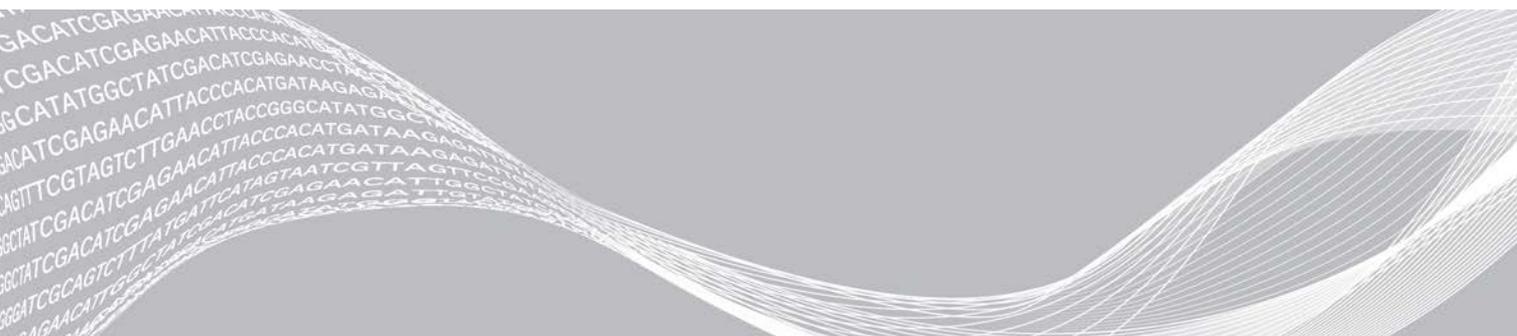


NovaSeq 6000

Guide de dénaturation et de dilution des librairies

Présentation	3
Consommables et équipement	4
Protocole A : Regroupement et dénaturation des librairies aux fins de séquençage (chargement standard)	5
Protocole B : Regroupement et dénaturation des librairies aux fins de séquençage (chargement Xp)	10
Protocole C : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement standard)	14
Protocole D : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement Xp)	17
Protocole E : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 HT (chargement standard)	20
Protocole F : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 HT (chargement Xp)	26
Historique des révisions	33
Assistance technique	34



Ce document et son contenu sont exclusifs à Illumina, Inc. et à ses sociétés affiliées (« Illumina »); ils sont exclusivement destinés à l'usage contractuel de son client dans le cadre de l'utilisation du ou des produits décrits dans les présentes et ne peuvent servir à aucune autre fin. Ce document et son contenu ne seront utilisés ou distribués à aucune autre fin ni communiqués, divulgués ou reproduits d'aucune façon sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Illumina ne cède aucune licence en vertu de son brevet, de sa marque de commerce, de ses droits d'auteur ou de ses droits traditionnels ni des droits similaires d'un tiers quelconque par ce document.

Les instructions contenues dans ce document doivent être suivies strictement et explicitement par un personnel qualifié et adéquatement formé de façon à assurer l'utilisation correcte et sûre du ou des produits décrits dans les présentes. Le contenu intégral de ce document doit être lu et compris avant l'utilisation de ce ou ces produits.

SI UN UTILISATEUR NE LIT PAS COMPLÈTEMENT ET NE SUIT PAS EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LES PRÉSENTES, IL RISQUE DE CAUSER DES DOMMAGES AU(X) PRODUIT(S), DES BLESSURES, NOTAMMENT AUX UTILISATEURS ET À D'AUTRES PERSONNES, AINSI QUE D'AUTRES DOMMAGES MATÉRIELS, ANNULANT AUSSI TOUTE GARANTIE S'APPLIQUANT AU(X) PRODUIT(S).

ILLUMINA DÉCLINE TOUTE RESPONSABILITÉ DÉCOULANT DE L'UTILISATION INAPPROPRIÉE DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LES PRÉSENTES (Y COMPRIS LEURS COMPOSANTES ET LE LOGICIEL).

© 2020 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.

Présentation

Ce guide explique comment dénaturer et diluer les librairies préparées pour le séquençage sur le système NovaSeq 6000^{MC} d'Illumina^{MD}.

Ce guide est destiné à être utilisé conjointement avec le guide du système NovaSeq 6000 (document n° 1000000019358).

Directives concernant les librairies

Toutes les instructions s'appliquent aux méthodes de préparation des librairies prises en charge et sous-entendent une taille d'insert type pour les applications NovaSeq 6000 prises en charge.

- ▶ Pour de meilleurs résultats, regroupez et dénaturez les librairies pour un séquençage immédiat.
- ▶ Diluez la librairie à une concentration de chargement appropriée pour l'application. Une concentration de chargement trop faible ou trop élevée influe négativement sur le pourcentage d'amplifiats passant le filtre (%PF). Une faible concentration de librairie fera augmenter les doublons lors du séquençage. Une concentration de librairies trop élevée entraîne une diminution du pourcentage d'amplifiats passant le filtre.
- ▶ Pour atteindre un pourcentage optimal d'amplifiats passant le filtre, il faut une bonne quantification des librairies et un contrôle de la qualité adéquat. Pour voir les recommandations, consultez la documentation de votre trousse de préparation de librairies.
- ▶ Pour les protocoles Xp, chargez un tube de librairie vide en position n° 8 de la cartouche d'amplification avant de configurer l'analyse de séquençage. Le tube de librairie vide est utilisé pour préparer le mélange de conditionnement avant la distribution à la Flow Cell. Le mélange de conditionnement permet d'augmenter l'efficacité de la génération d'amplifiats aux fins de séquençage.

Variations de protocole

Suivez le protocole de dénaturation et de dilution approprié en fonction de la procédure utilisée lors de la préparation de librairies.

- ▶ **Protocole de chargement standard (protocole A)** : Les librairies ont été normalisées en utilisant les procédures standard de quantification et de contrôle de qualité des librairies recommandées dans les documents relatifs à la préparation de librairies. Pour ces librairies, suivez le *Protocole A : Regroupement et dénaturation des librairies aux fins de séquençage (chargement standard)*, page 5.
- ▶ **Protocole de chargement XP (protocole B)** : Les librairies ont été normalisées en utilisant les procédures standard de quantification et de contrôle de qualité des librairies recommandées dans les documents relatifs à la préparation de librairies. Pour ces librairies, suivez le *Protocole B : Regroupement et dénaturation des librairies aux fins de séquençage (chargement Xp)*, page 10.
- ▶ **Librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement standard – protocole C)** : pour les librairies TruSight Oncology 500 ctDNA qui utilisent le chargement standard, suivez le *Protocole C : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement standard)*, page 14.
- ▶ **Librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement Xp – protocole D)** : pour les librairies TruSight Oncology 500 ctDNA qui utilisent le chargement Xp, suivez le *Protocole D : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement Xp)*, page 17.
- ▶ **Librairies TruSight Oncology 500 HT (chargement standard – protocole E)** : pour les librairies TruSight Oncology 500 HT qui utilisent le chargement standard, suivez le *Protocole E : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 HT (chargement standard)*, page 20.

- ▶ **Librairies TruSight Oncology 500 HT (chargement Xp – protocole F)** : pour les librairies TruSight Oncology 500 ctDNA qui utilisent le chargement Xp, suivez le *Protocole F : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 HT (chargement Xp)*, page 26.

Pratiques exemplaires

- ▶ Pour obtenir les meilleurs résultats, commencez à décongeler la cartouche de SBS et la cartouche d'amplification avant de dénaturer et de diluer les librairies. Pour connaître les instructions, consultez le *Guide du système NovaSeq 6000 (document n° 100000019358)*.

Consommables et équipement

Consommables

Les consommables suivants sont nécessaires pour dénaturer et diluer les librairies.

Consommables	Fournisseur	Utilisation
[Protocole A et B] NaOH 1 N	Fournisseur de laboratoire général	Dilution à 0,2 N pour dénaturer les librairies.
[Protocole A et B] Tris-HCl 10 mmol, pH 8,5	Fournisseur de laboratoire général	Dilution des librairies et contrôle PhiX facultatif avant la dénaturation.
[Protocole A et B] Tris-HCl 400 mmol, pH 8,0	Fournisseur de laboratoire général	Neutralisation des librairies et contrôle PhiX facultatif après la dénaturation.
[Protocole C, D, E et F] Tris-HCl 1 M, pH 8,0	Fournisseur de laboratoire général	Neutralisation des librairies et contrôle PhiX facultatif après la dénaturation.
[Protocole C, D, E et F] Eau sans DNase ni RNase	Fournisseur de laboratoire général	Dilution de NaOH pour la dénaturation des librairies. Dilution de Tween 20 et d'hypochlorite de sodium pour les lavages de maintenance.
Gants jetables sans talc	Fournisseur de laboratoire général	Usage général.
Tube de microcentrifugeuse, 1,5 ml	VWR, n° de référence 20170-038 (ou équivalent)	Combinaison des volumes lors de la dilution du NaOH et de la librairie.
Embouts de pipette, 20 µl	Fournisseur de laboratoire général	Pipetage pour la dilution et le chargement des librairies.
Embouts de pipette, 200 µl	Fournisseur de laboratoire général	Pipetage pour la dilution et le chargement des librairies.
[Protocole A et B] Eau de laboratoire	Fournisseur de laboratoire général	Dilution de NaOH pour la dénaturation des librairies. Dilution de Tween 20 et d'hypochlorite de sodium pour les lavages de maintenance.
[Flux de travail NovaSeq XP] Une des trousse suivantes : <ul style="list-style-type: none"> • Trousse à 2 lignes NovaSeq XP • Trousse à 4 lignes NovaSeq XP 	Illumina : <ul style="list-style-type: none"> • N° de référence 20021664 • N° de référence 20021665 	Chargement manuel des librairies sur Flow Cell : <ul style="list-style-type: none"> • Trousse à 2 lignes pour Flow Cell SP, S1 et S2 • Trousse à 4 lignes pour Flow Cell S4

