/mutiert)	Unschlüssig
	Keine SHM vorhanden (produktiv/nicht mutiert)	Unschlüssig (unproduktiv/nicht mutiert)	Keine SHM vorhanden
	Beliebige unschlüssig	Beliebige unschlüssig	Unschlüssig

Empfohlene SHM-Interpretationskriterien



Hinweis: Liegen für eine Probe zwei zusammengelegte Sequenzen vor, die beide Anzeichen von Klonalität aufweisen, sollte jede anhand von Tabelle 18 beurteilt werden, um das endgültige SHM-Ergebnis der Probe zu bestimmen.

Abbildung 5: Empfohlene Interpretation der somatischen Hypermutation (SHM) anhand datenbasierter Kriterien aus Tabelle 17.

12. Beispieldaten

LymphoTrack Dx Report for assay IGH_FR1

Sample name: FR1_positive_S23_L001_001_combined

Total Read Count: 460347

IndexQ30: 92.15

Caution: Do not edit fields and save.

Top 10 Merged Read Summary

Rank	Sequence	Length	Merge count	V-gene	J-gene	% total reads	Cumulative %	Mutation rate to partial V-gene (%)	In-frame (Y/N)	No Stop codon (Y/N)	V-coverage	CDR3 Seq
1	CATCTGGATAC	295	31266	IGHV1-46_03	IGHJ4_02	6.79	6.79	0.00	Y	Y	100.00	not found
2	GTCTCTGGATTCA	216	138	IGHV3-48_03	IGHJ4_02	0.03	6.82	0.00	n/a	N	35.24	GCGACAGACCGG
3	GCCTCTGGATTCA	272	136	IGHV3-74_01	IGHJ4_02	0.03	6.85	1.32	Y	Y	99.56	not found
4	GCCCTCTGGATTCA	231	130	IGHV3-23_04	IGHJ5_02	0.03	6.88	1.32	n/a	N	40.97	ATCTGCAAAATGAA
5	GCCTCTGGATTCA	272	130	IGHV3-48_01	IGHJ4_02	0.03	6.91	0.44	Y	Y	98.68	not found
6	GCGTCTGGATTCA	266	128	IGHV3-33_01	none	0.03	6.94	0.00	n/a	N	99.12	not found
7	GCGTCTGGATTCA	272	128	IGHV3-33_01	IGHJ4_02	0.03	6.96	0.00	Y	Y	100.00	not found
8	GCCTCTGGATTCA	293	124	IGHV3-21_02	IGHJ6_02	0.03	6.99	0.00	Y	Y	98.24	not found
9	GCCTCTGGATTCA	272	124	IGHV3-74_03	IGHJ4_02	0.03	7.02	3.08	Y	Y	98.68	not found
10	GCCTCTGGATTCA	281	124	IGHV3-23_04	IGHJ6_02	0.03	7.04	0.00	Y	Y	99.56	GCGAAAGGCCAA

Abbildung 6: Diese Tabelle wurde mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq erstellt und zeigt die 10 häufigsten Lesevorgänge der Lesevorgangszusammenfassung, zusammengelegt mit den 500 häufigsten Lesevorgängen. Lesevorgänge werden dann zusammengelegt, wenn sich lediglich 1 oder 2 Basenpaare (bp) voneinander unterscheiden. Sequenzen wurden mit dem **LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay – MiSeq** generiert und mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq (REF 95000009) analysiert.

LymphoTrack Dx Report for assay IGH_FR2

Sample name: FR2_positive_S22_L001_001_combined

Total Read Count: 94189

IndexQ30: 94.08

Caution: Do not edit fields and save.

