

INSTRUCCIONES PARA EL USO DE OG-TP53

OG-TP53

**KIT “READY-TO USE” PARA LA GENERACIÓN DE LIBRERÍAS MEDIANTE
AMPLICONES PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE NGS CON SISTEMAS ILLUMINA®
DEL GEN TP53**



RUO

Sólo para su uso en investigación

Protocolo versión 2 , abril 2019

INDICE

1.	GLOSARIO DE TÉRMINOS	4
2.	ANTECEDENTES Y USO PREVISTO	5
3.	CONTENIDO Y CONSERVACIÓN	6
4.	MATERIAL REQUERIDO NO SUMINISTRADO EN ESTE KIT	7
4.1.	Reactivos requeridos no suministrados	7
4.2.	Equipamiento	7
5.	RECOMENDACIONES PARA TRABAJAR CON PCR.....	8
6.	RECOMENDACIONES PARA EL MANEJO DE LA LIBRERÍAS Y SU SECUENCIACIÓN	8
7.	MUESTRAS.....	9
8.	PROTOCOLO	9
8.1.	Amplificación de las regiones diana.....	9
8.2.	Reacción de marcado con Barcodes e inclusion del resto de secuencias para la reacción de NGS.....	10
8.3.	Utilización de los <i>barcodes</i>	11
8.4.	Comentarios.....	12
9.	SOLUCIÓN DE PROBLEMAS	12
10.	PROTOCOLO ABREVIADO PARA USUARIOS EXPERIMENTADOS.....	13
10.1.	Reacción 1: Amplificación de las regiones de interés.	13
10.2	Reacción 2: Etiquetado con barcodes e inclusión del resto de secuencias requeridas para la reacción de NGS con sistema Illumina®	13
11.	RECOMENDACIONES PARA LA SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS.	14

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS

	Estable hasta YYYY/MM		Temperatura de almacenamiento
	Fabricante		Instrucciones para el uso
	Referencia:	RUO	Uso exclusivo para investigación
	Código de lote		

INFORMACIÓN PARA PEDIDOS:

Online: www.seqplexing.com

Email: info@seqplexing.com

REFERENCIAS RELACIONADAS

- OG-TP53-24, OG-TP53-96 (kits para 24 y 96 muestras respectivamente; INCLUYEN BARDOCES)
- OG-TP53-NB-24, OG-TP53-NB-96 (kits para 24 y 96 muestras respectivamente; NO INCLUYEN BARDOCES)
- OG-BC-01, OG-BC-02, OG-BC-03, OG-BC-04 (BARCODES: 24 combinaciones por referencia; para combinaciones de barcodes superiores a 96, preguntar en info@seqplexing.com).

2. ANTECEDENTES Y USO PREVISTO

En los últimos años, en tumores de diferente naturaleza se han identificado numerosas alteraciones genéticas que afectan a la respuesta al tratamiento, la evolución y el pronóstico del tumor y del paciente. Recientemente, se han desarrollado fármacos contra el cáncer cuya eficacia aumenta o disminuye considerablemente dependiendo de la presencia de ciertas mutaciones somáticas en los diferentes tumores. Por lo tanto, la necesidad de saber si un tumor presenta determinadas mutaciones importantes para el tratamiento ha hecho que el estudio de estas mutaciones sea esencial y muchas veces obligatorio para poder establecer dicho tratamiento. Así muchos fármacos requieren de estudios genéticos específicos para poder ser utilizados. Para llevar a cabo estos estudios, el ADN debe obtenerse de tejido tumoral, generalmente incluido en parafina. La inclusión en parafina produce la alteración y fragmentación del ADN, por lo que se requieren técnicas específicas para trabajar con este material genético.

Por otro lado, las mutaciones somáticas en los tumores se pueden encontrar en una proporción baja con respecto al ADN normal. Esto puede deberse a la presencia de una pequeña proporción de células tumorales en la muestra, a una pequeña proporción de células con la mutación, o a ambas. Pudiendo ser detectadas con nuestros kits desde el 1% de las copias del ADN analizado.