Consommables	Fournisseur	Utilisation
<p>[Flux de travail NovaSeq XP] Une des trousse suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Trousse à 2 lignes NovaSeq XP 2-Lane Kit v1.5 • Trousse à 4 lignes NovaSeq XP 4-Lane Kit v1.5 	<p>Illumina :</p> <ul style="list-style-type: none"> • N° de référence 20043130 • N° de référence 20043131 	<p>Chargement manuel des librairies sur Flow Cell :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Trousse à 2 lignes pour Flow Cell SP, S1 et S2 • Trousse à 4 lignes pour Flow Cell S4
<p>[Flux de travail NovaSeq XP] Tubes de 0,5 ml et 1,7 ml</p>	<p>Fournisseur de laboratoire général</p>	<p>Requis pour le mélange ExAmp.</p>
<p>[Flux de travail NovaSeq XP] [Facultatif] Une des boîtes de conduits suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Boîte de conduits à 2 lignes NovaSeq XP • Boîte de conduits à 4 lignes NovaSeq XP 	<p>Illumina :</p> <ul style="list-style-type: none"> • N° de référence 20021666 • N° de référence 20021667 	<p>Collecteurs NovaSeq Xp de rechange pour le chargement manuel des librairies sur une Flow Cell.</p>
<p>[Facultatif] Contrôle PhiX v3</p>	<p>Illumina, n° de référence FC-110-3001</p>	<p>Ajout d'un contrôle PhiX.</p>

Les consommables suivants pour la dénaturation et la dilution des librairies et le PhiX sont fournis dans la trousse de préparation de librairie TruSight Oncology 500 ctDNA et la trousse de préparation de librairie TruSight Oncology 500 HT.

Consommables	Utilisation
RSB	Pour diluer les librairies et diluer et dénaturer le contrôle PhiX facultatif.
HP3	NaOH 2 N pour dénaturer le contrôle PhiX facultatif.

Équipement

L'équipement suivant est utilisé pour dénaturer les librairies qui ont été normalisées à l'aide d'une méthode basée sur des billes.

Équipement	Fournisseur
<p>[Protocole C, D, E et F] Bloc chauffant pour tubes de microcentrifugeuse de 1,5 ml</p>	<p>Fournisseur de laboratoire général</p>

Protocole A : Regroupement et dénaturation des librairies aux fins de séquençage (chargement standard)

Utilisez le protocole A pour dénaturer et diluer les librairies qui ont été normalisées en utilisant les procédures standard de quantification et de contrôle de qualité des librairies recommandées dans les documents relatifs à la préparation de librairies.

Pour le chargement Xp, passez au *Protocole B : Regroupement et dénaturation des librairies aux fins de séquençage (chargement Xp)*, page 10.

Pour les librairies TSO500 ctDNA, passez au *Protocole C : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement standard)*, page 14 ou au *Protocole D : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement Xp)*, page 17.

Pour les librairies TSO500 HT, passez au *Protocole E : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 HT (chargement standard)*, page 20 ou au *Protocole F : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 HT (chargement Xp)*, page 26.

Créer un regroupement de librairies normalisé

Suivez les instructions ci-dessous pour normaliser les librairies à la bonne concentration et les regrouper ensuite. Les librairies séquencées sur la même Flow Cell doivent être combinées dans un regroupement normalisé.

- Reportez-vous au tableau suivant pour connaître le nombre typique de lectures et la plexité recommandée par application et par type de Flow Cell.

Tableau 1 Plexité recommandée pour le regroupement de librairies

Application	Type de Flow Cell	Lectures appariées passant le filtre par Flow Cell (B)	Librairies par ligne
Génomes humains	SP	1,3 à 1,6	~2
	S1	2,6 à 3,2	~4
	S2	6,6 à 8,2	~10
	S4	16 à 20	~24
Exomes	SP	1,3 à 1,6	~20
	S1	2,6 à 3,2	~40
	S2	6,6 à 8,2	~100
	S4	16 à 20	~250
Transcriptomes	SP	1,3 à 1,6	~16
	S1	2,6 à 3,2	~32
	S2	6,6 à 8,2	~82
	S4	16 à 20	~200

Normaliser les librairies aux fins du regroupement

- Déterminez la concentration du regroupement des librairies requise en fonction de la concentration de chargement finale souhaitée.

Consultez la section *Concentrations de chargement recommandées*, page 7.

Concentration de chargement finale (pmol)	Concentration des librairies regroupées (nmol)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

- Normalisez les librairies à la concentration des librairies regroupées voulue en utilisant 10 mmol de Tris-HCl, pH 8,5.

Pour obtenir de l'aide afin de diluer les bibliothèques à la concentration appropriée, consultez le [Pooling Calculator \(Calculateur de regroupement\)](#) sur le site Web d'Illumina.

Concentrations de chargement recommandées

La concentration de chargement optimale de l'ADN dépend du type de bibliothèque et de la taille des inserts. Le tableau ci-dessous montre les concentrations de chargement d'ADN recommandées pour les bibliothèques Illumina dont la taille des inserts est ≤ 450 pb. Pour les bibliothèques dont la taille des inserts est petite, utilisez une concentration de chargement dans la limite inférieure de la fourchette recommandée. Pour les bibliothèques > 450 pb, une concentration de chargement plus grande pourrait être requise.



REMARQUE

Pour les bibliothèques générées par des méthodes de préparation de bibliothèque non liées à Illumina, vous devez peut-être effectuer un titrage de votre type de bibliothèque spécifique au départ afin d'obtenir une concentration de points d'ancrage optimale pour obtenir le meilleur pourcentage d'amplifiats passant le filtre (%PF). Une fois la concentration de chargement optimale déterminée, elle doit être applicable pour des types de bibliothèques identiques à l'avenir.

Tableau 2 Concentrations de chargement recommandées pour le flux de travail standard (version 1.1 du logiciel ou version ultérieure)

Type de bibliothèque	Concentration de chargement finale (pmol)	Concentration de chargement des bibliothèques regroupées (nmol)
PhiX ¹	250	1,25
Regroupement de bibliothèques d'ADN sans PCR d'Illumina	400 à 600 ²	2 à 3 ²
Regroupement de bibliothèques d'ADN sans PCR TruSeq	175 à 350	0,875 à 1,75
Regroupement de bibliothèques d'ADN amplifiées par PCR	300 à 600	1,5 à 3,0
Cellule unique ³	250 à 500	1,25 à 2,5

¹ Analyses incluant uniquement le contrôle PhiX.

² Calculé sur la base des valeurs suivantes : 450 pb comme taille d'insert médiane, 660 g/mol comme masse d'ADN et concentration ssQubit.

³ Single Cell a été vérifiée pour le flux de travail Xp seulement.

Si vous avez une concentration de chargement finale optimale pour les instruments HiSeqMC X, HiSeqMC 4000, ou HiSeqMC 3000, multipliez cette concentration par 1,5 pour l'instrument NovaSeq 6000. Par exemple, si la concentration de chargement finale sur l'instrument HiSeq X est de 200 pmol, utilisez 300 pmol sur l'instrument NovaSeq 6000.

Regrouper les bibliothèques normalisées et ajouter un contrôle PhiX facultatif

- 1 Combinez le volume approprié de chaque bibliothèque normalisée dans un nouveau tube de microcentrifugeuse pour obtenir un des volumes finaux suivants :

Mode	Volume final (μ l)
SP/S1	100
S2	150
S4	310

Par exemple, pour un regroupement de librairies à 6 niveaux et un mode S2, combinez 25 µl de chaque librairie ayant été normalisée à la même concentration. Ou pour un regroupement de librairies à 4 niveaux et un mode S1, combinez 25 µl de chaque librairie non dénaturée ayant été normalisée.

- 2 **[Facultatif]** Stockez le reste des librairies *non regroupées* à une température de -25 à -15 °C.
- 3 **[Facultatif]** Ajoutez 1 % de substance de contrôle PhiX non dénaturée comme suit.
 - a Diluez du contrôle PhiX 10 nmol à 2,5 nmol à l'aide de Tris-HCl 10 mmol, pH 8,5.
 - b Ajoutez le volume approprié de 2,5 nmol de PhiX non dénaturé au tube de regroupement de librairies non dénaturées.

Mode	2,5 nmol de PhiX (µl) non dénaturé	Regroupement de librairies non dénaturées (µl)
SP/S1	0,6	100
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Il est recommandé d'ajouter la substance de contrôle PhiX dans un rapport de 1 % pour que les librairies soient bien équilibrées. Les librairies à faible diversité peuvent en nécessiter davantage. Pour utiliser un contrôle PhiX avec des librairies à faible diversité, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina pour obtenir de l'aide.

Préparer une nouvelle dilution de NaOH

Préparez une *nouvelle* dilution de NaOH 0,2 N pour dénaturer les librairies aux fins du séquençage. Pour éviter que de petites erreurs de pipetage modifient la concentration finale du NaOH, un volume supplémentaire est préparé.



ATTENTION

Le NaOH 0,2 N nouvellement dilué est essentiel au processus de dénaturation. Une mauvaise dénaturation peut faire diminuer le rendement.

- 1 Combinez les volumes suivants dans un microtube à centrifuger pour diluer le NaOH 1 N en NaOH 0,2 N :

Tableau 3 Mode SP/S1/S2

Réactif	Volume pour une Flow Cell (en µl)	Volume pour deux Flow Cell (en µl)
Eau de laboratoire	40	80
Stock de NaOH 1 N	10	20

Ces volumes donneront 50 µl de NaOH 0,2 N pour une Flow Cell ou 100 µl de NaOH 0,2 N pour deux Flow Cell.