Top 10 Merged Read Summary

Rank	Sequence	Length	Merge count	V-gene	J-gene	% total reads	Cumulative %	Mutation rate to partial V-gene (%)	In-frame (Y/N)	No Stop codon (Y/N)	V-coverage	CDR3 Seq
1	CGGGAAGGCCT	216	65	IGHV5-51_03	IGHJ4_02	0.07	0.07	N/A	Y	Y	100.00	GCGAGGTCTCGG
2	CGGGAAGGCCT	225	65	IGHV5-a_03	IGHJ4_02	0.07	0.14	N/A	Y	Y	100.00	GCGAGACAGGGT
3	CGGGAAGGCCT	225	64	IGHV5-51_01	IGHJ4_02	0.07	0.21	N/A	Y	Y	100.00	GCGAGACGGGGA
4	CGGGAAGGCCT	234	59	IGHV5-a_03	IGHJ6_02	0.06	0.27	N/A	Y	Y	100.00	GCGACCCGGTTT
5	CGGGAAGGCCT	231	58	IGHV5-51_01	IGHJ5_02	0.06	0.33	N/A	Y	Y	100.00	GCGAGACGCTCA
6	CGGGAAGGCCT	222	57	IGHV5-a_03	IGHJ5_02	0.06	0.39	N/A	Y	Y	100.00	GCGAGAGGGGCT
7	CGGGAAGGCCT	222	56	IGHV5-a_03	IGHJ5_02	0.06	0.45	N/A	Y	Y	100.00	GCGAGAACGGTA
8	CGGGAAGGCCT	228	55	IGHV5-51_01	IGHJ2_01	0.06	0.51	N/A	Y	Y	100.00	GCGAGACGGAAT
9	CGGGAAGGCCT	240	54	IGHV5-51_01	IGHJ5_02	0.06	0.57	N/A	Y	Y	100.00	GCGAGACTAGGG
10	AGGGAAGGACT	198	54	IGHV4-61_08	IGHJ6_01	0.06	0.62	N/A	Y	Y	97.08	not found

Abbildung 7: Diese Tabelle wurde mit LymphoTrack Dx Software – MiSeq erstellt und zeigt die 10 häufigsten Lesevorgänge der Lesevorgangszusammenfassung, zusammengelegt mit den 500 häufigsten Lesevorgängen. Lesevorgänge werden dann zusammengelegt, wenn sich lediglich 1 oder 2 Basenpaare (bp) voneinander unterscheiden. Sequenzen werden mit dem **LymphoTrack Dx IGH FR2 Assay – MiSeq** generiert und mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq (REF 95000009) analysiert.

LymphoTrack Dx Report for assay IGH_FR3

Sample name: FR3_positive_S23_L001_001_combined

Total Read Count: 467001

IndexQ30: 95.62

Caution: Do not edit fields and save.

Top 10 Merged Read Summary

Rank	Sequence	Length	Merge count	V-gene	J-gene	% total reads	Cumulative %	Mutation rate to partial V-gene (%)	In-frame (Y/N)	No Stop codon (Y/N)	V-coverage	CDR3 Seq
1	TCTGAGGACAGCG	104	60764	IGHV1-46_03	IGHJ4_02	13.01	13.01	N/A	Y	Y	100.00	GCTAGAGATCTCA
2	ACACGGCCGTGT	97	1632	IGHV3-72_01	IGHJ4_02	0.35	13.36	N/A	Y	Y	71.79	GCTAGAGATCTCA
3	ACACGGCCGTTTA	76	462	IGHV4-59_10	IGHJ3_02	0.10	13.46	N/A	Y	Y	100.00	GCGAGATCGTTCT
4	GTGGACACAGCC	95	343	IGHV3-70_12	IGHJ3_02	0.07	13.53	N/A	Y	Y	100.00	GCACACAGACTAG
5	GTGGACACAGCC	77	338	IGHV2-26_01	IGHJ3_02	0.07	13.61	N/A	Y	Y	100.00	GCACGGATTTCCT
6	ACACGGCTGTGT	82	256	IGHV4-39_02	IGHJ4_02	0.05	13.66	N/A	Y	Y	96.55	GCGAGAGAACTAA
7	GTGGACACAGCC	80	255	IGHV2-70_11	IGHJ4_02	0.05	13.72	N/A	Y	Y	100.00	GCACGGATGACCG
8	GTGGACACAGCC	77	252	IGHV2-70_12	IGHJ4_02	0.05	13.77	N/A	Y	Y	100.00	GCACACAGACTGC
9	GTGGACACAGCC	80	246	IGHV2-70_12	IGHJ4_02	0.05	13.82	N/A	Y	Y	100.00	GCACACAGACGG
10	GTGGACACAGCC	86	237	IGHV2-26_01	IGHJ3_02	0.05	13.87	N/A	Y	Y	100.00	GCACGGATGTCCT

Abbildung 8: Diese Tabelle wurde mit LymphoTrack Dx Software – MiSeq erstellt und zeigt die 10 häufigsten Lesevorgänge der Lesevorgangszusammenfassung, zusammengesetzt mit den 500 häufigsten Lesevorgängen. Lesevorgänge werden dann zusammengesetzt, wenn sich lediglich 1 oder 2 Basenpaare (bp) voneinander unterscheiden. Sequenzen werden mit dem LymphoTrack Dx IGH FR3 Assay – MiSeq generiert und mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq (REF 95000009) analysiert.