Nuestros kits OncoGenBasic (OGB) se basan en la generación de librerías por amplicones mediante dos PCRs consecutivas, que Seqplexing ha optimizado (Figura 1). El protocolo es sencillo y requiere poco trabajo manual, además, permiten utilizar el primer producto de PCR directamente en la segunda reacción, **sin purificación ni cuantificación del producto de PCR**. El producto final está listo para realizar la reacción de secuenciación con un sistema NGS de Illumina® mediante reacciones de paired-end (PE) de 150 pb y utilizando oligos Nextera para la secuenciación (Figura 2). Los Kits OGB producen prácticamente solo productos específicos (superior al 98%) evitando diferentes problemas en el análisis que pueden producir los productos inespecíficos o artefactuales (productos en regiones no deseadas, productos de PCR de tamaño pequeño o productos de PCR que incluyen varios amplicones). El kit OGB para TP53 (OG-TP53) permite la amplificación de todas las regiones de interés del gen TP53 en solo dos reacciones de PCR consecutivas.

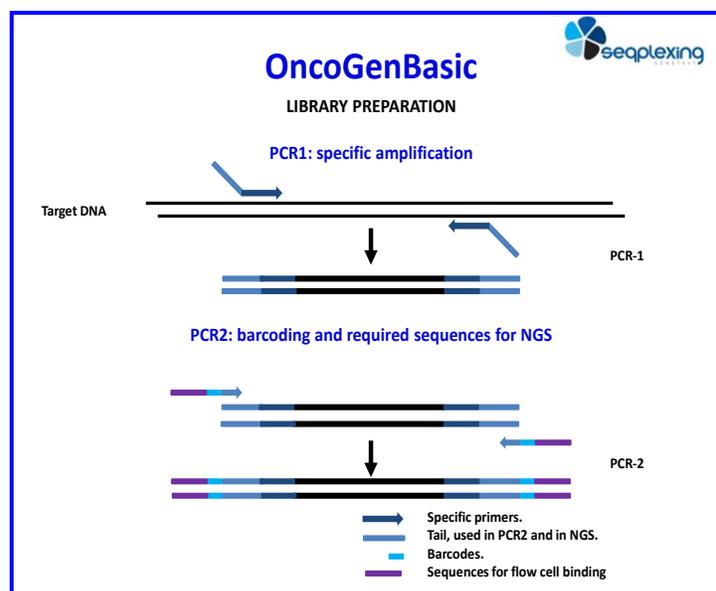


Figura 1: Esquema del proceso de generación de las librerías mediante amplicones usado en OGB kits. Los productos de la PCR1 se utilizan directamente en la PCR2, sin necesidad de purificar.

Nuestros kits OG permiten detectar todas las mutaciones puntuales en más del 1% del ADN de las copias presentes en las regiones analizadas. El análisis de las librerías se realiza mediante la secuenciación de los amplicones obtenidos por el sistema MiSeq u otros sistemas Illumina® utilizando la secuenciación 150x2 (secuenciación PE). Por lo tanto, el kit se puede utilizar para la detección de mutaciones somáticas y germinales, requiriéndose diferente profundidad para cada aplicación: 1000x mínimo para somáticas y 100x para mutaciones germinales. El kit OG-TP53 permite detectar las mutaciones puntuales presentes en todas las regiones codificantes del gen TP53 y las regiones importantes para el empalme o “splicing” en los extremos de los exones e intrones que pueden tener interés científico y/o clínico (Figura 2). Las secuencias de referencia utilizadas son SwissProt P04637, NC_000017.10, NM_000546 y ENST00000269305.8 (GRCh38.p12).

