

# Panel de tumores sólidos TruNGS

*Versión 1.0*

(Un ensayo completo para tumores sólidos que detecta SNVs, Indels, CNVs y fusiones de ARN en 35 genes marcadores y puntos calientes en 6 genes PGx)



truNGS<sup>®</sup>

**Este producto está destinado exclusivamente a la investigación.**

## TruNGS® Panel de tumores sólidos 1.0

### USO PREVISTO

Este producto está destinado exclusivamente a la investigación. Este producto no está destinado al diagnóstico, prevención o tratamiento de una enfermedad o afección. 3B BlackBio Biotech India Ltd. no asume ninguna responsabilidad en relación con el uso del producto para aplicaciones para las que no está destinado. Este producto está diseñado para detectar SNVs, Indels, CNVs y fusiones de ARN en 35 genes marcadores y hotspots en 6 genes farmacogenómicos asociados a tumores sólidos como pulmón, gastrointestinal/colorrectal, mama, próstata y tumores cerebrales.

Este protocolo describe el flujo de trabajo utilizado con TruNGS® Solid Tumor Panel. El protocolo detalla el procedimiento para preparar bibliotecas de ADN a partir de ADN fijado en formol e incluido en parafina (FFPE) o ARN FFPE convertido en ADNc bicatenario, seguido de captura híbrida y enriquecimiento de dianas para secuenciación en plataformas de secuenciación de próxima generación (NGS) de Illumina.

**Este protocolo describe todo el flujo de trabajo en dos secciones separadas:**

**(A)** Protocolo de preparación de bibliotecas

**(B)** Protocolo híbrido de captura y enriquecimiento de dianas

## CONTENIDO DEL KIT

Nombre	Componentes		Almacenamiento
Preparación de bibliotecas TruNGS	Frag/End Repair Buffer (Tubo 1)	Cuadro 1.1	-20°C
	Enzimas reparadoras Frag/End (Tubo 2)		
	Adaptadores TruNGS® (Tubo 3)		
	Mezcla maestra de ligación (tubo 4)		
	TruNGS® AMP Mix 1 (2x) (Tubo 6)		
	Cartillas TruNGS® UDI		
	Perlas de purificación de ADN (Tubo 5)	Cuadro 2.1	2-8°C
Captura híbrida TruNGS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mezcla de hibridación (Tubo 7)</li> <li>• Panel de ADN TruNGS® (Tubo 8)</li> <li>• Panel de ARN TruNGS® (Tubo 9)</li> <li>• Solución bloqueante (Tubo 10)</li> <li>• Bloqueador TruNGS® (Tubo 11)</li> <li>• Potenciador de la hibridación (Tubo 12)</li> </ul>	Cuadro 1.2	-20°C
Perlas de unión a estreptavidina y tampones de lavado (captura híbrida)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perlas de unión a estreptavidina (tubo 13)</li> <li>• Tampón de unión (Tubo 14)</li> <li>• Tampón de lavado A (Tubo 15)</li> <li>• Tampón de lavado B (Tubo 16)</li> </ul>	Cuadro 2.2	2-8°C
Enriquecimiento de objetivos TruNGS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cebadores de amplificación (Tubo 17)</li> <li>• TruNGS® Amp Mix 2 (2x) (Tubo 18)</li> </ul>	Cuadro 1.3	-20°C
Perlas de purificación de ADN (Enriquecimiento de objetivos)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perlas de purificación de ADN 2 (Tubo 19)</li> </ul>	Cuadro 2.3	2-8°C

## (A) PROTOCOLO DE PREPARACIÓN DE BIBLIOTECAS

### COMPONENTES DEL PROTOCOLO

Lea atentamente el embalaje del producto y las recomendaciones de almacenamiento y guarde los componentes según las recomendaciones inmediatamente después de su llegada.

Nombre	Componentes		Almacenamiento
Preparación de bibliotecas TruNGS	Frag/End Repair Buffer (Tubo 1)	Cuadro 1.1	-20°C
	Enzimas reparadoras Frag/End (Tubo 2)		
	Adaptadores TruNGS® (Tubo 3)		
	Mezcla maestra de ligación (tubo 4)		
	TruNGS® AMP Mix 1 (2x) (Tubo 6)		
	Cartillas TruNGS® UDI		
	Perlas de purificación de ADN (Tubo 5)	Cuadro 2.1	2-8°C

### MATERIALES SUMINISTRADOS POR EL USUARIO

Los siguientes materiales o sus equivalentes son necesarios para generar bibliotecas utilizando el Kit de preparación de bibliotecas TruNGS® 1.0.

Producto	Proveedor sugerido
Etanol (200 Proof)	
Agua de calidad para biología molecular/Agua libre de nucleasas	
10 mM Tris-HCl pH 8 (Opcional)	
Buffer EB (Opcional)	Qiagen
Tubo de centrifuga de 1,5 ml, unión baja	
1,5 ml de filamento magnético compatible	
Tubos PCR de pared fina de 0,2 ml	
Tubos en tiras de 0,2 ml con tapones/Placas PCR de 96 pocillos y selladores	
Placa magnética compatible de 96 pocillos	
Ensayo de cuantificación de amplio rango Qubit dsDNA	Thermo Fisher Scientific
Ensayo de cuantificación de alta sensibilidad Qubit dsDNA	
Kit Agilent DNA 7500	Agilent Technologies
Kit de ADN de alta sensibilidad Agilent	Agilent Technologies
Pipetas (monocanal y multicanal) y puntas ART	

Mezclador vórtex	
Minicentrífuga para tubos de 0,2 ml	
Placa PCR/centrifugadora de tiras	
Termociclador con bloque de 96 pocillos y tapa calefactada	
Termomezclador/ Bloque térmico* para tubo de 1,5 ml	
Fluorómetro Qubit y tubos de 0,5 ml compatibles	Thermo Fisher Scientific
Bioanalizador 2100	Agilent Technologies
Agitador de laboratorio	-
Concentrador de vacío (Si no está disponible, consulte el Apéndice para Método alternativo)	-

\*Si utiliza un bloque térmico, tenga a mano un termómetro para asegurarse de que se alcanza la temperatura deseada.

## NOTAS GENERALES Y PRECAUCIONES

Utilice equipo de protección adecuado (bata de laboratorio, guantes y gafas protectoras) en todo momento durante la realización de este protocolo.