Tableau 4 Mode S4

Réactif	Volume pour une Flow Cell (en µl)	Volume pour deux Flow Cell (en µl)
Eau de laboratoire	80	160
Stock de NaOH 1 N	20	40

Ces volumes donneront 100 µl de NaOH 0,2 N pour une Flow Cell ou 200 µl de NaOH 0,2 N pour deux Flow Cell.

- 2 Retournez plusieurs fois pour mélanger ou agitez soigneusement. Laissez le bouchon sur le tube et utilisez dans un délai de **12 heures**.

Dénaturer un regroupement de librairies et un contrôle PhiX facultatif

- 1 Ajoutez le NaOH 0,2 N au tube de regroupement de librairies non dénaturées et de contrôle PhiX facultatif, en procédant comme suit :

Flow Cell	NaOH 0,2 N	Regroupement de librairies non dénaturées (µl)	Volume obtenu
SP/S1	25	100	125 µl, ou 125,6 µl avec PhiX
S2	37	150	187 µl, ou 187,9 µl avec PhiX
S4	77	310	387 µl, ou 388,9 µl avec PhiX

- 2 Mettez le bouchon et agitez brièvement.
- 3 Centrifugez à 280 x g pendant 1 minute.
- 4 Incubez à température ambiante pendant 8 minutes afin de dénaturer.
- 5 Ajoutez 400 mmol de Tris-HCl, pH 8,0 conformément aux indications suivantes, pour neutraliser.

Mode	400 mmol de Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Volume obtenu
SP/S1	25	150 µl, ou 150,6 µl avec PhiX
S2	38	225 µl, ou 225,9 µl avec PhiX
S4	78	465 µl, ou 466,9 µl avec PhiX

- 6 Mettez le bouchon et agitez brièvement.
- 7 Centrifugez à 280 x g pendant 1 minute.
- 8 Transférez le volume total de librairie dénaturée ou le mélange de librairie dénaturée avec PhiX dans le tube de librairies fourni avec la trousse de réactifs NovaSeq 6000.
- 9 Procédez immédiatement au chargement du tube de librairies dans la cartouche d'amplification et à la configuration de l'analyse.
Les cartouches de réactifs et le tube de librairies doivent être chargés dans l'instrument dans un délai de **30 minutes**.
- 10 **[Facultatif]** Si vous ne pouvez pas commencer l'analyse immédiatement, mettez le bouchon sur le tube de librairies et stockez-le entre -25 et -15 °C pendant un maximum de 3 semaines. Ne pas recongeler après la décongélation.



ATTENTION

Ne stockez le tube de librairies que si cela est absolument nécessaire. Le stockage à long terme sous -25 °C à -15 °C peut augmenter les doublons, ce qui diminue le rendement.



REMARQUE

Après avoir dénaturé et dilué vos librairies et préparé le contrôle PhiX facultatif, procédez à la *préparation de la cartouche SBS et de la cartouche d'amplification* dans la section du flux de travail standard du *Guide du système NovaSeq 6000 (document n° 100000019358)*.

Protocole B : Regroupement et dénaturation des librairies aux fins de séquençage (chargement Xp)

Utilisez le protocole B pour dénaturer et diluer les librairies qui ont été normalisées en utilisant les procédures standard de quantification et de contrôle de qualité des librairies recommandées dans les documents relatifs à la préparation de librairies. Pour le chargement des lignes adressables, consultez le chapitre sur le flux de travail NovaSeq Xp du Guide du système NovaSeq 6000 (document n° 1000000019358).

Pour le chargement standard, passez au *Protocole A : Regroupement et dénaturation des librairies aux fins de séquençage (chargement standard)*, page 5.

Pour les librairies TSO500 ctDNA, passez au *Protocole C : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement standard)*, page 14 ou au *Protocole D : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement Xp)*, page 17.

Pour les librairies TSO500 HT, passez au *Protocole E : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 HT (chargement standard)*, page 20 ou au *Protocole F : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 HT (chargement Xp)*, page 26.

Créer un regroupement de librairies normalisé

Suivez les instructions ci-dessous pour normaliser les librairies à la bonne concentration et les regrouper ensuite. Les librairies séquencées sur la même ligne doivent être combinées dans un seul regroupement. Le volume total par ligne de chaque regroupement normalisé est indiqué dans le tableau suivant. Si le même regroupement est séquencé sur plus d'une ligne, multipliez la valeur du [Tableau 5](#) par le nombre de lignes.

Tableau 5 Volume total de la librairie regroupée

Mode	Volume total du regroupement par ligne (µl)
SP/S1	18
S2	22
S4	30

Pour le flux de travail Xp, les données de sortie sont obtenues pour chaque ligne, par opposition à toutes les lignes en agrégat pour le flux de travail standard. Par conséquent, les regroupements de librairies pour le flux de travail Xp contiennent moins de librairies que pour le flux de travail standard.

Reportez-vous au tableau suivant pour connaître le nombre typique de lectures et la plexité recommandée par application et par type de Flow Cell.

Tableau 6 Plexité recommandée pour le regroupement de librairies

Application	Type de Flow Cell	Lectures appariées passant le filtre par ligne (B)	Librairies par ligne
Génomes humains	SP	0,65 à 0,8	1
	S1	1,3 à 1,6	~2
	S2	3,3 à 4,1	~5
	S4	4,0 à 5,0	~6

Application	Type de Flow Cell	Lectures appariées passant le filtre par ligne (B)	Librairies par ligne
Exomes	SP	0,65 à 0,8	~10
	S1	1,3 à 1,6	~20
	S2	3,3 à 4,1	~50
	S4	4,0 à 5,0	~62
Transcriptomes	SP	0,65 à 0,8	~8
	S1	1,3 à 1,6	~16
	S2	3,3 à 4,1	~41
	S4	4,0 à 5,0	~50

Normaliser les librairies aux fins du regroupement

- Déterminez la concentration du regroupement des librairies requise en fonction de la concentration de chargement finale souhaitée.

Consultez la section *Concentrations de chargement recommandées*, page 11.

Concentration de chargement finale (pmol)	Concentration des librairies regroupées (nmol)
100	0,5
150	0,75
200	1,0
250	1,25
300	1,5
350	1,75
400	2,0
450	2,25
500	2,5

- Normalisez les librairies à la concentration de chargement des librairies regroupées voulue en utilisant 10 mmol de Tris-HCl, pH 8,5.

Pour obtenir de l'aide au sujet de la dilution des librairies à la concentration appropriée, utilisez le Pooling Calculator (Calculateur de regroupement) à l'adresse support.illumina.com/help/pooling-calculator/pooling-calculator.html.

Concentrations de chargement recommandées

La concentration de chargement optimale de l'ADN dépend du type de librairie et de la taille des inserts. Le tableau ci-dessous montre les concentrations de chargement d'ADN recommandées pour les librairies Illumina dont la taille des inserts est ≤ 450 pb. Pour les librairies dont la taille des inserts est petite, utilisez une concentration de chargement dans la limite inférieure de la fourchette recommandée. Pour les librairies > 450 pb, une concentration de chargement plus grande pourrait être requise.

Tableau 7 Concentrations de chargement recommandées

Type de bibliothèque	Concentration de chargement finale (pmol)	Concentration de chargement des bibliothèques regroupées (nmol)
PhiX ¹	100	0,5
Regroupement de bibliothèques d'ADN sans PCR d'Illumina	300 à 400 ²	1,5 à 2,0 ²
Regroupement de bibliothèques d'ADN sans PCR TruSeq	115 à 235	0,575 à 1,175
Regroupement de bibliothèques d'ADN amplifiées par PCR	200 à 400	1,0 à 2,0
Cellule unique	175 à 275	0,875 à 1,375

¹ Analyses incluant uniquement le contrôle PhiX.

² Calculé sur la base des valeurs suivantes : 450 pb comme taille d'insert médiane, 660 g/mol comme masse d'ADN et concentration ssQubit.

Si vous avez une concentration de chargement optimale pour les instruments HiSeqMC X, HiSeqMC 4000, ou HiSeqMC 3000, utilisez environ la même concentration pour l'instrument NovaSeq 6000. Si vous avez optimisé la concentration de chargement pour le flux de travail standard NovaSeq, utilisez environ 1/3 de moins pour le flux de travail NovaSeq XP.



REMARQUE

Les bibliothèques peuvent avoir besoin d'être titrées pour obtenir une concentration de points d'ancrage optimale. Une fois la concentration de chargement optimale déterminée, elle est applicable pour les types de bibliothèques identiques.

Regrouper les bibliothèques normalisées et ajouter un contrôle PhiX facultatif

- 1 Combinez le volume approprié de chaque bibliothèque normalisée dans un nouveau tube de microcentrifugeuse pour obtenir le volume final approprié par ligne.

Mode	Volume total du regroupement par ligne (µl)
SP/S1	18
S2	22
S4	30

Par exemple, pour un regroupement de bibliothèques à 6 niveaux et un mode S4, combinez 5 µl de chaque bibliothèque ayant été normalisée à la même concentration.

- 2 **[Facultatif]** Stockez le reste des bibliothèques *non regroupées* à une température de -25 à -15 °C.
- 3 **[Facultatif]** Ajoutez 1 % de substance de contrôle PhiX non dénaturée comme suit.
 - a Diluez du contrôle PhiX 10 nmol à 0,25 nmol à l'aide de Tris-HCl 10 mmol, pH 8,5.
 - b Ajoutez le volume approprié de PhiX au tube de regroupement de bibliothèques non dénaturées.