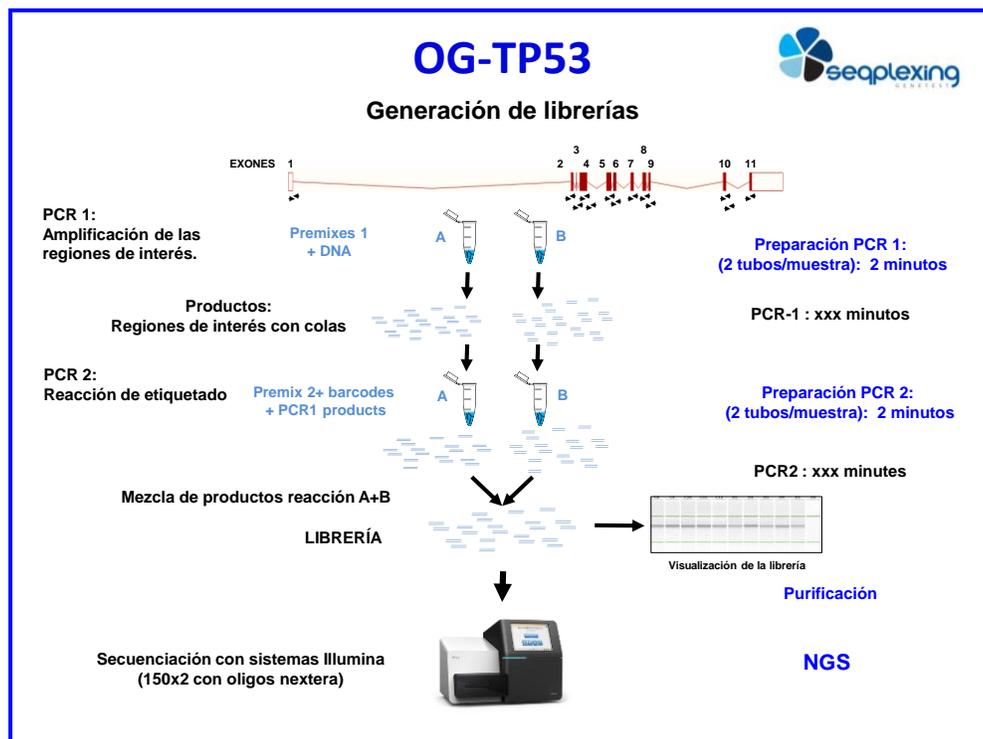


Figura 2. Representación esquemática del gen TP53, de las regiones analizadas y del proceso necesario para obtener las librerías de NGS.

3. CONTENIDO Y CONSERVACIÓN

El kit OG-TP53 incluye reactivos para 24 o 96 muestras que permiten la amplificación y la generación de librerías para el análisis de las regiones de interés. Los reactivos son suficientes para realizar:

- Reacción de amplificación (dos reacciones): la reacción de amplificación específica que genera los amplicones para todas las regiones de interés en TP53 e incluye colas específicas en los extremos.
- Reacción de etiquetado o “barcoding”: reacción utilizando las colas introducidas para generar librerías completas para la secuenciación Illumina® e incluyendo los *barcodes* (códigos de barras o marcadores) para la identificación de muestras. Los *barcodes* permiten la identificación de 24 o 96 muestras, disponemos de kits que incluyen los barcodes (ref: OG-TP53-24, OG-TP53-96) y otros que requieren que se compren por separado (ref: OG-TP53-NB-24, OG-TP53-NB-96).

Los productos finales incluyen las regiones necesarias para llevar a cabo la secuenciación con el Sistema Illumina® (utilizando cebadores Nextera).

El kit consta de:

- PCR1-Mix A: 1 o 4 tubos (kits para 24 o 96 muestras, respectivamente) con todos los reactivos necesarios para amplificar la mitad de las regiones de interés. Cada tubo contiene un volumen de mezcla 1 suficiente para dispensar 12 µl por muestra, para 24 muestras.
- PCR1-Mix B: 1 o 4 tubos (kits para 24 o 96 muestras, respectivamente) con todos los reactivos necesarios para amplificar la otra mitad de las regiones de interés. Cada tubo contiene un volumen de mezcla B suficiente para dispensar 12 µl por muestra, para 24 muestras.
- Mix de PCR2: 1 o 4 tubos (kits para 24 o 96 muestras, respectivamente) con todos los reactivos necesarios para la reacción de marcaje excepto los *barcodes* (deben ser comprados por separado).

El kit debe almacenarse a -20°C desde la recepción.

4. MATERIAL REQUERIDO NO SUMINISTRADO EN ESTE KIT

Este punto muestra la lista de todos los materiales y equipos necesarios que no se suministran con el kit.

4.1. Reactivos requeridos no suministrados

- Juego de barcodes disponibles para la Reacción de Etiquetado (Ver referencias: OG-BC-01, OG-BC-02, OG-BC-03, OG-BC-04), necesarios para las referencias OG-TP53-NB.
- Kits de extracción de ADN a partir de diferentes tipos de muestras. Para la extracción de parafina se pueden utilizar el kit de preparación de muestras de ADN cobas® (cobas® DNA Sample Preparation Kit, Roche), el kit de aislamiento de ADN FFPET de High Pure (High Pure FFPET DNA Isolation Kit, Roche) o el kit de purificación Maxwell® 16 LEV RNA FFPE (Maxwell® 16 LEV RNA FFPE Purification Kit, Promega). Para la extracción de sangre o células, se han probado los kits de Maxwell® y los kits específicos de Qiagen con buenos resultados. Se pueden utilizar otros kits aplicables a NGS pero se debe verificar si causan alteraciones en el ADN que puedan afectar el resultado.
- Kits de purificación MagSi-NGS PREP (MagnaMedics, Ref: MD60021,) o Ampure (AgencourtAMPure XP, BeckmanCoulter, Ref: A63880).
- Kits para cuantificación por fluorimetría con el sistema QuantiFluor™ dsDNA System (Promega).
- Reactivos de MiSeq para secuenciar con oligos Nextera: kits de secuencia de 300 pb que permiten la secuenciación de PE de 150 bpx2 más la lectura de *barcodes* en ambos extremos.