13. Leistungseigenschaften

Der LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay – MiSeq und ein herkömmlicher Kapillarelektrophorese-Assay (IdentiClone® IGH Gene Clonality Assay (Röhrchen A+B+C) – ABI-Nachweis, REF 91010061) wurden miteinander verglichen; die Übereinstimmung (prozentuale Gesamtübereinstimmung), die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) und die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) betrugen 92 % (60/65 Fälle), 93 % bzw. 89 %.

Tabelle 19. Vergleich zwischen dem LymphoTrack Dx IGH Assay – MiSeq und dem IdentiClone IGH Gene Clonality Assay (Genklonalitäts-Assay) – ABI

		IdentiClone IGH Gene Clonality-Assay (Genklonalitäts-Assay) – ABI	
		Klonal	Nicht klonal
LymphoTrack Dx IGH FR1 Assay – MiSeq	Klonal	52	1
	Nicht klonal	4	8

Die analytische Performance der LymphoTrack Dx IGH FR1 Assays – MiSeq wurde geprüft, indem Tonsillen-DNA mit klonaler Zelllinien-DNA gespikt und in verschiedenen Verdünnungsgraden untersucht wurde. Die Nachweisgrenze (LOD) lag bei einer DNA-Verdünnung von 5 %. Die höchsten prozentualen Lesevorgänge der Tonsillen-DNA betrugen < 0,1 %. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der linearen Regression lag bei einer DNA-Verdünnung zwischen 0 und 10 % bei > 0,97. Der Variationskoeffizient von 8 Läufen mit 2 Bedienern, 2 Reagenzienchargen und 2 Instrumenten betrug bei der Untersuchung einer DNA-Verdünnung von 5 % und 10 % weniger als 20 %.

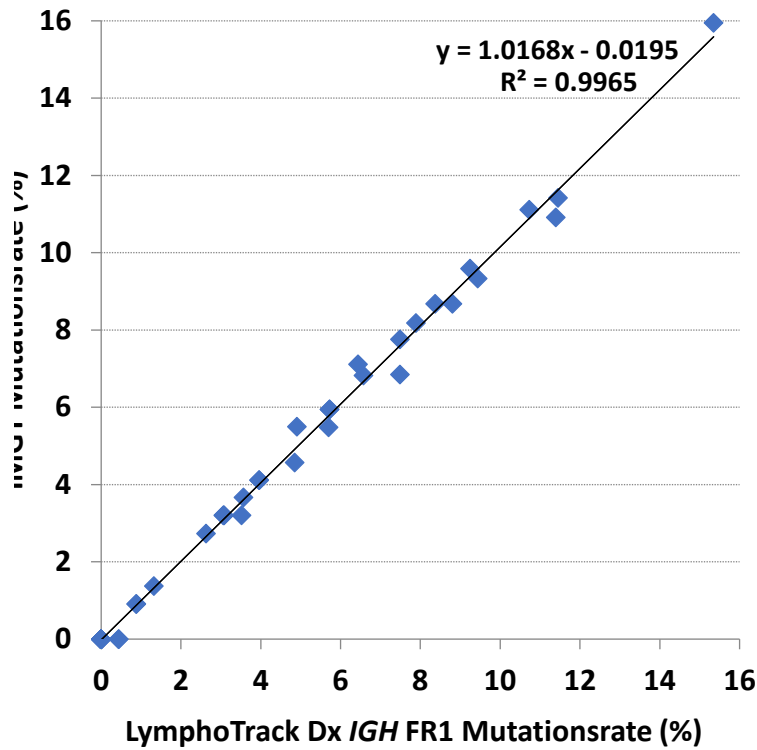


Abbildung 9: Vergleich der somatischen Hypermutationsrate (SHM) bei 51 CLL-Proben, ermittelt mit dem LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay – MiSeq und analysiert entweder mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq oder mittels IMGT-Analyse.