Para obtener los mejores resultados, lea este documento antes de realizar el protocolo y siga las instrucciones proporcionadas. 3B BlackBio Biotech India Ltd. no puede garantizar el rendimiento del kit de preparación de bibliotecas TruNGS® si se realizan modificaciones en el protocolo.

Este método de preparación de bibliotecas puede producir más material del necesario para el enriquecimiento de dianas. El producto sobrante puede almacenarse a -20 °C para su uso posterior.

Compruebe la compatibilidad de su termociclador y los tubos de PCR incubándolos a 95°C durante un máximo de 5 minutos para asegurarse de que los tubos de PCR no se agrietan por el calor y la presión. Ajuste la estanqueidad de la tapa del termociclador y/o utilice un espaciador específico para el modelo de termociclador.

## DIRECTRICES PARA LAS MUESTRAS DE ADN

- Utilice el Thermo Fisher Scientific Qubit dsDNA Broad Range Quantitation Assay para cuantificar con precisión el ADN purificado de entrada.
- No se recomienda medir la concentración de ADN por absorbancia a 260 nm.
- El ADN de entrada debe suspenderse en agua de calidad para biología molecular, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 o tampón EB.
- Es importante eliminar todos los cationes y quelantes de la muestra de ADN inicial. La presencia de cationes y quelantes puede afectar a la reacción de fragmentación inicial.
- La cantidad de ADN recomendada es de 50-100 ng de ADN de alta calidad.
- Los reactivos son compatibles con la entrada de masa de 1 ng a 500 ng.

- Para obtener asistencia técnica, póngase en contacto con techsupport@3blackbio.com.

## RESUMEN DEL PROTOCOLO

Este protocolo comienza con ADN (FFPE/ADNc bicatenario) y genera bibliotecas amplificadas e indexadas para el posterior enriquecimiento de dianas. Incluye fragmentación enzimática y adaptadores TruNGS® con cebadores UDI. Este protocolo permite realizar la preparación de bibliotecas de ADN (pasos 1-3) en 3 horas.

Fragmentación enzimática, ligadura con adaptadores TruNGS® y amplificación con cebadores UDI	Tiempo
Realizar la fragmentación del ADN, la reparación de los extremos y la cola dA	1 hora
Ligar adaptadores TruNGS® y purificar	1 hora
Amplificación PCR con UDI-Primers, purificación y QC	1 hora

## PASO 1 REALIZAR LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN, LA REPARACIÓN DE LOS EXTREMOS Y EL DETALLE DEL ADN

Realiza la fragmentación enzimática del ADN de entrada y la posterior reparación de extremos y dA-tailing para generar fragmentos de ADN dA-tailed.

### Reactivos necesarios

- ADN FFPE/ADNc bicatenario: 50-100 ng por muestra
- Agua de calidad para biología molecular
- Qubit dsDNA Broad Range Quantitation Assay (o equivalente)
- De la preparación de la biblioteca TruNGS® (Cuadro 1.1):
  - Frag/End Repair Buffer (Tubo 1)
  - Enzimas reparadoras Frag/End (Tubo 2)

### Antes de empezar

Descongelar o colocar en hielo:

- Agua de calidad para biología molecular
- ADN
- Frag/End Repair Buffer (Tubo 1)
- Enzimas reparadoras Frag/End (Tubo 2)

## PREPARAR EL TERMOCICLADOR, LAS MUESTRAS Y LOS REACTIVOS

**1.1** Programe el termociclador con las siguientes condiciones. Ajuste la temperatura de la tapa calefactada a 105°C. Inicie el programa para preenfriar el termociclador.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	4°C	Mantenga
2	30°C	4-6 minutos*
3	65°C	30 minutos
4	4°C	Mantenga

\* Se recomienda para generar fragmentos de 250-300 pb a partir de 50-100 ng de ADN FFPE/ADNc bicatenario.

**1.2** Mezcle el ADN agitando el tubo con un dedo. Utilice el Qubit dsDNA Broad Range Quantitation Assay para determinar la concentración de sus muestras de ADN.

**NOTA:** No se recomienda medir la concentración de ADN por absorbancia a 260 nm.

**1.3** Diluir la(s) muestra(s) de ADN hasta una concentración final de 1,25 ng/μl con agua refrigerada. Mezclar bien con un pipeteo suave.

**NOTA:** Si se desea una entrada de masa distinta de 50-100 ng, diluir la masa objetivo a un volumen de 40 μl.

**1.4** Añadir 40 μl de cada muestra de ADN diluida (50-100 ng de ADN total) en un tubo de pared delgada para PCR de 0,2 ml o en un pocillo de una placa de 96 pocillos para termociclado.

**1.5** Pulse para asegurarse de que toda la solución está en el fondo del tubo y colóquelo en hielo.

## FRAGMENTACIÓN, REPARACIÓN DE EXTREMOS Y COLA DE PELO

**1.6** Agitar en vórtex el tampón Frag/End Repair (tubo 1) durante 5 segundos. Pulse para recoger todo el líquido del fondo del tubo.

**1.7** Mezclar suavemente las Enzimas Reparadoras Frag/End (Tubo 2) pipeteando un mínimo de 10 veces para asegurar una mezcla completa. Pulse para recoger todo el líquido del fondo del tubo.

**1.8** Prepare una mezcla de fragmentación enzimática en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml previamente refrigerado en hielo. Utilice los volúmenes indicados a continuación. Homogeneizar la mastermix con vórtex moderado durante 5 segundos o pipeteando un mínimo de la mitad del volumen total arriba y abajo 10 veces (evitar la formación de burbujas).

Reactivo	Volumen por reacción (μl)*
Frag/End Repair Buffer (Tubo 1)	4
Enzimas reparadoras Frag/End (Tubo 2)	6
Total	10

\*Preparar una mezcla maestra para múltiples reacciones.

**NOTA:** Es fundamental mantener todo en hielo mientras se prepara la reacción de fragmentación. Transfiera el tubo directamente del hielo a la máquina de PCR con el bloque ya a 4° C.

**1.9** Añadir 10 µl de mezcla de fragmentación enzimática (del paso 1.8) a cada tubo o pocillo de 40 µl de muestra de ADN. Homogeneizar con vórtex moderado durante 5 segundos o pipeteando un mínimo de la mitad del volumen total arriba y abajo 10 veces (evitar la formación de burbujas). Tapar el tubo o los tubos o sellar la placa y mantener la reacción en hielo.

**NOTA:** La mezcla completa es fundamental para conseguir longitudes de fragmento uniformes.

**1.10** Haga girar a impulsos la placa o los tubos de muestra y transfíeralos inmediatamente al termociclador previamente refrigerado.