Mode	0,25 nmol de PhiX (µl) non dénaturé	Regroupement de bibliothèques non dénaturées (µl)
SP/S1	0,7	18
S2	0,8	22
S4	1,1	30

Il est recommandé d'ajouter la substance de contrôle PhiX dans un rapport de 1 % pour que les librairies soient bien équilibrées. Les librairies à faible diversité peuvent en nécessiter davantage. Pour utiliser un contrôle PhiX avec des librairies à faible diversité, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina pour obtenir de l'aide.

Préparer une nouvelle dilution de NaOH

Préparez une **nouvelle** dilution de NaOH 0,2 N pour dénaturer les librairies aux fins du séquençage. Pour minimiser les erreurs de pipetage qui modifient la concentration finale du NaOH, préparez au moins 30 µl de NaOH dilué par Flow Cell. Pour une analyse à double Flow Cell, préparez 60 µl de NaOH dilué.



ATTENTION

Le NaOH 0,2 N nouvellement dilué est essentiel au processus de dénaturation. Une mauvaise dénaturation peut faire diminuer le rendement.

- Pour une Flow Cell, combinez les volumes suivants dans un microtube à centrifuger pour diluer le NaOH 1 N en NaOH 0,2 N :
 - ▶ Eau de laboratoire (24 µl)
 - ▶ Stock de NaOH 1 N (6 µl)
 Ces volumes permettent d'obtenir 30 µl de NaOH 0,2 N. Pour deux Flow Cell, doublez les volumes.
- Retournez plusieurs fois pour mélanger ou agitez soigneusement. Laissez le bouchon sur le tube et utilisez dans un délai de **12 heures**.

Dénaturer un regroupement de librairies et un contrôle PhiX facultatif

- Ajoutez le NaOH 0,2 N au tube de regroupement de librairies non dénaturées et de contrôle PhiX facultatif, en procédant comme suit :

Mode	NaOH 0,2 N (µl)	Regroupement de librairies non dénaturées (µl)	Volume obtenu
SP/S1	4,0	18,0	22 µl, ou 22,7 µl avec PhiX
S2	5,0	22,0	27 µl, ou 27,8 µl avec PhiX
S4	7,0	30,0	37,0 µl, ou 38,1 µl avec PhiX

- Mettez le bouchon et agitez brièvement.
- Centrifugez à 280 x g pendant 1 minute.
- Incubez à température ambiante pendant 8 minutes afin de dénaturer.
- Ajoutez 400 mmol de Tris-HCl, pH 8,0 pour neutraliser, conformément aux indications suivantes.

Mode	400 mmol de Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Volume obtenu
SP/S1	5,0	27 µl, ou 27,7 µl avec PhiX
S2	6,0	33,0 µl, ou 33,8 µl avec PhiX
S4	8,0	45,0 µl, ou 46,1 µl avec PhiX

- Mettez le bouchon et agitez brièvement.
- Centrifugez à 280 x g pendant 1 minute.
- Gardez les librairies dénaturées sur la glace jusqu'à ce que vous soyez prêt à ajouter le mélange principal ExAmp.

- 9 **[Facultatif]** Si vous ne pouvez pas commencer l'analyse immédiatement, mettez le bouchon sur le tube et stockez-le entre -25 et -15 °C pendant un maximum de 3 semaines. Ne pas recongeler après la décongélation.



ATTENTION

Ne stockez les regroupements de librairies dénaturées qu'en cas de nécessité. Le stockage à long terme peut augmenter les doublons, ce qui fait diminuer le rendement.



REMARQUE

Après avoir dénaturé et dilué vos librairies et préparé le contrôle PhiX facultatif, procédez à la partie *Préparation de la Flow Cell et du dock* dans la section du flux de travail Xp du *Guide du système NovaSeq 6000* (document n° 1000000019358).

Protocole C : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement standard)

Le flux de travail standard NovaSeq pour les librairies TruSight Oncology 500 ctDNA est utilisé pour dénaturer et diluer les librairies destinées à être chargées sur le système NovaSeq 6000. Pour le chargement des lignes adressables, consultez le chapitre sur le flux de travail NovaSeq Xp du *Guide du système NovaSeq 6000* (document n° 1000000019358). Les librairies préparées à l'aide du flux de travail TruSight Oncology 500 ctDNA sont normalisées à une concentration de départ qui est prête pour le regroupement des échantillons.

Utilisez le protocole C pour le séquençage des librairies TSO500 ctDNA en mode S2 ou S4. Vous pouvez séquencer jusqu'à huit librairies par Flow Cell S2 et jusqu'à 16 librairies par Flow Cell S4.

Pour le chargement Xp, passez au *Protocole D : Méthode de dénaturation et de dilution des librairies TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement Xp)*, page 17.

Préparer un contrôle PhiX (facultatif)

Préparation

- 1 Retirez le RSB du lieu de stockage entre 2 et 8 °C ou -25 et -15 °C et ramenez-le à température ambiante.
- 2 Décongelez un tube de PhiX 10 nmol (10 µl/tube).
- 3 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dHP3 (HP3 dilué).
- 4 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dTris (Tris-HCl dilué).
- 5 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dPhiX (PhiX dilué).

Préparer une nouvelle dilution de NaOH

- 1 Agitez le HP3 pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 2 Combinez les volumes suivants dans le tube dHP3.
 - ▶ Eau sans DNase ni RNase (32,5 µl)
 - ▶ HP3 (7,5 µl)
- 3 Agitez le tube dHP3 pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Préparer une nouvelle dilution de Tris-HCL

- 1 Combinez les volumes suivants dans le tube dTris.
 - ▶ Eau sans DNase ni RNase (25,0 µl)
 - ▶ Tris-HCl 1 mol, pH 8,0 (15,0 µl)
- 2 Agitez le tube dTris pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Diluer le contrôle PhiX

- 1 Agitez le RSB pour mélanger.
- 2 Agitez le contrôle PhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 3 Combinez les volumes suivants dans le tube dPhiX.
 - ▶ RSB (2,0 µl)
 - ▶ Contrôle PhiX (6,0 µl)
- 4 Agitez le tube dPhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 5 **[Facultatif]** Le tube dPhiX peut être conservé entre -25 et -15 °C pendant un maximum de 3 mois.

Dénaturer le contrôle PhiX

- 1 Ajouter 8 µl dHP3 au tube dPhiX.
- 2 Jetez le tube dHP3.
- 3 Agitez le tube dPhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 4 Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
- 5 Ajoutez immédiatement 8 µl de dTris au tube dPhiX pour neutraliser la réaction.
- 6 Jetez le tube dTris.
- 7 Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
La concentration finale de contrôle PhiX est de 2,5 nmol.
- 8 **[Facultatif]** Conservez le contrôle PhiX 2,5 nmol dénaturé entre -25 et -15 °C pendant un maximum de 2 semaines.

Regrouper les bibliothèques normalisées

Préparation

Visitez la page d'assistance de TruSight Oncology 500 ctDNA sur le site Web d'Illumina pour de plus amples renseignements sur le nombre d'échantillons pris en charge par regroupement et par Flow Cell.

- 1 Si la plaque de la bibliothèque normalisée (LN) a été conservée, décongelez-la à température ambiante, puis centrifugez-la à 280 × g pendant 1 minute.
- 2 Préchauffez le bloc chauffant à 96 °C.
- 3 Préparez un seau de glace.

Procédure

- Réglez une pipette sur 30 µl, puis pipettez doucement pour mélanger les librairies dans la plaque de la LN cinq fois.
 - Utilisez les embouts neufs pour chaque librairie.
 Pour un rendement de séquençage optimisé, veillez à mélanger les librairies comme indiqué.
- Étiquetez un tube de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml PDL (pour Pooled DNA Libraries, soit librairies d'ADN regroupées).
- Transférez des volumes égaux de chaque librairie d'ADN normalisée de la plaque LN au tube PDL pour obtenir l'un des volumes suivants :

Mode	Volume de regroupement recommandé (µl)
S2	100
S4	200

Par exemple, pour un regroupement de librairies à 8 niveaux et un mode S2, combinez 12,5 µl de chaque librairie ayant été normalisée à la même concentration.

- Agitez le tube PDL pour mélanger.
- Centrifugez brièvement le tube PDL.

Dénaturer des librairies normalisées

- Incubez le tube PDL sur un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
- Placez immédiatement sur la glace pendant 5 minutes.
- Agitez le tube PDL pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- Placez le tube PDL sur la glace.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous vous arrêtez, stockez les librairies dénaturées entre -25 et -15 °C jusqu'à 30 jours. Pour utiliser les regroupements de librairies congelées, décongelez les tubes et répétez l'opération *Dénaturer des librairies normalisées*, page 16 avant de passer à l'étape suivante.

Diluer des librairies et ajouter un contrôle PhiX facultatif

Préparer le tampon de resuspension

- Retirez le RSB du lieu de stockage entre 2 et 8 °C ou -25 et -15 °C et ramenez-le à température ambiante.

Préparer du PhiX 0,25 nmol dénaturé

- Si le PhiX dénaturé était stocké, retirez le PhiX 2,5 nmol dénaturé de -25 à -15 °C et décongelez-le à température ambiante.
- Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Diluer les librairies

- Étiquetez un nouveau tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml DIL1 (Dilution 1).

- 2 Agitez le tube PDL pour mélanger.
- 3 Centrifugez brièvement le tube PDL.
- 4 Ajoutez le volume approprié de PDL et de RSB au tube DIL1 comme suit.

Mode	PDL (µl)	RSB (µl)	Volume obtenu (µl)
S2	65	160	225
S4	134	331	465

- 5 **[Facultatif]** Ajoutez le volume approprié de 2,5 nmol de PhiX dénaturé au tube DIL1 comme suit.