4.2. Equipamiento

- Termociclador de 96 pocillos con tapa térmica para tubos o placas de 200 µl de volumen. El protocolo se ha utilizado en termocicladores de AppliedBiosystems-ThermoFisher y de Eppendorf.
- Pipetas para volúmenes entre 1 y 100 µl (se recomienda 0.5 a 10, otra de 2-20 y otra de 10-100 o hasta 200 µl).
- Centrífuga para tiras, tubos o placas de 200 µl.
- Sistema de electroforesis que permita analizar las librerías obtenidas: gel de agarosa, Bioanalizador (Agilent Technologies), Qiaxcel® (Qiagen), etc.
- Fluorímetro (necesario para calcular la concentración de ADN de doble cadena con QuantiFluor™ antes de continuar con el procedimiento de secuenciación).

- Sistema MiSeq (Illumina®) u otros sistemas Illumina® que permiten la secuenciación de PE de 150 pb y el código de barras dual (lecturas de 150x2).

5. RECOMENDACIONES PARA TRABAJAR CON PCR

El sistema desarrollado es muy sensible al permitir la detección de variantes presentes en bajas proporciones y trabajar con cantidades muy pequeñas de ADN, por lo que puede detectar cualquier contaminación entre las muestras o con los productos de reacción. Por lo tanto, siempre se debe evitar cualquier fuente de contaminación y las muestras no deben estar contaminadas entre ellas.

- a) Verificar que todo lo necesario esté disponible.
- b) Área de Pre-PCR: donde nunca se trabajará con productos de PCR para evitar contaminar las muestras o reacciones de PCR con estos productos. Debe haber micropipetas específicas para esta área (nunca deben usarse con productos de PCR).
- c) Área Post-PCR: los productos de PCR deben manejarse en áreas específicas que sean fáciles de limpiar y diferentes del área de preparación de la PCR. Las micropipetas deben ser específicas para esta área y los guantes y la ropa que se usan en esta área no deben usarse en otras áreas de laboratorio, especialmente en la Pre-PCR.
- d) Antes de comenzar cualquier experimento, el área de trabajo y todas las superficies del material presente en esta área (pipetas, banco, campana, bastidores, etc.) deben limpiarse con productos para la eliminación del ADN.
- e) Identificar las placas, tubos o tiras que se utilizarán. Pueden identificarse por las coordenadas de las placas e identificando la placa.
- f) Siempre se deben usar puntas de pipeta con filtro y libres de ADN y DNAsas.
- g) Utilizar guantes limpios en cada procedimiento de amplificación (área Pre-PCR), si se toca material de otra área del laboratorio, se deben de cambiar los guantes.
- h) Evitar tocar el interior de los tapones de tubos y tapas, muestras, diluciones, etc.
- i) Se explica el procedimiento para usar todo el kit en un solo experimento, pero se puede subdividir utilizando menos muestras. Para esto hay que tener en cuenta que siempre se debe incluir al menos un control negativo en cada experimento.
- j) La secuenciación de las librerías obtenidas con este kit se puede realizar en combinación otras librerías obtenidas con kits OncoGenBasic de Seqplexing.

6. RECOMENDACIONES PARA EL MANEJO DE LA LIBRERÍAS Y SU SECUENCIACIÓN

Siga las instrucciones del sistema de secuenciación de Illumina® seleccionado para los amplicones. Nuestras recomendaciones son:

- Desechar aquellas librerías que tengan bandas intensas de 150 pb o de menor tamaño (posiblemente sean dímeros de primers y no se hayan amplificado correctamente). Estas librerías producirán una reducción en las lecturas útiles y modificarán la concentración del *pool*.
- Purificar las librerías obtenidos con MagSi-NGS PREP (MagnaMedics) o Ampure (AgencourtAMPure XP, BeckmanCoulter) siguiendo sus instrucciones.