**1.11** Inicie los pasos 2 a 4 del programa del termociclador (consulte la tabla del paso 1.1 anterior).

**NOTA:** Mientras se ejecuta el programa del termociclador, prepare los reactivos para el Paso 2: Ligar adaptadores TruNGS® y purificar (consulte Antes de comenzar).

**1.12** Una vez finalizado el programa del termociclador y cuando el bloque de muestras haya vuelto a 4°C, retire las muestras del bloque y colóquelas en hielo.

## **PASAR INMEDIATAMENTE AL PASO 2: LIGAR LOS ADAPTADORES TruNGS® Y PURIFICAR**

### **PASO 2 LIGAR LOS ADAPTADORES TruNGS® Y PURIFICAR**

Ligue los adaptadores TruNGS® a los fragmentos de ADN con cola dA del paso 1 y purifíquelos para generar bibliotecas de ADN listas para la introducción de índices mediante amplificación en el paso 3.

#### **Reactivos necesarios**

- fragmentos de ADN de cola dA (del paso 1.12)
- Etanol (200 grados)
- Agua de calidad para biología molecular
- 10 mM Tris-HCl pH 8 o tampón EB (opcional, para elución)
- De la preparación de la biblioteca TruNGS® (Cuadro 1.1):
  - Adaptadores TruNGS® (Tubo 3)
  - Mezcla maestra de ligación (tubo 4)
- De las perlas de purificación de ADN (preparación de bibliotecas) (Recuadro 2.1):
  - Perlas de purificación de ADN 1 (Tubo 5)

#### **Antes de empezar**

Descongelar o colocar en hielo:

- Adaptadores TruNGS® (tubo 3) (tubo; utilizado para todas las muestras)
- Mezcla maestra de ligación (tubo 4)
- Prepare 1 ml de etanol al 80% para cada muestra (para utilizar en los pasos 2 y 3 del protocolo).
- Equilibre las microesferas de purificación de ADN 1 (tubo 5) a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos (para su uso en los pasos 2 y 3 del protocolo).
- Programar un termociclador para incubar las muestras a 20°C con la tapa calefactada al mínimo.



temperatura o apagado. Inicie el programa de modo que el ciclador haya alcanzado los 20°C cuando se terminen de preparar las muestras.

## ADAPTADORES LIGATE TRUNGS

**2.1** Añada 5 µl de adaptadores TruNGS® (tubo 3) en cada pocillo o tubo de muestra que contenga los fragmentos de ADN con cola dA del paso 1. Mezcle suavemente mediante pipeteo y mantenga en hielo.

**2.2** Invierta la mezcla maestra de ligación (tubo 4) un mínimo de 10 veces hasta que esté homogeneizada y colóquela en hielo.

**NOTA:** No agite en vórtex la mezcla maestra de ligación (tubo 4).

**2.3** Añada 20 µl de mezcla maestra de ligación (tubo 4) a cada muestra del paso 2.1. Pipetee un mínimo de la mitad del volumen total hacia arriba y hacia abajo 10 veces para garantizar una mezcla completa. Selle o tape la placa o los tubos de muestras y gírelos a impulsos para asegurarse de que toda la solución se encuentra en el fondo del tubo.

**2.4** Incube la reacción de ligación a 20 °C durante 15 minutos en el termociclador y, a continuación, traslade las muestras a la mesa de trabajo. Proceda al paso Purificar.

**IMPORTANTE:** Apague la tapa térmica o póngala a la temperatura mínima.

**NOTA:** Mientras se ejecuta el programa del termociclador, prepare los reactivos para el Paso 3: Amplificación PCR utilizando cebadores TruNGS® UDI, purificación y control de calidad (consulte Antes de comenzar).

## PURIFICAR

**2.5** Agite en vórtex las microesferas de purificación de ADN 1 preequilibradas a temperatura ambiente (tubo 5) hasta que estén bien mezcladas.

**2.6** Añada 60 µl de microesferas de purificación de ADN 1 homogeneizadas (0,8x) (tubo 5) a cada muestra de ligación del paso 2.4. Mezcle bien agitando en vórtex.

**2.7** Incubar las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente.

**2.8** Colocar las muestras en una placa magnética durante 1 minuto o hasta que el sobrenadante sea transparente.

**2.9** Las microesferas de purificación de ADN 1 (tubo 5) forman un precipitado, dejando un sobrenadante claro. Sin retirar la placa ni los tubos de la placa magnética, retire y deseche el sobrenadante.

**2.10** Lavar el precipitado de microesferas añadiendo suavemente 200 µl de etanol al 80% recién preparado (sin alterar el precipitado). Incube durante 1 minuto y, a continuación, retire y deseche el etanol.

**2.11** Repetir el lavado una vez, para un total de dos lavados, manteniendo la(s) muestra(s) en la placa magnética.

**2.12** Retire con cuidado todo el etanol restante con una pipeta de 10 µl, asegurándose de no alterar el sedimento de microesferas.

**NOTA:** Antes de pipetear, el precipitado de microesferas puede centrifugarse brevemente para recoger el etanol del fondo de la placa o del tubo y devolverse a la placa magnética.

**2.13** Seque al aire el precipitado de microesferas en la placa magnética durante 5 minutos o hasta que el precipitado de microesferas esté seco. No seque en exceso el precipitado de microesferas.

**2.14** Retire la placa o el/los tubo(s) de la placa magnética y añada 17 µl de agua de calidad para biología molecular a cada muestra. Mezcle mediante pipeteo hasta homogeneizar.

**NOTA:** También puede utilizarse Tris-HCl 10 mM pH 8 o tampón EB para la elución.

**2.15** Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.

**2.16** Colocar la placa o los tubos en una placa magnética y dejar reposar durante 3 minutos o hasta que las perlas formen un precipitado.

**2.17** Transfiera 15 µl del sobrenadante claro que contiene las bibliotecas ligadas a un tubo limpio de pared fina para PCR de 0,2 ml o a un pocillo de una placa de termociclado de 96 pocillos, asegurándose de no alterar el precipitado de microesferas.

**PASAR AL PASO 3: AMPLIFICAR PCR UTILIZANDO TruNGS® UDI PRIMERS, PURIFICAR Y REALIZAR QC**

### **PASO 3 AMPLIFICAR CON CEBADORES TRUNGS® UDI, PURIFICAR Y REALIZAR QC**

Amplifique las bibliotecas de ADN adaptadas con cebadores TruNGS® UDI, purifíquelas y realice un análisis de control de calidad (CC) para completar el protocolo.