Mode	2,5 nmol de PhiX (µl)	Volume obtenu (µl)
S2	0,9	225,9
S4	1,9	466,9

- 6 Agitez le tube DIL1 pour mélanger.
- 7 Centrifugez brièvement le tube DIL1.
- 8 Transférez le volume total de DIL1 dans le tube de bibliothèques fourni avec la trousse de réactifs NovaSeq 6000.
- 9 Procédez immédiatement à la *préparation de la cartouche SBS et de la cartouche d'amplification* dans la section du flux de travail standard du *Guide du système NovaSeq 6000 (document n° 100000019358)*. Les cartouches de réactifs et le tube de bibliothèques doivent être chargés dans l'instrument dans un délai de **30 minutes**.

Protocole D : Méthode de dénaturation et de dilution des bibliothèques TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement Xp)

Le flux de travail Xp NovaSeq pour les bibliothèques TruSight Oncology 500 ctDNA est utilisé pour dénaturer et diluer les bibliothèques destinées au chargement adressable sur le système NovaSeq 6000. Les bibliothèques préparées à l'aide du flux de travail TruSight Oncology 500 ctDNA sont normalisées à une concentration de départ qui est prête pour le regroupement des échantillons. Pour le chargement des lignes adressables, consultez le chapitre sur le flux de travail NovaSeq Xp du *Guide du système NovaSeq 6000 (document n° 100000019358)*.

Utiliser le protocole D pour le séquençage des bibliothèques TSO500 ctDNA en mode S4 pour le chargement des lignes adressables. Vous pouvez séquencer jusqu'à six bibliothèques par ligne.

Pour le chargement standard, passez au *Protocole C : Méthode de dénaturation et de dilution des bibliothèques TruSight Oncology 500 ctDNA (chargement standard)*, page 14.

Préparer un contrôle PhiX (facultatif)

Préparation

- 1 Retirez le RSB du lieu de stockage entre 2 et 8 °C ou -25 et -15 °C et ramenez-le à température ambiante.
- 2 Décongelez un tube de PhiX 10 nmol (10 µl/tube).
- 3 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dHP3 (HP3 dilué).
- 4 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dTris (Tris-HCl dilué).

- 5 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dPhiX (PhiX dilué).

Préparer une nouvelle dilution de NaOH

- 1 Agitez le HP3 pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 2 Combinez les volumes suivants dans le tube dHP3.
 - ▶ Eau sans DNase ni RNase (32,5 µl)
 - ▶ HP3 (7,5 µl)
- 3 Agitez le tube dHP3 pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Préparer une nouvelle dilution de Tris-HCL

- 1 Combinez les volumes suivants dans le tube dTris.
 - ▶ Eau sans DNase ni RNase (25,0 µl)
 - ▶ Tris-HCl 1 mol, pH 8,0 (15,0 µl)
- 2 Agitez le tube dTris pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Diluer le contrôle PhiX

- 1 Agitez le RSB pour mélanger.
- 2 Agitez le contrôle PhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 3 Combinez les volumes suivants dans le tube dPhiX.
 - ▶ RSB (2,0 µl)
 - ▶ Contrôle PhiX (6,0 µl)
- 4 Agitez le tube dPhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 5 **[Facultatif]** Le tube dPhiX peut être conservé entre -25 et -15 °C pendant un maximum de 3 mois.

Dénaturer le contrôle PhiX

- 1 Ajouter 8 µl dHP3 au tube dPhiX.
- 2 Jetez le tube dHP3.
- 3 Agitez le tube dPhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 4 Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
- 5 Ajoutez immédiatement 8 µl de dTris au tube dPhiX pour neutraliser la réaction.
- 6 Jetez le tube dTris.
- 7 Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 8 Ajouter 216 µl RSB à la solution PhiX diluée et dénaturée.
- 9 Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
La concentration finale de contrôle PhiX est de 0,25 nmol.
- 10 **[Facultatif]** Conservez le contrôle PhiX 0,25 nmol dénaturé entre -25 et -15 °C pendant un maximum de 2 semaines.

Regrouper les bibliothèques normalisées

Préparation

Visitez la page d'assistance de TruSight Oncology 500 ctDNA sur le site Web d'Illumina pour de plus amples renseignements sur le nombre d'échantillons pris en charge par regroupement et par Flow Cell.

- 1 Si la plaque de la bibliothèque normalisée (LN) a été conservée, décongelez-la à température ambiante, puis centrifugez-la à 280 × g pendant 1 minute.
- 2 Préchauffez le bloc chauffant à 96 °C.
- 3 Préparez un seau de glace.

Procédure

- 1 Réglez une pipette sur 30 µl, puis pipettez doucement pour mélanger les bibliothèques dans la plaque de la LN cinq fois.
 - ▶ Utilisez les embouts neufs pour chaque bibliothèque.
 Pour un rendement de séquençage optimisé, veillez à mélanger les bibliothèques comme indiqué.
- 2 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml PDL_L1 (pour Pooled DNA Libraries_Lane 1). Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire (voir [Tableau 8](#)).

Tableau 8 Convention de dénomination des tubes PDL

Flow Cell	Ligne 1	Ligne 2	Ligne 3	Ligne 4
S4	PDL_L1	PDL_L2	PDL_L3	PDL_L4

- 3 Transférez 5 µl de chaque bibliothèque d'ADN normalisée de la plaque LN au tube PDL, puis répétez l'opération pour chaque ligne supplémentaire.
- 4 Agitez chaque tube PDL pour mélanger.
- 5 Centrifugez brièvement chaque tube PDL.

Dénaturer des bibliothèques normalisées

- 1 Incubez chaque tube PDL sur un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
- 2 Placez immédiatement sur la glace pendant 5 minutes.
- 3 Agitez chaque tube PDL pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 4 Placez les tubes PDL sur la glace.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous vous arrêtez, stockez les bibliothèques dénaturées entre -25 et -15 °C jusqu'à 30 jours. Pour utiliser les regroupements de bibliothèques congelées, décongelez les tubes et répétez l'opération *Dénaturer des bibliothèques normalisées*, page 19 avant de passer à l'étape suivante.

Diluer des bibliothèques et ajouter un contrôle PhiX facultatif

Préparer le tampon de resuspension

- 1 Retirez le RSB du lieu de stockage entre 2 et 8 °C ou -25 et -15 °C et ramenez-le à température ambiante.

Préparer du PhiX 0,25 nmol dénaturé

- 1 Si le PhiX dénaturé était stocké, retirez le PhiX 0,25 nmol dénaturé de -25 à -15 °C et décongelez-le à température ambiante.
- 2 Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Diluer les bibliothèques

- 1 Étiquetez un nouveau tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml DIL1_L1 (Dilution 1_Lane 1). Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire (voir [Tableau 9](#)).

Tableau 9 Convention de dénomination des tubes DIL1

Flow Cell	Ligne 1	Ligne 2	Ligne 3	Ligne 4
S4	DIL1_L1	DIL1_L2	DIL1_L3	DIL1_L4

- 2 Agitez les tubes PDL pour mélanger.
- 3 Centrifugez brièvement les tubes PDL.
- 4 Transférez le volume approprié de PDL et de RSB à chaque tube DIL1 comme suit.

Mode	PDL (µl)	RSB (µl)	Volume obtenu (µl)
S4	6,8	38,2	45

- 5 **[Facultatif]** Ajoutez le volume approprié de PhiX 0,25 nmol dénaturé au tube DIL1 comme suit.

Mode	PhiX 0,25 nmol (µl)	Volume obtenu (µl)
S4	1,1	46,1

- 6 Agitez les tubes DIL1 pour mélanger.
- 7 Centrifugez brièvement les tubes DIL1.
- 8 Après avoir dénaturé et dilué vos bibliothèques et préparé le contrôle PhiX facultatif, procédez à la partie *Préparation de la Flow Cell et du dock* dans la section du flux de travail Xp du *Guide du système NovaSeq 6000* (document n° 100000019358).

Protocole E : Méthode de dénaturation et de dilution des bibliothèques TruSight Oncology 500 HT (chargement standard)

Le flux de travail standard NovaSeq pour les bibliothèques TruSight Oncology 500 HT est utilisé pour dénaturer et diluer les bibliothèques destinées à être chargées sur le système NovaSeq 6000. Pour le chargement standard, consultez le chapitre sur le flux de travail standard NovaSeq du *Guide du système NovaSeq 6000* (document n° 100000019358). Les bibliothèques préparées à l'aide du flux de travail TruSight Oncology 500 HT sont normalisées à une concentration de départ qui est prête pour le regroupement des échantillons.

Utilisez le protocole E pour le séquençage des bibliothèques TSO500 HT en mode SP, S1, S2 ou S4 avec chargement standard. Vous pouvez séquencer jusqu'à 16 échantillons par Flow Cell SP, 32 échantillons par Flow Cell S1, 72 échantillons par Flow Cell S2, et jusqu'à 192 échantillons par Flow Cell S4.

Visitez la page d'assistance de TruSight Oncology 500 HT sur le site Web d'Illumina pour de plus amples renseignements sur le nombre d'échantillons pris en charge par regroupement et par Flow Cell.

Pour le chargement Xp, passez au *Protocole F : Méthode de dénaturation et de dilution des bibliothèques TruSight Oncology 500 HT (chargement Xp)*, page 26.

Préparer un contrôle PhiX (facultatif)

Préparation

- 1 Retirez le RSB du lieu de stockage entre 2 et 8 °C ou -25 et -15 °C et ramenez-le à température ambiante.
- 2 Décongelez un tube de PhiX 10 nmol (10 µl/tube).
- 3 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dHP3 (HP3 dilué).
- 4 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dTris (Tris-HCl dilué).
- 5 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dPhiX (PhiX dilué).