Tabelle 20. Vergleich des Testverfahrens für somatische Hypermutation (SHM) zwischen der LymphoTrack Dx Software – MiSeq und dem Kontrollverfahren (IMGT).

		IMGT	
		Mutiert	Nicht mutiert
LymphoTrack Dx Software – MiSeq	Mutiert	26	0
	Nicht mutiert	0	25

Die Analyse mit dem LymphoTrack Dx *IGH* FR1/2/3 Assay – MiSeq verbesserte die Erkennung klonaler Ereignisse im Vergleich zum LymphoTrack Dx *IGH* FR1 Assay – MiSeq alleine. Der LymphoTrack Dx *IGH* FR1/2/3 Assay – MiSeq und ein herkömmlicher Kapillarelektrophorese-Assay (IdentiClone® *IGH* Gene Clonality Assay (Tubes A+B+C) – ABI-Nachweis, [REF](#) 91010061) wurden miteinander verglichen; die Übereinstimmung (prozentuale Gesamtübereinstimmung), die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) und die negative prozentuale Übereinstimmung (NPA) betrugen 95 % (42/44 Fälle), 96 % bzw. 95 %.

Tabelle 21. Vergleich zwischen dem LymphoTrack Dx *IGH* FR1/FR2/FR3 Assay – MiSeq und IdentiClone *IGH* Gene Clonality Assay – ABI (Kontrollmethode)

		IdentiClone <i>IGH</i> Gene Clonality-Assay(Genklonalitäts-Assay) – ABI	
		Klonal	Nicht klonal
LymphoTrack Dx <i>IGH</i> FR1/2/3 Assay – MiSeq	Klonal	24	1
	Nicht klonal	1	18

14. Fehlersuche und -behebung

Tabelle 22. 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 (Bibliothekquantifizierungskit)	$\Delta Ct < 4,0$ $\Delta Ct = Ct (NTC) - Ct (Kontrolle)$	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 < 80 % für v2 (2x151)* %Q30 < 75 % für 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 die LymphoTrack Dx *IGH* (FR1/FR2/FR3) Assays – MiSeq entschieden haben. Wir schätzen Ihre Treue. Wir helfen Ihnen gerne, diese Assays 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 | Kundenbetreuung: sales@invivoscribe.com | Webseite: www.invivoscribe.com

16. Referenzen

1. Tonegawa, S. (1983). Somatic Generation of Antibody Diversity. *Nature* 302, 575–581.
 2. Ghia, P. *et al.*, (2007). ERIC recommendations on *IGHV* gene mutational status in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 21, 1–3.
 3. Trainor, KJ. *et al.*, (1990). Monoclonality in B-lymphoproliferative disorders detected at the DNA level. *Blood* 75, 2220–2222.
 4. Evans PA. *et al.*, (2007). Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 21, 207–14.
 5. Miller, JE. (2013). Principle of Immunoglobulin and T Cell Receptor Gene Rearrangement. In Cheng, L., Zhang, D., Eble, JN. (Eds), *Molecular Genetic Pathology* (2nd Ed., sections 30.2.7.13 and 30.2.7.18). New York, USA: Springer Science & Business Media.
 6. Langerak, AW. *et al.*, (2011) Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia* 25, 979–984.
- Invivoscribe LymphoTrack Dx Software – MiSeq Package Instructions for Use (**REF** 95000009)
 - <https://www.beckmancoulter.com>
 - <http://www.illumina.com>
 - <http://www.invitrogen.com>
 - <http://www.kapabiosystems.com>
 - <http://www.thermofisher.com>

17. Symbole

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

REF	Katalognummer		Verfallsdatum
VOL	Reagenzvolumen	EC REP	Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft
LOT	Chargennummer		Gebrauchsanweisung Beachten
	Lagerbedingungen	IVD	In-vitro-Diagnostikum
UDI	Eindeutige Gerätekennung		Hersteller
UK CA	UK-Konformität Geprüft	UKRP	Verantwortliche Person im Vereinigten Königreich
CH REP	Bevollmächtigter Schweizer Vertreter	CE	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. Konzessionen, die für die Durchführung von Amplifikationsverfahren oder für die Verwendung von Reagenzien, Amplifikationsenzymen oder entsprechender Ausstattung von Dritten erworben werden müssen, liegen in der Verantwortung des Benutzers. Invivoscribe, Inc. gewährt keine solchen Konzessionen, weder ausdrücklich noch stillschweigend.