#### **Reactivos necesarios**

- Bibliotecas ligadas (del paso 2.17)
- Etanol al 80 % (de la etapa 2)
- Perlas de purificación de ADN 1 equilibradas (tubo 5) (del paso 2)
- Agua de calidad para biología molecular
- 10 mM Tris-HCl pH 8 o tampón EB (opcional, para elución)
- De la preparación de la biblioteca TruNGS® (Cuadro 1.1)
  - TruNGS® AMP Mix 1 (2x) (Tubo 6)
  - Cartillas TruNGS® UDI

#### **Antes de empezar**

Descongelar o colocar en hielo:

- TruNGS® AMP Mix 1 (2x) (Tubo 6)
- TruNGS® UDI Primers (placa con cebadores de un solo uso)

## PREPARAR EL TERMOCICLADOR

**3.1** Programe un termociclador con las siguientes condiciones. Ajuste la temperatura de la tapa térmica a 105 °C.

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98 C°	45 segundos	1
Desnaturalización Extensión del recocido	98 C° 60 C° 72 C°	15 segundos 30 segundos 30 segundos	8-12*
Ampliación final	72 C°	1 minuto	1
Mantenga	4 C°	HOLD	-

\*Se recomiendan de 8 a 12 ciclos para los flujos de trabajo de enriquecimiento de dianas TruNGS® cuando se parte de 50-100 ng de ADN de alta calidad.

## REALIZAR PCR

**3.2** Añada 10 µl de TruNGS® UDI Primer de la placa de 96 pocillos suministrada a cada una de las bibliotecas de ADN del paso 2.17 y mezcle bien mediante pipeteo suave.

**NOTA:** Para la selección de índices y las directrices de agrupación para el enriquecimiento de dianas y la secuenciación posteriores, consulte el Apéndice.

**3.3** Añada 25 µl de TruNGS® AMP Mix 1 (2x) (Tubo 6) a las bibliotecas de ADN del paso 3.2 y mezcle bien mediante pipeteo suave.

**NOTA:** Invierta TruNGS® AMP Mix 1 (2x) (Tubo 6) 5 veces antes de usar. No agitar en vórtex.

**3.4** Haga girar a impulsos la placa o los tubos de muestra y transfíralos inmediatamente al termociclador. Inicie el programa.

**3.5** Retire la(s) muestra(s) del bloque cuando haya finalizado el programa del termociclador. Proceda a la purificación.

## PURIFICAR

**3.6** Agite en vórtex las microesferas de purificación de ADN 1 preequilibradas (tubo 5) hasta que se mezclen.

**3.7** Añada 50 µl (1x) de microesferas de purificación de ADN 1 homogeneizadas (tubo 5) a cada muestra de ligación del paso

3.5. Mezclar bien mediante vórtex.

**3.8** Incubar las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente.

**3.9** Colocar las muestras en una placa magnética durante 3 minutos.

**3.10** Las microesferas de purificación de ADN 1 (tubo 5) forman un precipitado, dejando un sobrenadante claro. Sin retirar la placa ni los tubos de la placa magnética, retire y deseche el sobrenadante.

**3.11** Lavar el precipitado de microesferas añadiendo suavemente 200 µl de etanol al 80% recién preparado (no alterar el precipitado), incubar durante 1 minuto (o hasta que esté transparente), después retirar y desechar el etanol.

**3.12** Repita este lavado una vez, para un total de dos lavados, manteniendo las muestras en la placa magnética.

**3.13** Retire con cuidado todo el etanol restante con una pipeta de 10 µl, asegurándose de no alterar el sedimento de microesferas.

**NOTA:** Antes de pipetear, el precipitado de microesferas puede centrifugarse brevemente para recoger el etanol del fondo de la placa o del tubo y devolverse a la placa magnética.

**3.14** Seque al aire el precipitado de microesferas en la placa magnética durante 5 minutos o hasta que el precipitado de microesferas esté seco. No seque en exceso el precipitado de microesferas.

**3.15** Retire la placa o los tubos de la placa magnética y añada 22 µl de agua de calidad para biología molecular, 10 mM de Tris-HCl pH 8 o tampón EB a cada muestra. Mezcle pipeteando hasta homogeneizar.

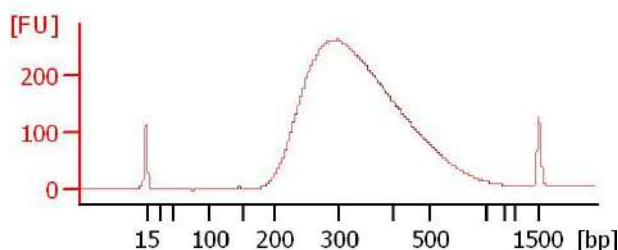
**3.16** Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.

**3.17** Colocar la placa o los tubos en una placa magnética y dejar reposar durante 3 minutos o hasta que las perlas formen un precipitado.

**3.18** Transfiera 20 µl del sobrenadante claro que contiene las bibliotecas indexadas amplificadas a un tubo limpio de pared fina para PCR de 0,2 ml o a un pocillo de una placa de 96 pocillos para termociclado, asegurándose de no alterar el precipitado de microesferas.

## REALIZAR EL CONTROL DE CALIDAD

**3.19** Cuantificar y validar el rango de tamaños de cada biblioteca utilizando el ensayo de cuantificación de amplio rango Thermo Fisher Scientific Qubit dsDNA y el ensayo Agilent DNA 7500.



Electroferograma representativo de una biblioteca purificada generada con la entrada de 50 ng de ADN de alta calidad en una fragmentación de 20 minutos a 37°C y 8 ciclos de PCR.

**PUNTO DE PARADA:** Si no se procede inmediatamente a un sistema de enriquecimiento de dianas TruNGS®, almacene las bibliotecas indexadas amplificadas a -20 °C.

-----END OF LIBRARY PREPARATION WORKFLOW-----

## ANEXO

### SECUENCIAS UDI

Para obtener una guía completa de las secuencias TruNGS® UDI, póngase en contacto con [techsupport@3blackbio.com](mailto:techsupport@3blackbio.com).