Préparer une nouvelle dilution de NaOH

- 1 Agitez le HP3 pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 2 Combinez les volumes suivants dans le tube dHP3.
 - ▶ Eau sans DNase ni RNase (32,5 µl)
 - ▶ HP3 (7,5 µl)
- 3 Agitez le tube dHP3 pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Préparer une nouvelle dilution de Tris-HCL

- 1 Combinez les volumes suivants dans le tube dTris.
 - ▶ Eau sans DNase ni RNase (25,0 µl)
 - ▶ Tris-HCl 1 mol, pH 8,0 (15,0 µl)
- 2 Agitez le tube dTris pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Diluer le contrôle PhiX

- 1 Agitez le RSB pour mélanger.
- 2 Agitez le contrôle PhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 3 Combinez les volumes suivants dans le tube dPhiX.
 - ▶ RSB (2,0 µl)
 - ▶ Contrôle PhiX (6,0 µl)
- 4 Agitez le tube dPhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 5 **[Facultatif]** Le tube dPhiX peut être conservé entre -25 et -15 °C pendant un maximum de 3 mois.

Dénaturer le contrôle PhiX

- 1 Ajouter 8 µl dHP3 au tube dPhiX.
- 2 Jetez le tube dHP3.
- 3 Agitez le tube dPhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 4 Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
- 5 Ajoutez immédiatement 8 µl de dTris au tube dPhiX pour neutraliser la réaction.
- 6 Jetez le tube dTris.

- 7 Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
La concentration finale de contrôle PhiX est de 2,5 nmol.
- 8 **[Facultatif]** Conservez le contrôle PhiX 2,5 nmol dénaturé entre -25 et -15 °C pendant un maximum de 2 semaines.

Regrouper les librairies normalisées

Préparation

Visitez la page d'assistance de TruSight Oncology 500 HT sur le site Web d'Illumina pour de plus amples renseignements sur le nombre d'échantillons pris en charge par regroupement et par Flow Cell.

- 1 Si la plaque de la librairie normalisée (LN) a été conservée, décongelez-la à température ambiante, puis centrifugez-la à 280 × g pendant 1 minute.
- 2 Préchauffez le bloc chauffant à 96 °C.
- 3 Préparez un seau de glace.

Procédure

- 1 Réglez une pipette multicanaux sur 30 µl, puis pipettez doucement pour mélanger les librairies dans la plaque de la LN cinq fois.
 - ▶ Utilisez les embouts neufs pour chaque librairie.Le rendement du séquençage des librairies est diminué si les librairies ne sont pas suffisamment mélangées avant le regroupement.
- 2 Sélectionnez l'une des options suivantes pour regrouper les librairies normalisées :
 - ▶ Pour séquencer les librairies dérivées d'échantillons d'ARN et d'ADN simultanément, reportez-vous à la section *Regrouper l'ARN et l'ADN*, page 22.
 - ▶ Pour séquencer les librairies dérivées d'échantillons d'ADN seulement, reportez-vous à la section *Regrouper l'ADN seulement*, page 23.

Regrouper l'ARN et l'ADN

- 1 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml PRL (pour Pooled RNA Libraries, soit librairies regroupées d'ARN).
 - ▶ Si vous regroupez plus de 40 librairies d'ARN (cDNA), étiquetez un tube TPRL (pour Transferred Pooled RNA Libraries, soit librairies d'ARN regroupées transférées) de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml supplémentaire.
- 2 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml PDL (pour Pooled DNA Libraries, soit librairies d'ADN regroupées).
 - ▶ Si vous regroupez plus de 40 librairies d'ADN, étiquetez un tube TPDL (pour Transferred Pooled DNA Libraries, soit librairies d'ADN regroupées transférées) de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml supplémentaire.
- 3 Transférez 5 µl de chaque librairie d'ARN normalisée de la plaque LN au tube PRL.
- 4 Transférez 5 µl de chaque librairie d'ADN normalisée de la plaque LN au tube PDL.
- 5 Agitez chaque tube pour mélanger.
- 6 Centrifugez brièvement chaque tube.

- 7 Si le tube PRL contient plus de 40 librairies d'ARN, transférez 200 µl du tube PRL vers le tube TPRL, puis jetez le tube PRL.
- 8 Si le tube PDL contient plus de 40 librairies d'ADN, transférez 200 µl du tube PDL vers le tube TPDL, puis jetez le tube PDL.
- 9 Passez à la section *Dénaturer des librairies normalisées*, page 23.

Regrouper l'ADN seulement

- 1 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml PDL (pour Pooled DNA Libraries, soit librairies d'ADN regroupées).
 - ▶ Si vous regroupez plus de 40 librairies d'ADN, étiquetez un tube TPDL (pour Transferred Pooled DNA Libraries, soit librairies d'ADN regroupées transférées) de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml supplémentaire.
- 2 Transférez 5 µl de chaque librairie d'ADN normalisée de la plaque LN au tube PDL.
- 3 Agitez le tube PDL pour mélanger.
- 4 Centrifugez brièvement le tube PDL.
- 5 Si le tube PDL contient plus de 40 librairies d'ADN, transférez 200 µl du tube PDL vers le tube TPDL, puis jetez le tube PDL.

Dénaturer des librairies normalisées

- 1 Agitez et centrifugez brièvement chacun des tubes suivants.
 - ▶ PRL (\leq 40 librairies d'ARN) ou TPRL ($>$ 40 librairies d'ARN)
 - ▶ PDL (\leq 40 librairies d'ADN) ou TPDL ($>$ 40 librairies d'ADN)
- 2 Incubez sur un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
- 3 Placez immédiatement sur la glace pendant 5 minutes.
- 4 Agitez chaque tube pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 5 Placez les tubes sur la glace.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous vous arrêtez, stockez les librairies dénaturées entre -25 et -15 °C jusqu'à 30 jours. Pour utiliser les regroupements de librairies congelées, décongelez les tubes et répétez l'opération *Dénaturer des librairies normalisées*, page 29 avant de passer à l'étape suivante.

Diluer des librairies et ajouter un contrôle PhiX facultatif

Préparer le tampon de resuspension

- 1 Retirez le RSB du lieu de stockage entre 2 et 8 °C ou -25 et -15 °C et ramenez-le à température ambiante.

Préparer du PhiX 0,25 nmol dénaturé

- 1 Si le PhiX dénaturé était stocké, retirez le PhiX 2,5 nmol dénaturé de -25 à -15 °C et décongelez-le à température ambiante.
- 2 Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Diluer les bibliothèques

- 1 Étiquetez un nouveau tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml DIL1 (Dilution 1).
- 2 Sélectionnez l'une des options suivantes pour diluer vos bibliothèques :
 - ▶ Pour séquencer les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ARN et d'ADN simultanément, reportez-vous à la section *Diluer des bibliothèques d'ARN et d'ADN*, page 24.
 - ▶ Pour séquencer les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ADN seulement, reportez-vous à la section *Diluer les bibliothèques d'ADN seulement*, page 25.

Diluer des bibliothèques d'ARN et d'ADN

- 1 Agitez et centrifugez brièvement chacun des types de tubes suivants :
 - ▶ PRL (≤ 40 bibliothèques d'ARN) ou TPRL (> 40 bibliothèques d'ARN)
 - ▶ PDL (≤ 40 bibliothèques d'ADN) ou TPDL (> 40 bibliothèques d'ADN)

- 2 Transférez le volume approprié de PRL ou de TPRL dénaturés dans le tube DIL1.

Mode	PRL ou TPRL (μl)
SP/S1	10,4
S2	15,6
S4	32,2

- 3 Transférez le volume approprié de PDL ou de TPDL dénaturés dans le tube DIL1.

Mode	PDL ou TPDL (μl)	Volume obtenu (μl)
SP/S1	41,6	52
S2	62,4	78
S4	128,8	161

- 4 Ajoutez le volume approprié de RSB au tube DIL1 comme suit.

Mode	RSB (μl)	Volume obtenu (μl)
SP/S1	98	150
S2	147	225
S4	304	465

- 5 **[Facultatif]** Ajoutez le volume approprié de PhiX 0,25 nmol dénaturé au tube DIL1 comme suit.

Mode	2,5 nmol de PhiX (μl)	Volume obtenu (μl)
SP/S1	0,6	150,6
S2	0,9	225,9
S4	1,9	466,9

- 6 Agitez le tube DIL1 pour mélanger.
- 7 Centrifugez brièvement le tube DIL1.
- 8 Transférez le volume total de DIL1 dans le tube de bibliothèques fourni avec la trousse de réactifs NovaSeq 6000.
- 9 Procédez immédiatement à la *préparation de la cartouche SBS et de la cartouche d'amplification* dans la section du flux de travail standard du *Guide du système NovaSeq 6000 (document n° 1000000019358)*.

Les cartouches de réactifs et le tube de librairies doivent être chargés dans l'instrument dans un délai de **30 minutes**.



REMARQUE

Utilisez 10 cycles d'index pour le séquençage des librairies TSO500HT

Diluer les librairies d'ADN seulement

- 1 Agitez le tube et centrifugez ensuite brièvement.
 - ▶ PDL (≤ 40 librairies d'ADN)
 - ▶ TPDL (> 40 librairies d'ADN)
- 2 Ajoutez le volume approprié de PDL ou de TPDL au tube DIL1.

Mode	PDL ou TPDL (µl)
SP/S1	52
S2	78
S4	161

- 3 Ajoutez le volume approprié de RSB au tube DIL1 comme suit.