- Es necesario colocar la misma cantidad de librería de cada muestra, por lo que es importante cuantificar el producto purificado. El sistema QuantiFluor™ dsDNA System (Promega) puede ser utilizado, de acuerdo con los procedimientos estándar. El sistema GloMax®-Multi Detection System (Promega) también se puede utilizar como método de cuantificación.
- Ajustar la concentración a 10 nM (1,9 ng / µl) de cada muestra con un 0,1% de Tris-Tween 20 (preparado según las indicaciones de Illumina®). En el cálculo de las lecturas que se obtendrán por muestra, se debe considerar que se analizan 20 amplicones.
- Las muestras amplificadas con otros kits OG se pueden secuenciar simultáneamente. Para facilitar este procedimiento, Seqplexing puede facilitar las páginas de cálculo para mejorar la distribución de lectura precisa entre muestras.
- Agregar 5 µl de cada muestra en un tubo limpio (no incluya control negativo o muestras que no hayan sido amplificadas correctamente).
- Mezclar bien con un vórtex durante 1 minuto. Esta librería se puede almacenar congelada a -20°C para usarla otro día.
- Para llevar a cabo la secuenciación, se utilizan las indicaciones del Sistema Illumina®.

TODO EL PROCESO DE PURIFICACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA SECUENCIACIÓN DEBEN SEGUIR LAS INDICACIONES DE LOS PROTOCOLOS DE ILLUMINA® Y LA REACCIÓN DE LA SECUENCIACIÓN CON PRIMERS NEXTERA. EL ANÁLISIS DEBE REALIZARSE DE ACUERDO CON ESTOS PROTOCOLOS. LOS *BARCODES* DE NUESTROS KITS CORRESPONDEN A LA NUMERACIÓN Y SECUENCIA UTILIZADA POR ILLUMINA®.

7. MUESTRAS

El kit está diseñado para el análisis de ADN procedente de muestras incluidas en parafina y de otras fuentes, como muestras de sangre. Es especialmente relevante la fragmentación del ADN, así cuanto más íntegro esté el ADN menor cantidad de ADN es necesaria, puesto que existen más copias efectivas de ADN. Un ADN extremadamente fragmentado podría no ser amplificable. Nuestros estudios con numerosas muestras indican que la cantidad de ADN mínima requerida es de 5 ng/reacción pero podría ser inferior/superior según el estado del ADN.

Recomendamos la cuantificación del ADN de partida con el sistema QuantiFluor™ dsDNA System (Promega) o un método fluorométrico similar. El sistema GloMax®-Multi Detection System (Promega) también se puede utilizar como método de cuantificación. El kit admite un amplio rango de concentraciones, recomendamos trabajar con concentraciones entre 5 y 100 ng/µl.

8. PROTOCOLO

8.1. Amplificación de las regiones diana

Se deben utilizar los tubos, pocillos o placas necesarios para ajustar el número de reacciones deseado. Cada muestra debe amplificarse inicialmente en 2 tubos separados (uno con PCR1-Mix A y el otro con PCR1-Mix B), también se deben utilizar estos 2 tubos para los controles utilizados. Ver figura 2.

¡IMPORTANTE! ¡NUNCA MEZCLAR EL CONTENIDO DE LOS TUBOS PCR1-MIX 1 Y PCR1-MIX 2!

Si va a analizar muchas muestras, es conveniente colocar varios controles negativos.

- 8.1.1. Descongelar los tubos con PCR1-Mix A y B. Vórtex durante 5 segundos y centrifugue durante 5 segundos (verifique que todo el volumen esté en la parte inferior).
- 8.1.2. Preparar y marcar (o etiquete) tubos, tiras o placas de PCR. Se utilizarán 2 tubos / pocillos para cada muestra (uno para cada Mix de PCR1).
- 8.1.2.1. Distribuir 12 µl de PCR1-Mix A en tantos tubos como muestras más los controles.
- 8.1.2.2. Distribuir 12 µl de PCR1-Mix B en tantos tubos como muestras más los controles.
- 8.1.3. Agregar 3 µl de ADN genómico (entre 5 y 100 ng totales) a los pocillos con PCR1-Mix A y B.
- 8.1.4. Agregar 3 µl de agua en las reacciones de control negativo (PCR1-Mix A y B).
- 8.1.5. Cerrar los tubos, tiras o placas con la tapa correspondiente.
- 8.1.6. Centrifugar 10 segundos. Verifique que todo el volumen esté en la parte inferior y que no haya burbujas.
- 8.1.7. Colocar en el termociclador y utilice el siguiente programa de PCR:

PASO	Temp. (°C)	Tiempo (segundos)	CICLOS
Activación	98	900	1
Amplificación	98	30	25
	55	60	
	60	60	
	65	60	
	70	60	
Extensión final	70	1200	1
Conservación	4-10	∞	1

Una vez que finalice la primera reacción de amplificación, el producto obtenido se utilizará como molde para la reacción de marcado o barcoding SIN PURIFICARLO (el protocolo está optimizado para utilizar el producto de esta PCR sin purificar).