### DIRECTRICES DE PUESTA EN COMÚN

Los cebadores TruNGS® UDI están equilibrados en bases para la secuenciación de próxima generación en base a columnas. Al agrupar bibliotecas únicas de doble índice para la hibridación 8-plex, se recomienda seleccionar bibliotecas de una sola columna. Se pueden seleccionar varias columnas en cualquier combinación deseada en una sola placa o en varias placas para la secuenciación.

**Tabla 1.** Disposición de las placas de cebadores TruNGS® UDI para 16 muestras.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9										
B	2	10										
C	3	11										
D	4	12										
E	5	13										
F	6	14										
G	7	15										
H	8	16										

**FIN DEL APÉNDICE**

## (B) PROTOCOLO HÍBRIDO DE CAPTURA Y ENRIQUECIMIENTO DE DIANAS

El protocolo TruNGS® Hybrid Capture and Target Enrichment genera bibliotecas de ADN enriquecidas para la secuenciación en sistemas de secuenciación de próxima generación (NGS) de Illumina. Este manual detalla los pasos para una hibridación de 16 horas en un flujo de trabajo de enriquecimiento de dianas de dos días.

### COMPONENTE DE PROTOCOLO

Nombre	Descripción	Almacenamiento
Captura híbrida TruNGS® (Cuadro 1.2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mezcla de hibridación (Tubo 7)</li> <li>Panel de ADN TruNGS® (Tubo 8)</li> <li>Panel de ARN TruNGS® (Tubo 9)</li> <li>Solución bloqueante (Tubo 10)</li> <li>Bloqueador TruNGS® (Tubo 11)</li> <li>Potenciador de la hibridación (Tubo 12)</li> </ul>	-20°C
Perlas de unión a estreptavidina y tampones de lavado (captura híbrida) (recuadro 2.2)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Perlas de unión a estreptavidina (tubo 13)</li> <li>Tampón de unión (Tubo 14)</li> <li>Tampón de lavado A (Tubo 15)</li> <li>Tampón de lavado B (Tubo 16)</li> </ul>	2-8°C
Enriquecimiento del objetivo TruNGS® (Cuadro 1.3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cebadores de amplificación (Tubo 17)</li> <li>TruNGS® Amp Mix 2 (2x) (Tubo 18)</li> </ul>	-20°C
Perlas de purificación de ADN (enriquecimiento de dianas) (Recuadro 2.3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Perlas de purificación de ADN 2 (Tubo 19)</li> </ul>	2-8°C

### RESUMEN DEL PROTOCOLO

Este protocolo es un componente del flujo de trabajo TruNGS®. Comienza con bibliotecas de ADN amplificadas e indexadas y genera bibliotecas de ADN enriquecidas con dianas para la secuenciación en sistemas de secuenciación de próxima generación (NGS) de Illumina.

Flujo de trabajo de hibridación y enriquecimiento de dianas	Tiempo
Preparar las bibliotecas para la hibridación	1 hora
Hibridar sondas de captura con pools	16 horas
Fijación de dianas hibridadas a perlas de estreptavidina	1,5 horas
Amplificación PCR posterior a la captura, purificación y control de calidad	1 hora
Secuencia en plataforma Illumina	-

## PASO 1 - PREPARAR LAS BIBLIOTECAS PARA LA HIBRIDACIÓN

Al multiplexar, siga las directrices de agrupación incluidas en el Apéndice del Protocolo de preparación de bibliotecas TruNGS® utilizado.

### Reactivos necesarios

- Biblioteca amplificada e indexada

### ALÍCUOTA Y SECAR LA BIBLIOTECA

Este protocolo admite una captura de hibridación simple o multiplex (hasta 8 multiplex). La cantidad de biblioteca indexada a utilizar depende del número de muestras indexadas por pool.

**1.1** Utilice la concentración de cada biblioteca amplificada e indexada para calcular el volumen (en µl) de cada biblioteca necesario para la hibridación:

- Determine la cantidad de cada biblioteca indexada por pool a partir de la tabla siguiente.
- Divida la cantidad de cada biblioteca indexada por pool por las concentraciones medidas en ng/µl del QC de preparación de bibliotecas.

Por ejemplo: Si se multiplexan ocho bibliotecas por reacción de hibridación, la cantidad de cada biblioteca será 187,5 ng y la masa total de la piscina será de 1.500 ng.

Número de muestras indexadas por piscina	Importe de cada biblioteca indexada por piscina	Masa total por piscina
1	500 ng	500 ng
2	500 ng	1000 ng
3	500 ng	1500 ng
4	375 ng	1500 ng
8	187,5 ng	1500 ng

**NOTAS:** Si la cantidad de biblioteca de la que dispone es insuficiente, puede utilizar una cantidad menor; sin embargo, utilizar menos puede provocar una disminución de la complejidad de la biblioteca. Se pueden utilizar más de 1.500 ng (1,5 µg) de ADN total; sin embargo, no utilice más de 4 µg de ADN total, ya que

**1.2** Transfiera los volúmenes calculados de cada biblioteca indexada amplificada a un tubo de reacción de conjunto de bibliotecas indexadas para cada hibridación que se realice. Para evitar transferencias innecesarias en los pasos posteriores, se recomienda utilizar tubos limpios de pared fina para PCR de 0,2 ml o pocillos de una placa de 96 pocillos para termociclado.

**NOTA:** Compruebe que los tubos estén bien sellados, ya que la evaporación puede reducir el rendimiento.

**1.3** Haga girar a impulsos el tubo o tubos de la reserva de bibliotecas indexada para minimizar la cantidad de burbujas presentes.

**1.4** Seque la(s) reserva(s) de biblioteca indexada(s) con un concentrador de vacío utilizando calor bajo o nulo.

**NOTA:** Si se desea un método alternativo para secar, proceder al Apéndice: Protocolo alternativo de concentración de ADN previo a la hibridación.

**PUNTO DE PARADA:** Si no se procede inmediatamente al Paso 2, almacenar el pool de bibliotecas indexadas secas a -20°C durante un máximo de 24 horas.

## PROCEDER AL PASO 2: HIBRIDAR SONDAS DE CAPTURA CON POOLS

### PASO 2 - HIBRIDACIÓN DE SONDAS DE CAPTURA CON POOLS

Utilice el conjunto o conjuntos de bibliotecas indexadas secas del paso 1 para realizar la reacción de hibridación.

**IMPORTANTE:** Antes de proceder con este paso, compruebe la compatibilidad de su termociclador y los tubos o placas de PCR incubándolos a 95°C durante un máximo de 5 minutos para asegurarse de que no se agrietan por el calor y la presión. Ajuste la estanqueidad de la tapa del termociclador y/o utilice un espaciador específico para el modelo de termociclador.