Mode	RSB (µl)	Volume obtenu (µl)
SP/S1	98	150
S2	147	225
S4	304	465

- 4 **[Facultatif]** Ajoutez le volume approprié de PhiX 0,25 nmol dénaturé au tube DIL1 comme suit.

Mode	2,5 nmol de PhiX (µl)	Volume obtenu (µl)
SP/S1	0,6	150,6
S2	0,9	225,9
S4	1,9	466,9

- 5 Agitez le tube DIL1 pour mélanger.
- 6 Centrifugez brièvement le tube DIL1.
- 7 Transférez le volume total de DIL1 dans le tube de librairies fourni avec la trousse de réactifs NovaSeq 6000.
- 8 Procédez immédiatement à la *préparation de la cartouche SBS et de la cartouche d'amplification* dans la section du flux de travail standard du *Guide du système NovaSeq 6000 (document n° 1000000019358)*. Les cartouches de réactifs et le tube de librairies doivent être chargés dans l'instrument dans un délai de **30 minutes**.



REMARQUE

Utilisez 10 cycles d'index pour le séquençage des librairies TSO500HT

Protocole F : Méthode de dénaturation et de dilution des bibliothèques TruSight Oncology 500 HT (chargement Xp)

Le flux de travail Xp NovaSeq pour les bibliothèques TruSight Oncology 500 HT est utilisé pour dénaturer et diluer les bibliothèques destinées à être chargées sur le système NovaSeq 6000. Pour le chargement des lignes adressables, consultez le chapitre sur le flux de travail NovaSeq Xp du *Guide du système NovaSeq 6000* (document n° 1000000019358). Les bibliothèques préparées à l'aide du flux de travail TruSight Oncology 500 HT sont normalisées à une concentration de départ qui est prête pour le regroupement des échantillons.

Utilisez le protocole F pour le séquençage des bibliothèques TSO500 HT en mode SP, S1, S2 ou S4 avec chargement Xp. Vous pouvez séquençer jusqu'à 8 échantillons par ligne sur une Flow Cell SP, 16 échantillons par ligne sur une Flow Cell S1, 32 échantillons par ligne sur une Flow Cell S2, et jusqu'à 48 échantillons par ligne sur une Flow Cell S4.

Visitez la page d'assistance de TruSight Oncology 500 HT sur le site Web d'Illumina pour de plus amples renseignements sur le nombre d'échantillons pris en charge par regroupement et par Flow Cell.

Pour le chargement standard, passez au *Protocole E : Méthode de dénaturation et de dilution des bibliothèques TruSight Oncology 500 HT (chargement standard)*, page 20.

Préparer un contrôle PhiX (facultatif)

Préparation

- 1 Retirez le RSB du lieu de stockage entre 2 et 8 °C ou -25 et -15 °C et ramenez-le à température ambiante.
- 2 Décongelez un tube de PhiX 10 nmol (10 µl/tube).
- 3 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dHP3 (HP3 dilué).
- 4 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dTris (Tris-HCl dilué).
- 5 Étiquetez un tube de microcentrifugeuse en y inscrivant dPhiX (PhiX dilué).

Préparer une nouvelle dilution de NaOH

- 1 Agitez le HP3 pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 2 Combinez les volumes suivants dans le tube dHP3.
 - ▶ Eau sans DNase ni RNase (32,5 µl)
 - ▶ HP3 (7,5 µl)
- 3 Agitez le tube dHP3 pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Préparer une nouvelle dilution de Tris-HCL

- 1 Combinez les volumes suivants dans le tube dTris.
 - ▶ Eau sans DNase ni RNase (25,0 µl)
 - ▶ Tris-HCl 1 mol, pH 8,0 (15,0 µl)
- 2 Agitez le tube dTris pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Diluer le contrôle PhiX

- 1 Agitez le RSB pour mélanger.

- 2 Agitez le contrôle PhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 3 Combinez les volumes suivants dans le tube dPhiX.
 - ▶ RSB (2,0 µl)
 - ▶ Contrôle PhiX (6,0 µl)
- 4 Agitez le tube dPhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 5 **[Facultatif]** Le tube dPhiX peut être conservé entre -25 et -15 °C pendant un maximum de 3 mois.

Dénaturer le contrôle PhiX

- 1 Ajouter 8 µl dHP3 au tube dPhiX.
- 2 Jetez le tube dHP3.
- 3 Agitez le tube dPhiX pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 4 Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
- 5 Ajoutez immédiatement 8 µl de dTris au tube dPhiX pour neutraliser la réaction.
- 6 Jetez le tube dTris.
- 7 Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 8 Ajouter 216 µl de RSB au tube dPhiX.
- 9 Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
La concentration finale de contrôle PhiX est de 0,25 nmol.
- 10 **[Facultatif]** Conservez le contrôle PhiX 0,25 nmol dénaturé entre -25 et -15 °C pendant un maximum de 2 semaines.

Regrouper les librairies normalisées

Préparation

Visitez la page d'assistance de TruSight Oncology 500 HT sur le site Web d'Illumina pour de plus amples renseignements sur le nombre d'échantillons pris en charge par regroupement et par Flow Cell.

- 1 Si la plaque de la librairie normalisée (LN) a été conservée, décongelez-la à température ambiante, puis centrifugez-la à 280 × g pendant 1 minute.
- 2 Préchauffez le bloc chauffant à 96 °C.
- 3 Préparez un seau de glace.

Procédure

- 1 Réglez une pipette multicanaux sur 30 µl, puis pipettez doucement pour mélanger les librairies dans la plaque de la LN cinq fois.
 - ▶ Utilisez les embouts neufs pour chaque librairie.Le rendement du séquençage des librairies est diminué si les librairies ne sont pas suffisamment mélangées avant le regroupement.
- 2 Sélectionnez l'une des options suivantes pour regrouper les librairies normalisées.
 - ▶ Pour séquencer les librairies dérivées d'échantillons d'ARN et d'ADN simultanément, reportez-vous à la section *Regrouper l'ARN et l'ADN*, page 28.

- Pour séquencer les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ADN seulement, reportez-vous à la section *Regrouper l'ADN seulement*, page 29.



REMARQUE

Dans la procédure, utilisez les tableaux de convention de dénomination comme guide pour l'étiquetage des tubes. Veillez à ce que les tubes que vous transférez soient correctement étiquetés avec la ligne de la Flow Cell correspondante.

Regrouper l'ARN et l'ADN

- 1 Étiquetez un tube PRL de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml avec le numéro de la ligne de la Flow Cell. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire. Utilisez le [Tableau 10](#) comme guide.
 - Si vous regroupez plus de 40 bibliothèques d'ARN (cDNA), étiquetez un tube TPRL de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml supplémentaire avec le numéro de la ligne de la Flow Cell. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire.

Tableau 10 Convention de dénomination des tubes d'ARN

Flow Cell	Ligne 1	Ligne 2	Ligne 3	Ligne 4
SP/S1	PRL_L1	PRL_L2	S. O.	S. O.
S2	PRL_L1	PRL_L2	S. O.	S. O.
S4	PRL_L1	PRL_L2	PRL_L3	PRL_L4

- 2 Étiquetez un tube PDL de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml avec le numéro de la ligne de la Flow Cell. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire. Utilisez le [Tableau 11](#) comme guide.
 - Si vous regroupez plus de 40 bibliothèques d'ADN, étiquetez un tube TPDL de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml supplémentaire avec le numéro de la ligne de la Flow Cell. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire.

Tableau 11 Convention de dénomination des tubes d'ADN

Flow Cell	Ligne 1	Ligne 2	Ligne 3	Ligne 4
SP/S1	PDL_L1	PDL_L2	S. O.	S. O.
S2	PDL_L1	PDL_L2	S. O.	S. O.
S4	PDL_L1	PDL_L2	PDL_L3	PDL_L4

- 3 Transférez 5 µl de chaque bibliothèque d'ARN normalisée de la plaque LN au tube PRL. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire.
- 4 Transférez 5 µl de chaque bibliothèque d'ADN normalisée de la plaque LN au tube PDL. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire.
- 5 Agitez chaque tube pour mélanger.
- 6 Centrifugez brièvement chaque tube.
- 7 Si le tube PRL contient plus de 40 bibliothèques d'ARN, transférez 200 µl du tube PRL vers le tube TPRL, puis jetez le tube PRL. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire.
- 8 Si le tube PDL contient plus de 40 bibliothèques d'ADN, transférez 200 µl du tube PDL vers le tube TPDL, puis jetez le tube PDL. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire.
- 9 Passez à la section *Dénaturer des bibliothèques normalisées*, page 29.

Regrouper l'ADN seulement

- 1 Étiquetez un tube PDL de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml avec le numéro de la ligne de la Flow Cell. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire.
Utilisez le [Tableau 12](#) comme guide.

Tableau 12 Convention de dénomination des tubes d'ADN

Flow Cell	Ligne 1	Ligne 2	Ligne 3	Ligne 4
SP/S1	PDL_L1	PDL_L2	S. O.	S. O.
S2	PDL_L1	PDL_L2	S. O.	S. O.
S4	PDL_L1	PDL_L2	PDL_L3	PDL_L4

- ▶ Si vous regroupez plus de 40 bibliothèques d'ADN, étiquetez un tube TPDL (pour Transferred Pooled DNA Libraries, soit bibliothèques d'ADN regroupées transférées) de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml supplémentaire avec le numéro de la ligne de la Flow Cell. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire.
- 2 Transférez 5 µl de chaque bibliothèque d'ADN normalisée de la plaque LN au tube PDL. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire.
 - 3 Agitez chaque tube pour mélanger.
 - 4 Centrifugez brièvement chaque tube.
 - 5 Si le tube PDL contient plus de 40 bibliothèques d'ADN, transférez 200 µl du tube PDL vers le tube TPDL, puis jetez le tube PDL. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire.