El producto obtenido se puede guardar a 4º o -20º hasta su utilización.

8.2. Reacción de marcado con Barcodes y con el resto de secuencias para la reacción de NGS.

LA SEGUNDA REACCIÓN DE PCR TAMBIÉN SE REALIZA EN 2 REACCIONES SEPARADAS, POR LO QUE CADA MUESTRA DEBE AMPLIFICARSE EN DOS TUBOS USANDO LA MISMA COMBINACIÓN DE BARCODES PARA CADA MUESTRA. Ver figura 2.

- 8.2.1. Descongelar el tubo de Mix PCR2-TP53. Mezcle bien y centrifugue a la velocidad máxima durante 5 segundos (verifique que todo el volumen esté en la parte inferior y que no haya burbujas).
- 8.2.2. Dispensar 12 µl de la Mix de PCR2-TP53 en cada tubo o pocillo donde se analizará una muestra (1 para la reacción A de la PCR1 y otro para la B de cada muestra y controles).
- 8.2.3. Agregar 2 µl de la mezcla de *barcode* seleccionado para cada muestra (incluye combinación 5' y 3') a cada tubo o pocillo. ATENCIÓN: DEBE USARSE LA MISMA COMBINACIÓN PARA UNA MUESTRA EN LOS DOS POCILLOS Y TIENE QUE SER DIFERENTE DE LAS OTRAS MUESTRAS. Ver recomendación de Combinaciones de Código de Barras (punto 8.3).
- 8.2.4. Agregar 1 µl del producto de la PCR1-Mix A al pocillo /tubo de la reacción PCR2-TP53- Mix A.
- 8.2.5. Añadir 1 µl del producto de la PCR1-Mix B al pocillo /tubo de la reacción PCR2-TP53- Mix B.

- 8.2.6. Añadir 1 µl de agua de PCR1-Mix en las reacciones de control negativo.
- 8.2.7. Cerrar los tubos, tiras o placas con la tapa correspondiente.
- 8.2.8. Centrifugar 5 segundos. Verifique que todo el volumen esté en la parte inferior y que no haya burbujas.
- 8.2.9. Colocar en el termociclador y utilice el siguiente programa de PCR

PASO	T (°C)	TIEMPO (SEGUNDOS)	CICLOS
Activación	95	900	1
Amplificación	98	20	38
	60	30	
	72	60	
Extensión final	72	600	1
Conservación	15	∞	1

8.2.10. Una vez que finaliza la reacción de amplificación, los productos de cada muestra se visualizan combinando las dos reacciones (A+B de la PCR2) o de forma independiente. Las muestras y los controles amplificados se pueden analizar mediante diferentes sistemas (Qiaxcel, Bioanalyzer, geles de agarosa, etc.).

Brevemente: para el sistema Qiaxcel® (Qiagen) mezcle 2 µl del producto de PCR 2 para una muestra más 8µl de tampón de dilución. Hay que visualizar el resultado de la amplificación y continúe con las instrucciones. Para un gel de agarosa de alta sensibilidad: prepare 2-3% de agarosa de alta sensibilidad y 1% de agarosa normal, cargue 2 + 2 µl de cada producto de PCR (contienen las librerías) generados para cada muestra, 4 µl de tampón de carga y un marcador de tamaño de ADN entre 50 y 400. Se debe utilizar en un pocillo separado. La figura 3 muestra el aspecto de los productos de PCR que se deben de obtener.

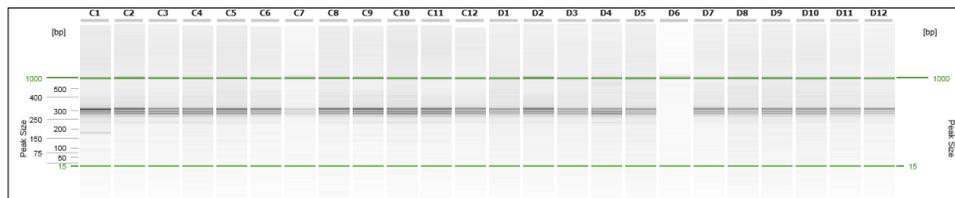


Figura 3: Ejemplo de los resultados obtenidos de la amplificación con muestras reales. Cada pocillo muestra el resultado de una de las 23 muestras y el control negativo (pocillo D6). El pocillo C1 tiene una pequeña cantidad de dímero, el pocillo C7 tiene una amplificación baja al tener una cantidad mucho menor de ADN de inicio que la recomendada, ambas son analizables por NGS. El resto de muestras se han amplificado correctamente.