#### Reactivos necesarios

- Conjunto(s) de bibliotecas indexadas del paso 1
- De la captura híbrida TruNGS® (Cuadro 1.2)
  - Mezcla de hibridación (Tubo 7)
  - TruNGS® ADN o ARN (Tubo 8 o 9)
  - Solución bloqueante (Tubo 10)
  - Bloqueadores TruNGS® (Tubo 11)
  - Potenciador de la hibridación (Tubo 12)

#### Antes de empezar

- Descongelar todos los reactivos necesarios en hielo, luego agitar durante 2 segundos para mezclar y luego agitar.
- Poner un bloque térmico a 65°C.
- Programar un termociclador de 96 pocillos a 95°C y ajustar la tapa térmica a 105°C.

### PREPARAR LA SOLUCIÓN DE LA SONDA

**2.1** Calentar la mezcla de hibridación (tubo 7) a 65°C en el bloque térmico durante 10 minutos, o hasta que se disuelva todo el precipitado, y después enfriar a temperatura ambiente en la mesa de trabajo durante 5 minutos.

**2.2** Prepare una solución de sonda en un tubo limpio de pared delgada para PCR de 0,2 ml o en un pocillo de una placa de 96 pocillos para termociclismo según se indica en la tabla siguiente. Mezcle agitando el tubo o tubos.

Reactivo	Volumen por reacción (µl)
Mezcla de hibridación (Tubo 7)	20
TruNGS® DNA o RNA Panel (Tubo 8 o 9)	4
Agua (hasta el volumen total)	4
Total	28



**2.3** Resuspenda el conjunto de bibliotecas indexadas secas (del paso 1.4) añadiendo los reactivos descritos a continuación. Mezcle agitando el tubo o tubos.

Reactivo	Volumen por reacción (µl)
Fondo de biblioteca indexado seco	-
Solución bloqueante (Tubo 10)	5
Bloqueadores TruNGS® (Tubo 11)	7
Total	12

## REALIZAR LA REACCIÓN DE HIBRIDACIÓN

**2.4** Calentar la solución de la sonda a 95°C durante 2 minutos en un termociclador con la tapa a 105°C, luego enfriar inmediatamente en hielo durante 5 minutos.

**2.5** Mientras la solución de la sonda se enfría en hielo, caliente el tubo que contiene el conjunto de bibliotecas indexadas resuspendidas a 95 °C durante 5 minutos en un termociclador con la tapa a 105 °C y, a continuación, equilibre tanto la solución de la sonda como el conjunto de bibliotecas indexadas resuspendidas a temperatura ambiente en la mesa de trabajo durante 5 minutos.

**2.6** Agite en vórtex y centrifugue la solución de sonda y, a continuación, transfiera todo el volumen al conjunto de bibliotecas indexadas resuspendidas. Mezcle bien con un vórtex.

**2.7** Haga girar el tubo o tubos para asegurarse de que toda la solución se encuentra en el fondo del tubo o tubos.

**2.8** Añada 30 µl de potenciador de la hibridación (tubo 12) en la parte superior de toda la reacción de captura.

**2.9** Haga girar el tubo o los tubos para asegurarse de que no quedan burbujas.

**IMPORTANTE: Selle bien los tubos para evitar un exceso de evaporación durante las 16 horas de incubación.**

**2.10** Incubar la reacción de hibridación a 70°C durante 16 horas en un termociclador con la tapa a 85°C.

**NOTA:** La interrupción de la hibridación entre 15-17 horas no afectará a la calidad de la captura posterior.

## PROCEDER AL PASO 3: UNIR LAS DIANAS HIBRIDADAS A LAS MICROESFERAS DE ESTREPTAVIDINA

### PASO 3 - UNIR LAS DIANAS HIBRIDADAS A LAS MICROESFERAS DE ESTREPTAVIDINA

#### Reactivos necesarios

- Reacciones de hibridación (del paso 2.10)
- De perlas de unión a estreptavidina y tampones de lavado (captura híbrida) Cuadro 2.2
  - Perlas de unión a estreptavidina (tubo 13)
  - Tampón de unión (Tubo 14)
  - Tampón de lavado A (Tubo 15)
  - Tampón de lavado B (Tubo 16)

#### Antes de empezar

- Precalentar los siguientes tubos a 48°C hasta que se disuelva cualquier precipitado:

- Tampón de unión (Tubo 14)
- Tampón de lavado A (Tubo 15)
- Tampón de lavado B (Tubo 16)
- Para cada reacción de hibridación:
  - Equilibrar 800 µl de tampón de unión (tubo 14) a temperatura ambiente.
  - Equilibrar 200 µl de tampón de lavado A (tubo 15) a temperatura ambiente.
  - Dejar 700 µl de Tampón de Lavado B (Tubo 16) a 48°C
- Equilibre las perlas de unión a estreptavidina (tubo 13) a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos como preparación para el paso 4 (amplificación PCR posterior a la captura, purificación y control de calidad):

Descongelar en hielo:

- De TruNGS® Target Enrichment Box 1.3
  - Cebadores de amplificación (Tubo 17)
  - TruNGS® AMP Mix 2 (2x) (Tubo 18)
- Perlas de purificación de ADN (enriquecimiento de dianas) Recuadro 2.3
  - Perlas de purificación de ADN 2 (Tubo 19)
- Equilibre las microesferas de purificación de ADN 2 (tubo 19) a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.

## PREPARAR LAS CUENTAS

**3.1** Agite en vórtex las perlas de enlace de estreptavidina preequilibradas (tubo 13) hasta que se mezclen.

**3.2** Añada 100 µl de perlas de unión a estreptavidina (tubo 13) a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Prepare un tubo para cada reacción de hibridación.

**3.3** Añada 200 µl de tampón de unión (tubo 14) a los tubos y mezcle pipeteando.

**3.4** Coloque los tubos en un soporte magnético durante 1 minuto y, a continuación, retire y deseche el sobrenadante transparente. Asegúrese de no alterar el precipitado de microesferas. Retirar el tubo del soporte magnético.

**3.5** Repita el lavado (pasos 3.3 y 3.4) dos veces más para un total de tres lavados.

**3.6** Tras eliminar el sobrenadante claro del tercer lavado, añada 200 µl finales de tampón de unión (tubo 14) y resuspenda las microesferas agitándolas en vórtex hasta homogeneizarlas.