Dénaturer des bibliothèques normalisées

- 1 Agitez et centrifugez brièvement chacun des tubes suivants :
 - ▶ PRL (≤ 40 bibliothèques d'ARN) ou TPRL (> 40 bibliothèques d'ARN)
 - ▶ PDL (≤ 40 bibliothèques d'ADN) ou TPDL (> 40 bibliothèques d'ADN)
- 2 Incubez sur un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
- 3 Placez immédiatement sur la glace pendant 5 minutes.
- 4 Agitez chaque tube pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.
- 5 Placez les tubes sur la glace.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous vous arrêtez, stockez les bibliothèques dénaturées entre -25 et -15 °C jusqu'à 30 jours. Pour utiliser les regroupements de bibliothèques congelées, décongelez les tubes et répétez l'opération *Dénaturer des bibliothèques normalisées*, [page 29](#) avant de passer à l'étape suivante.

Diluer des bibliothèques et ajouter un contrôle PhiX facultatif

Préparer le tampon de resuspension

- 1 Retirez le RSB du lieu de stockage entre 2 et 8 °C ou -25 et -15 °C et ramenez-le à température ambiante.

Préparer du PhiX 0,25 nmol dénaturé

- 1 Si le PhiX dénaturé était stocké, retirez le PhiX 0,25 nmol dénaturé de -25 à -15 °C et décongelez-le à température ambiante.
- 2 Agitez pour mélanger et centrifugez ensuite brièvement.

Diluer les bibliothèques

- 1 Sélectionnez l'une des options suivantes pour diluer vos bibliothèques
 - ▶ Pour séquencer les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ARN et d'ADN simultanément, reportez-vous à la section *Diluer des bibliothèques d'ARN et d'ADN*, page 30.
 - ▶ Pour séquencer les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ADN seulement, reportez-vous à la section *Diluer les bibliothèques d'ADN seulement*, page 31.

Diluer des bibliothèques d'ARN et d'ADN

- 1 Étiquetez un nouveau tube de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml pour combiner les bibliothèques de PRL et de PDL. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire. Utilisez le **Tableau 13** comme guide.

Tableau 13 Convention de dénomination pour les tubes combinés PRL et PDL

Flow Cell	Ligne 1	Ligne 2	Ligne 3	Ligne 4
SP/S1	PRL+PDL_L1	PRL+PDL_L2	S. O.	S. O.
S2	PRL+PDL_L1	PRL+PDL_L2	S. O.	S. O.
S4	PRL+PDL_L1	PRL+PDL_L2	PRL+PDL_L3	PRL+PDL_L4

- 2 Agitez et centrifugez brièvement chacun des types de tubes suivants :
 - ▶ PRL (≤ 40 bibliothèques d'ARN) ou TPRL (> 40 bibliothèques d'ARN)
 - ▶ PDL (≤ 40 bibliothèques d'ADN) ou TPDL (> 40 bibliothèques d'ADN)
- 3 Transférez 5 µl de chaque tube PRL ou TPRL dans le tube PRL+PDL correspondant.
- 4 Transférez 20 µl de chaque tube PDL ou TPDL dans le tube PRL+PDL correspondant.
- 5 Agitez les tubes PRL+PDL pour mélanger.
- 6 Centrifugez brièvement les tubes PRL+PDL.
- 7 Étiquetez un nouveau tube de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml pour diluer les bibliothèques de PRL+PDL. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire. Utilisez le **Tableau 14** comme guide.

Tableau 14 Convention de dénomination des tubes DIL 1

Flow Cell	Ligne 1	Ligne 2	Ligne 3	Ligne 4
SP/S1	DIL1_L1	DIL1_L2	S. O.	S. O.
S2	DIL1_L1	DIL1_L2	S. O.	S. O.
S4	DIL1_L1	DIL1_L2	DIL1_L3	DIL1_L4

- 8 Transférez le volume approprié de PRL et PDL combinés dans chacun des tubes DIL1 correspondants.

Flow Cell	PRL+PDL (µl)
SP/S1	4
S2	5
S4	6,8

- 9 Ajoutez le volume approprié de RSB dans chacun des tubes DIL1 correspondants.

Flow Cell	RSB (µl)	Volume obtenu (µl)
SP/S1	23	27
S2	28	33
S4	38,2	45

- 10 **[Facultatif]** Ajoutez le volume approprié de PhiX 0,25 nmol dénaturé à chaque tube DIL1 correspondant.

Flow Cell	PhiX 0,25 nmol (µl)	Volume obtenu (µl)
SP/S1	0,7	27,7
S2	0,8	33,8
S4	1,1	46,1

- 11 Agitez les tubes DIL1 pour mélanger.
 12 Centrifugez brièvement les tubes DIL1.
 13 Après avoir dénaturé et dilué vos librairies et préparé le contrôle PhiX facultatif, procédez à la partie *Préparation de la Flow Cell et du dock* dans la section du flux de travail Xp du *Guide du système NovaSeq 6000 (document n° 100000019358)*.



REMARQUE

Utilisez 10 cycles d'index pour le séquençage des librairies TSO500HT

Diluer les librairies d'ADN seulement

- 1 Étiquetez un nouveau tube de microcentrifugeuse à bouchon vissé de 1,5 ml pour diluer les librairies PDL. Répétez l'opération pour toute ligne supplémentaire. Utilisez le [Tableau 15](#) comme guide.

Tableau 15 Convention de dénomination des tubes

Flow Cell	Ligne 1	Ligne 2	Ligne 3	Ligne 4
SP/S1	DIL1_L1	DIL1_L2	S. O.	S. O.
S2	DIL1_L1	DIL1_L2	S. O.	S. O.
S4	DIL1_L1	DIL1_L2	DIL1_L3	DIL1_L4

- 2 Agitez et centrifugez brièvement les tubes PDL ou TPDL.
 3 Transférez le volume approprié de PDL ou TPDL dans chacun des tubes DIL1 correspondants.

Flow Cell	PDL ou TPDL (µl)
SP/S1	4
S2	5
S4	6,8

- 4 Ajoutez le volume approprié de RSB dans chacun des tubes DIL1 correspondants.

Flow Cell	RSB (µl)	Volume obtenu (µl)
SP/S1	23	27
S2	28	33
S4	38,2	45

- 5 **[Facultatif]** Ajoutez le volume approprié de PhiX 0,25 nmol dénaturé à chaque tube DIL1 correspondant.

Flow Cell	PhiX 0,25 nmol (µl)	Volume obtenu (µl)
SP/S1	0,7	27,7
S2	0,8	33,8
S4	1,1	46,1

- 6 Agitez les tubes DIL1 pour mélanger.
- 7 Centrifugez brièvement les tubes DIL1.
- 8 Après avoir dénaturé et dilué vos bibliothèques et préparé le contrôle PhiX facultatif, procédez à la partie *Préparation de la Flow Cell et du dock* dans la section du flux de travail Xp du *Guide du système NovaSeq 6000 (document n° 1000000019358)*.



REMARQUE

Utilisez 10 cycles d'index pour le séquençage des bibliothèques TSO500HT.

Historique des révisions

Document	Date	Description des modifications
Document n° 1000000106351 v03	Novembre 2020	Ajout de renseignements concernant les cycles d'index pour le séquençage des librairies TruSight Oncology 500 High Throughput.
Document n° 1000000106351 v02	Juillet 2020	Ajout d'informations relatives à la trousse de réactifs NovaSeq 6000 Reagent Kit v1.5.
Document n° 1000000106351 v01	Mars 2020	Ajout des protocoles E et F pour les méthodes de chargement TruSight Oncology 500 HT standard et Xp.
Document n° 1000000106351 v00	Janvier 2020	Publication originale.

Assistance technique

Pour obtenir de l'assistance technique, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.

Site Web : www.illumina.com
Courriel : techsupport@illumina.com

Numéros de téléphone de l'assistance clientèle d'Illumina

Région	Sans frais	Numéro régional
Amérique du Nord	+1 800 809-4566	
Allemagne	+ 49 8001014940	+ 49 8938035677
Australie	+ 1 800 775 688	
Autriche	+43 800006249	+ 43 19286540
Belgique	+ 32 80077160	+ 32 34002973
Chine	400 066 5835	
Corée du Sud	+ 82 80 234 5300	
Danemark	+ 45 80820183	+ 45 89871156
Espagne	+ 34 911899417	+ 34 800300143
Finlande	+ 358 800918363	+ 358 974790110
France	+ 33 805102193	+ 33 170770446
Hong Kong, Chine	800960230	
Irlande	+ 353 1800936608	+353 016950506
Italie	+ 39 800985513	+ 39 236003759
Japon	0800 111 5011	
Norvège	+47 800 16836	+ 47 21939693
Nouvelle-Zélande	0800 451 650	
Pays-Bas	+ 31 8000222493	+ 31 207132960
Royaume-Uni	+ 44 8000126019	+ 44 2073057197
Singapour	+ 1 800 579 2745	
Suède	+ 46 850619671	+ 46 200883979
Suisse	+ 41 565800000	+ 41 800200442
Taïwan, Chine	00806651752	
Autres pays	+ 44 1799 534 000	

Fiches signalétiques (SDS) : disponibles sur le site Web d'Illumina à l'adresse support.illumina.com/sds.html.

Documentation sur les produits : disponible en téléchargement sur le site support.illumina.com.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Californie 92122 États-Unis

+ (1) 800 809 ILMN (4566)

+ (1) 858 202 4566 (en dehors de l'Amérique du Nord)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

**Destiné à la recherche uniquement.
Ne pas utiliser dans le cadre d'examens diagnostiques.**

© 2020 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

illumina®