Las librerías generadas pueden conservarse a 4º(horas o días) o -20ºC (días a meses) hasta su utilización.

8.3. Utilización de los *barcodes*.

Los *barcodes* permiten la identificación de 24 o 96 muestras, disponemos de kits que incluyen los *barcodes* (ref: OG-TP53-24, OG-TP53-96) y otros que requieren que se compren por separado (ref: OG-TP53-NB-24, OG-TP53-NB-96). En estos últimos kits (indicados como NB) para 24 muestras, se requiere la adquisición adicional de un kit de *barcodes* para 24 muestras (referencia OG-BC-01). En el caso de necesitar más de 24 *barcodes*, Seqplexing ofrece combinaciones de *barcodes* hasta 96 muestras (OG-BC-02, OG-BC-03, OG-BC-04); si se requiere un número mayor, preguntar en info@seqplexing.com.

8.4. Comentarios

- Utilizamos dos reacciones separadas para una muestra y reactivos específicos para reducir amplificaciones inespecíficas.
- Si el ADN se encuentra en las condiciones adecuadas, se observará una banda ancha de aproximadamente 250-300 pb o varias bandas cercanas, según la resolución del sistema, y no se observarán bandas diferentes de las anteriores.
- El control negativo no debe presentar bandas superiores a 200 pb, aunque se pueden ver bandas más pequeñas correspondientes al "dímero de cebador", normalmente alrededor de 100-150 pb.
- Si alguna muestra presenta sólo bandas por debajo de 150 pb o éstas son más intensas que las bandas de 250-300 bp, la muestra no debe ser analizada por NGS, ya que los productos de PCR obtenidos son principalmente dímeros de cebadores. Estos producirían un gran número de secuencias que no son útiles ya que solo contienen secuencias de cebadores.

9. SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

- 1) Ninguna banda está amplificada (en ningún caso) o solamente hay bandas correspondientes a dímeros y cebadores: verifique que todos los pasos del protocolo se hayan realizado correctamente y que la extracción de ADN haya funcionado correctamente.
- 2) Hay varias razones por las que una muestra no se amplifica:
 - a. La presencia de inhibidores o un fallo en la extracción de la muestra no permite la amplificación de los amplicones. Para resolverlo, es necesario repetir la extracción, o purificar el ADN ya obtenido para eliminar contaminantes, o realizar pruebas con muestras que se amplifican correctamente en otros protocolos de PCR. El kit permite trabajar con muestras extraídas de parafina y de otras fuentes. Las muestras de parafina generalmente se extraen sin ningún problema, aunque pueden dar más problemas que otros y se deben usar kits específicos. El kit OG-TP53 está verificado con el "kit de preparación de muestras de ADN cobas®" (Roche), el "kit de aislamiento de ADN FFPET de alta pureza" (Roche) y el kit de purificación de ADN LEV Tissue LEV de Maxwell 16.
 - b. La ausencia de amplificación en uno de los tubos y la presencia de amplificación en otros tubos, puede indicar que se realizó una extracción correcta. En este caso las muestras que fallan se debe a que no se ha obtenido suficiente material por un error concreto en esa muestra, que el material de partida estaba degradado o insuficiente.
- 3) El control negativo tiene bandas en la región de los amplicones obtenidos en las muestras: ha habido una contaminación en la reacción. Debe proceder a descontaminar todo el material utilizado en la preparación de la reacción de PCR y las áreas de trabajo, etc. y repetir la reacción con una o dos muestras y un control negativo para verificar que se ha solucionado el problema.

Cualquier pregunta o problema sobre los protocolos o resultados puede dirigirse a info@seqplexing.com y le responderemos lo antes posible.

10. PROTOCOLO ABREVIADO PARA USUARIOS EXPERIMENTADOS

10.1. Reacción 1: Amplificación de las regiones de interés.

PROCEDIMIENTO (24 o 96 reacciones). Cada muestra o control debe amplificarse por separado con Mix A y Mix B.