## VINCULAR LOS OBJETIVOS

**3.7** Una vez finalizada la hibridación (paso 2.10), abra la tapa del termociclador y transfiera directamente el volumen de cada reacción de hibridación a un tubo correspondiente de perlas de unión a estreptavidina lavadas del paso 3.6. Mezcle pipeteando y agitando.

**IMPORTANTE:** La transferencia rápida directamente desde el termociclador a 70°C es un paso crítico para minimizar la unión fuera del objetivo. No retire el tubo o tubos de reacción de hibridación del termociclador ni deje que se enfríe a menos de 70°C antes de transferir la solución a las perlas de unión de estreptavidina lavadas. Si se deja enfriar a temperatura ambiente durante menos de 5 minutos, se producirá un aumento de hasta el 10-20% en la unión fuera del objetivo.

**3.8** Mezclar el (los) tubo(s) de la reacción de hibridación con las perlas de unión a estreptavidina (tubo 13) durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador/rocker/rotador a una velocidad suficiente para mantener la solución mezclada.

**NOTA:** No mezclar en vórtex. No se requiere una mezcla agresiva.

**3.9** Retire del mezclador el tubo o tubos que contienen la reacción de hibridación con las perlas de unión a estreptavidina y gírelos por impulsos para asegurarse de que toda la solución se encuentra en el fondo del tubo o tubos.

**3.10** Coloque los tubos en un soporte magnético durante 1 minuto.

**3.11** Retire y deseche el sobrenadante claro, incluido el potenciador de la hibridación. No altere el sedimento de microesferas.

**NOTA:** Puede ser visible algo de potenciador de la hibridación tras la eliminación del sobrenadante y a lo largo de cada paso de lavado. No afectará al producto de captura final.

**3.12** Retirar los tubos del soporte magnético y añadir 200 µl de tampón de lavado A (tubo 15). Mezclar pipeteando.

**3.13** Haga girar para asegurarse de que toda la solución está en el fondo de los tubos.

**3.14** Transfiera todo el volumen del paso 3.13 (~200 µl) a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, uno por reacción de hibridación. Coloque los tubos en un soporte magnético durante 1 minuto.

**IMPORTANTE:** Este paso reduce el fondo de la unión no específica a la superficie del tubo.

**3.15** Retire y deseche el sobrenadante claro. Asegúrese de no alterar el sedimento de microesferas.

**3.16** Retire los tubos del soporte magnético y añada 200 µl de tampón de lavado B a 48 °C (tubo 16). Mezclar pipeteando y, a continuación, girar para asegurarse de que toda la solución se encuentra en el fondo de los tubos.

**3.17** Incubar el/los tubo(s) durante 5 minutos a 48°C.

**3.18** Coloque los tubos en un soporte magnético durante 1 minuto.

**3.19** Retire y deseche el sobrenadante claro. Asegúrese de no alterar el sedimento de microesferas.

**3.20** Repita el lavado (pasos 3.16-3.19) dos veces más, para un total de tres lavados.

**3.21** Tras el último lavado, utilice una pipeta de 10 µl para eliminar todos los restos de sobrenadante. Continúe inmediatamente con el siguiente paso. No deje que las microesferas se sequen.

**NOTA:** Antes de eliminar el sobrenadante, el sedimento de microesferas puede centrifugarse brevemente para recoger el sobrenadante del fondo del tubo o placa y volver a colocarlo en la placa magnética.

**3.22** Retire los tubos del soporte magnético y añada 45 µl de agua. Mezcle con una pipeta hasta homogeneizar y, a continuación, incube en hielo esta solución, que en lo sucesivo se denominará suspensión de perlas de unión a estreptavidina.

#### **PASAR A LA ETAPA 4: AMPLIFICACIÓN PCR POSTERIOR A LA CAPTURA, PURIFICACIÓN Y QC**

## PASO 4 - AMPLIFICACIÓN PCR POST-CAPTURA, PURIFICACIÓN Y QC

### Reactivos necesarios

- Streptavidin Binding Bead slurry (del paso 3.22)
- Etanol
- Agua de calidad para biología molecular
- Reactivos descongelados y equilibrados en el paso 3:
- De TruNGS® Target Enrichment Box 1.3
  - Cebadores de amplificación (Tubo 17)
  - TruNGS® AMP Mix 2 (2x) (Tubo 18)
- Perlas de purificación de ADN (enriquecimiento de dianas) Recuadro 2.3
  - Perlas de purificación de ADN 2 (Tubo 19)
- Kit de ADN de alta sensibilidad Agilent Bioanalyzer (o equivalente)
- Thermo Fisher Scientific Qubit dsDNA Ensayo de cuantificación de alta sensibilidad.

### Antes de empezar

- Prepare 500 µl de etanol al 80% para cada mezcla de Streptavidin Binding Bead que vaya a procesar.

### PREPARAR LAS PERLAS, EL TERMOCICLADOR Y LA MEZCLA PCR

**4.1** Programe un termociclador con las siguientes condiciones. Ajuste la tapa térmica a 105°C.

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98 C°	45 segundos	1
Desnaturalización	98 C°	15 segundos	10-14
Recocido	60 C°	30 segundos	
Ampliación	72 C°	30 segundos	
Ampliación final	72 C°	1 minuto	1
Mantenga	4 C°	HOLD	-

**NOTA:** El número de ciclos de amplificación puede variar en función del tamaño de la reacción de hibridación.

**4.2** Si la mezcla de perlas de unión a estreptavidina se ha sedimentado, mézclela pipeteando.

**4.3** Transfiera 22,5 µl de la mezcla de perlas de unión a estreptavidina a un tubo o tubos de PCR de pared delgada de 0,2 ml. Mantener en hielo hasta el siguiente paso.

**NOTA:** Guarde los 22,5 µl restantes de agua/Streptavidin Binding Bead slurry a -20°C para su uso futuro.

**4.4** Prepare una mezcla de PCR añadiendo los siguientes reactivos a los tubos que contienen la mezcla de perlas de unión a estreptavidina. Mezcle pipeteando.

Reactivos	Volumen por reacción (µl)
Suspensión de perlas de unión a estreptavidina	22.5
Cebadores de amplificación (Tubo 17)	2.5
TruNGS® AMP Mix 2 (2x) (Tubo 18)	25
Total	50

## PCR AMPLIFY

- 4.5** Haga girar los tubos, transfíeralos al termociclador e inicie el programa de ciclado.
- 4.6** Una vez finalizado el programa del termociclador, retire el tubo o tubos del bloque y proceda inmediatamente al paso Purificar.