©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* FR1/FR2/FR3 Assay – MiSeq: Kurzanleitung

1. Mit behandschuhten Händen Master-Mixe aus dem Gefrierschrank nehmen. Röhrcheninhalte auftauen lassen; zum Mischen leicht vortexen.
2. 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.
3. Geben Sie 0,2 µL Taq-DNA-Polymerase (bei 5 U/µL) zu jedem Master-Mix hinzu.
4. 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.
5. 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.
6. 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

7. PCR-Platte aus dem Thermocycler nehmen.
8. 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.
9. Quantifizieren Sie die Amplikons mit dem KAPA Library Quantification Kit (Bibliothekquantifizierungskit) gemäß Kit-Anweisungen. Verdünnen Sie die Amplikons im Verhältnis 1:4.000, bevor Sie mit dem qPCR-Verfahren fortfahren.
10. Gleiche Amplikonsmengen 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.
11. Die Bibliothek auf eine Konzentration von 12 pM für das MiSeq Reagenzkit v2 und 20 pM für das MiSeq-Reagenzkit v3 beim Multiplexing (MCS v2.6 oder neuer) denaturieren und verdünnen.
12. Geben Sie 600 µL der denaturierten und verdünnten Bibliothek in die MiSeq Reagent Cartridge (Reagenzkartusche).
13. Richten Sie ein MiSeq-Probenblatt ein und laden Sie das Probenblatt auf das Gerät hoch (falls erforderlich).
14. Starten Sie den MiSeq-Lauf.
15. Analysieren und visualisieren Sie die generierten 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 23 unten zeigt diese Unterschiede beim Verfahren im Überblick. Vollständige Anleitungen sind der Gebrauchsanweisung zum betreffenden LymphoTrack Dx Assay – MiSeq zu entnehmen.

Tabelle 23 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 Δ Ct-Wert = Ct (NTC) – Ct (Kontrolle)	Δ Ct $\geq$ 4,0	Δ Ct $\geq$ 4,0	Δ Ct $\geq$ 4,0	Δ Ct $\geq$ 4,0	Δ Ct $\geq$ 4,0	Δ Ct $\geq$ 4,0	Δ Ct $\geq$ 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 24 Zykluseinstellung 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

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

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 μL 2 nM am Ende von Schritt 20.3.

Tabelle 25. Berechnung der einzelnen Bibliothekseinsätze zur Erzeugung einer Sequenzierungsbibliothek mit mehreren Genzielen für den MiSeq-Lauf

Bibliothek		Volumen der einzelnen Bibliothek (μL)						
Assay-Name	Konzentration		Fall A	Fall B	Fall C	Fall D	Fall E	Fall F
	(nM)		n = 7	n = 6	n = 5	n = 4	n = 3	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

- Die kombinierten Bibliotheken auf 2 nM denaturieren.
 - Fügen Sie Reagenzien gemäß Tabelle 26 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 in Tabelle 25, mischen Sie zunächst die entsprechenden Bibliotheken und fügen Sie 18 μL zur denaturierenden Lösung hinzu, wie in der folgenden Tabelle gezeigt.

Tabelle 26. Denaturierung der Bibliothek

Reagenz	Volumen (µl)
<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)
Gesamt	20

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.

- 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.

- 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 27. Kurz vortexen, um die Bestandteile zu mischen, und die Probe dann pulszentrifugieren.

Tabelle 27. 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
Gesamt	1000 µL	1000 µL

- Geben Sie 600 µL der kombinierten denaturierten Bibliothek aus dem vorangegangenen Schritt in eine MiSeq Reagent Cartridge (Reagenzkartusche).
- Richten Sie ein MiSeq-Probenblatt ein und laden Sie das Probenblatt auf das Gerät hoch (falls erforderlich).
- Starten Sie den MiSeq-Lauf.
- Analysieren und visualisieren Sie die generierten Daten mit der LymphoTrack Dx Software – MiSeq.