- 10.1.1. Descongelar los tubos con PCR1-Mix A y B. Mezcle bien cada tubo y centrifugue 5 segundos a la velocidad máxima.
- 10.1.2. Preparar y etiquetar/marcar tubos, tiras o placas de PCR. Se utilizarán 2 tubos o pocillos para cada muestra y control (uno para cada Mix de PCR1).
- 10.1.3. Distribuir 12 µl de cada premezcla de PCR1 en diferentes tubos/pocillos.
- 10.1.4. Agregar 3 µl de ADN genómico (entre 5 y 100 ng en total) a cada tubo/pocillo.
- 10.1.5. Agregar 3 µl de agua en los tubos de control negativo (uno para cada Mix de PCR1).
- 10.1.6. Cerrar los tubos/pocillos y centrifugue las mezclas de reacción durante 10 segundos a la velocidad máxima.
- 10.1.7. Cargue en el termocicladores y utilice el siguiente programa de PCR:

PASO	Temp. (°C)	Tiempo (segundos)	CICLOS
Activación	98	900	1
Amplificación	98	30	25
	55	60	
	60	60	
	65	60	
	70	60	
Extensión final	70	1200	1
Conservación	4-10	∞	1

10.2 Reacción 2: Etiquetado con barcodes e inclusión del resto de secuencias requeridas para la reacción de NGS con sistema Illumina®

LA SEGUNDA REACCIÓN DE PCR SE REALIZA TAMBIÉN EN 2 REACCIONES SEPARADAS, POR LO TANTO, CADA MUESTRA DEBE AMPLIFICARSE EN DOS TUBOS USANDO LA MISMA COMBINACIÓN DE *BARCODES*. Vea la figura 2.

- 10.2.1. Descongelar el tubo de Mix PCR2-TP53. Mezclar y centrifugar 5 segundos.
- 10.2.2. Dispensar 12 µl de la Mix de PCR2-TP53 en cada tubo o pocillo donde se analizará una muestra (1 para la reacción A de la PCR1 y otro para la B de cada muestra y controles).
- 10.2.3. Agregar 2 µl de la mezcla de *barcodes* seleccionado para cada muestra (incluye combinación 5' y 3') a cada tubo o pocillo. ATENCIÓN: DEBE USARSE LA MISMA COMBINACIÓN PARA UNA MUESTRA EN LOS DOS POCILLOS Y TIENE QUE SER DIFERENTE DE LAS OTRAS MUESTRAS. Ver recomendación de Combinaciones de Código de Barras (punto 8.3).
- 10.2.4. Agregar 1 µl del producto de la PCR1-Mix A al pocillo /tubo de la reacción PCR2-TP53- Mix A.
- 10.2.5. Añadir 1 µl del producto de la PCR1-Mix B al pocillo /tubo de la reacción PCR2-TP53- Mix B.
- 10.2.6. Añadir 1 µl de agua de PCR1-Mix en las reacciones de control negativo.
- 10.2.7. Cerrar los tubos, tiras o placas con la tapa correspondiente.
- 10.2.8. Centrifugar 5 segundos.
- 10.2.9. Coloque en el termociclador y utilice el siguiente programa de PCR:

PASO	Temp. (°C)	Tiempo (segundos)	Ciclos
Activación	95	900	1
Amplificación	98	20	38
	60	30	
	72	60	
Extensión final	72	600	1
Conservación	15	∞	1

10.2.10. Visualizar los resultados de cada muestra.

11. RECOMENDACIONES PARA LA SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las librerías obtenidas con nuestro kit deben purificarse y procesarse posteriormente de acuerdo con las indicaciones de Illumina®Systems (mediante una reacción de secuenciación de 150x2 o superior) utilizando cebadores NEXTERA. Algunas indicaciones generales son:

- Purificar los productos obtenidos con Ampure (AgencourtAMPure XP or BeckmanCoulter).
- Es importante no incluir en los siguientes pasos aquellas muestras que no presentan bandas correctas, especialmente si tienen bandas de ADN de tamaño más pequeño (posiblemente el primer dímero). Las muestras de estas características producirán una reducción en la calidad de los resultados y el número de lecturas válidas.
- Es necesario utilizar la misma cantidad de amplicones de cada muestra.
- Cuantificar el producto purificado con QuantiFluor™ dsDNA System según los procedimientos estándar.
- Ajuste la concentración a 10 nM (1.9 ng / µl) cada muestra con 0.1% de Tris-Tween 20. En el cálculo de las lecturas que se obtendrán por muestra, se debe considerar que se analizan 19 amplicones.
- Se pueden combinar muestras amplificadas con diferentes kits OG pero las proporciones deben ser ajustadas en función de varios parámetros. Para ello, Seqplexing facilita diferentes hojas de cálculo para que este ajuste sea lo más sencillo y fiable posible.