## PURIFICAR

- 4.7** Agite en vórtex las microesferas de purificación de ADN 2 preequilibradas (tubo 19) hasta que estén bien mezcladas.
- 4.8** Añada 50 µl (1,0x) de perlas de purificación de ADN 2 homogeneizadas (tubo 19) al tubo o tubos del paso 4.6. Mezcle bien agitando en vórtex.

**NOTA:** No es necesario recuperar el sobrenadante ni eliminar las perlas de unión a estreptavidina del producto de PCR amplificado.

- 4.9** Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 4.10** Colocar los tubos en una placa magnética durante 1 minuto o hasta que el sobrenadante sea transparente.
- 4.11** Las microesferas de purificación de ADN 2 forman un precipitado, dejando un sobrenadante claro. Sin retirar la placa o el tubo(s) de la placa magnética, retire y deseche el sobrenadante claro.
- 4.12** Lavar el precipitado de microesferas añadiendo suavemente 200 µl de etanol al 80% recién preparado (sin alterar el precipitado). Incube durante 1 minuto y, a continuación, retire y deseche el etanol.
- 4.13** Repita este lavado una vez, para un total de dos lavados, manteniendo el tubo en la placa magnética.
- 4.14** Retire con cuidado todo el etanol restante con una pipeta de 10 µl, asegurándose de no alterar el sedimento de microesferas.

**NOTA:** Antes de pipetear, el precipitado de microesferas puede centrifugarse brevemente para recoger el etanol del fondo de la placa o del tubo y devolverse a la placa magnética.

- 4.15** Seque al aire el precipitado de microesferas en la placa magnética durante 5 minutos o hasta que el precipitado de microesferas esté seco. No seque en exceso el precipitado de microesferas.
- 4.16** Retire el tubo o tubos de la placa magnética y añada 32 µl de agua, 10 mM de Tris-HCl pH 8 o tampón EB a cada reacción de captura. Mezclar pipeteando hasta homogeneizar.
- 4.17** Incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 4.18** Colocar la placa o tubo(s) en una placa magnética y dejar reposar durante 3 minutos o hasta que las perlas se peleticen completamente.
- 4.19** Transfiera 30 µl del sobrenadante claro que contiene la biblioteca enriquecida a un tubo limpio de pared fina para PCR de 0,2 ml o a un pocillo de una placa de 96 pocillos para termociclado, asegurándose de no alterar el precipitado de microesferas.

## REALIZAR EL CONTROL DE CALIDAD

**4.20** Validar y cuantificar cada biblioteca enriquecida utilizando un kit de ADN de alta sensibilidad Agilent Bioanalyzer y un ensayo de cuantificación de alta sensibilidad Thermo Fisher Scientific Qubit dsDNA.

**NOTA:** Cuando utilice el kit de ADN de alta sensibilidad Agilent Bioanalyzer, cargue 0,5 µl de la muestra final. La longitud media de los fragmentos debe ser de 400-450 pb utilizando un ajuste de rango de 150-1.000 pb. La concentración final puede variar y depende del tamaño del panel, la entrada de la biblioteca,

**PUNTO DE PARADA:** Si no va a proceder inmediatamente, almacene la muestra de biblioteca enriquecida a -20°C durante un máximo de 24 horas.

-----**END OF HYBRID CAPTURE AND TARGET ENRICHMENT WORKFLOW**-----

## PASO 5 - SECUENCIACIÓN EN UNA PLATAFORMA ILLUMINA

Secuencie las bibliotecas enriquecidas en una plataforma Illumina. Los protocolos y ajustes de secuenciación dependen de la aplicación y la instrumentación utilizadas.

## APÉNDICE: PROTOCOLO ALTERNATIVO DE CONCENTRACIÓN DE ADN PREVIO A LA HIBRIDACIÓN

### Reactivos necesarios

- Conjunto(s) de bibliotecas amplificadas e indexadas del paso 1.2
- Etanol
- Agua de calidad para biología molecular
- A partir de perlas de purificación de ADN (enriquecimiento de dianas) (Recuadro 2.3):
  - Perlas de purificación de ADN 2
- De la captura híbrida TruNGS® (Cuadro 1.2)
  - Solución bloqueante (Tubo 10)
  - Bloqueadores TruNGS (Tubo 11)

### Antes de empezar:

- Equilibre las perlas de purificación de ADN a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.
- Prepare 500 µl de etanol fresco al 80% para cada muestra que vaya a procesar.

### CONCENTRAR LAS BIBLIOTECAS DE ADN

**1** Añada 1.8x perlas de purificación de ADN homogeneizadas a los tubos que contengan las bibliotecas de ADN del paso 1.2. Mezcle bien agitando en vórtex.

**NOTA:** Para pools de bibliotecas amplificadas e indexadas con un volumen inferior a 10 µl, aumentar el volumen a 10 µl con agua.

**2** Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

**3** Centrifugar pulsando para asegurarse de que toda la solución está en el fondo del tubo o tubos y colocar el tubo o tubos en una placa o gradilla magnética durante 3 minutos o hasta que la solución sea transparente.

**4** Las microesferas de purificación de ADN forman un precipitado, dejando un sobrenadante claro. Sin retirar la placa o tubo(s) de la placa magnética o gradilla, retire y deseche el sobrenadante claro.

**5** Lavar el precipitado de microesferas añadiendo suavemente 200 µl de etanol al 80% recién preparado (sin alterar el precipitado). Incube durante 1 minuto y, a continuación, retire y deseche el etanol.

**6** Repita este lavado una vez, para un total de dos lavados, manteniendo el tubo en la placa magnética.

**7** Retire con cuidado todo el etanol restante con una pipeta de 10 µl, asegurándose de no alterar el sedimento de microesferas.

**NOTA:** Centrifugar si es necesario para asegurar la eliminación completa del etanol.

**8** Seque al aire el precipitado de microesferas en una placa magnética durante 1-5 minutos o hasta que el precipitado de microesferas esté seco. No seque en exceso el precipitado de microesferas.

**9** Retire el tubo o tubos de la placa magnética o gradilla y añada 7 µl de bloqueadores universales y 5 µl de solución bloqueadora. Mezclar pipeteando hasta homogeneizar.

**10** Proceda con el Paso 2.1 y continúe con el protocolo omitiendo el Paso 2.3. FIN DEL APÉNDICE