

KASUTAMISEKS IN VITRO DIAGNOSTIKAS. AINULT EKSPORDIKS.

## Kasutusotstarve

Komplekt Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx on reaktiivide ja kulutarvikute komplekt, mida kasutatakse prooviteekide ettevalmistamiseks inimese rakkudest ja koest saadud genoomsest DNA-st *in vitro*. Kasutaja tarnitud sondipaneelid on vajalikud konkreetsetele huvipakkuvatele genoomsetele piirkondadele suunatud teekide ettevalmistamiseks. Loodud prooviteegid on ette nähtud Illumina sekveneerimissüsteemides kasutamiseks. Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx sisaldab tarkvara käituse seadistamise, jälgimise ja analüüsi sekveneerimiseks.

## Protseduuri põhimõtted

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on ette nähtud selliste DNA sekveneerimisteekide ettevalmistamiseks, mis on rikastatud inimese rakkudest ja kudedest pärineva genoomse DNA sihtpiirkondade jaoks.

Kasutaja poolt tarnitud biotinüülitud oligonukleotiidi paneelid on vajalikud sihtmärgi rikastamiseks. Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ühildub erinevate paneelisuurustega, sealhulgas väikeste paneelidega (< 20 000 sondi) ning suurte paneelidega (> 200 000 sondi). Loodud rikastatud teegid on ette nähtud Illumina sekveneerimissüsteemides sekveneerimiseks.

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx protseduur koosneb järgmistest sammudest:

- **Genoomse DNA märgistamine** – kasutab DNA sisendi märgistamiseks Enrichment BLT Small (eBLTS). Märgistamise ajal fragmenteeritakse gDNA ja märgistatakse adapteritega ühes etapis. eBLTS küllastamiseks märgistamisreaktsioonis on vajalik minimaalselt 50 ng DNA sisend. Küllastumise korral fragmenteerib eBLTS teatud arvu DNA molekule, et luua järjepideva fragmendi suuruse jaotusega normaliseeritud teegid.
- **Märgistamisjärgne puhastus** – puhastab eBLTS adapteriga märgistatud DNA, et seda amplifitseerimisel kasutada.
- **Märgistatud DNA amplifitseerimine** – amplifitseerib märgistatud DNA-d, kasutades piiratud tsüklilise PCR-programmi. DNA fragmentide otstesse lisatakse unikaalsed kahekordsed (UD) indeksid, mis võimaldavad DNA teekide kahekordset ainulaadset võotkodeerimist ja klastri loomist sekveneerimise ajal.
- **Teekide puhastamine** – kasutab helmeste puhastamise protseduuri amplifitseeritud DNA teekide puhastamiseks ja nende suuruse valimiseks.
- **Teekide ühendamise** – kombineerib ainulaadsete indeksitega DNA teegid üheks kuni 12 teegist koosnevaks kogumiks. Saate ühendada teekke mahu või massi järgi.
- **Sondide hübriidatsioon** – koosneb hübriidatsioonireaktsioonist, mille käigus kaheaheelised DNA teegid denatureeritakse ja biotinüülitud DNA sondide paneel hübriidiseeritakse genoomsete sihtpiirkondadega.

- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ühildub mitme paneeliga. Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ei sisalda rikastuspaneeli. Sondipaneelid tarnib kasutaja ja need peavad vastama nõutavatele spetsifikatsioonidele. Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reagentid ühilduvad nii Illumina kui kolmanda osapoole rikastamise DNA oligonukleotiidi paneelidega, mis vastavad nõutavatele spetsifikatsioonidele. Teavet kolmanda poole paneelide nõutavate spetsifikatsioonide kohta vt jaotisest [Rikastussondi paneeli nõuded leheküljel 10](#)
- **Hübridiseeritud sondide sidumine** – kasutab sihitud huvipiirkondadele hübridiseeritud biotinüülitud sondide sidumiseks Streptavidin Magnetic Beads(SMB3) .
- **Rikastatud teekide amplifitseerimine** – kasutab rikastatud teekide amplifitseerimiseks PCR-i.
- **Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine** – sekveneerimiseks valmis rikastatud teekide puhastamiseks kasutatakse helmepuhastuse protseduuri.
- **Sekveneerimine** – rikastatud teekide sekveneerimine toimub sekveneerimissüsteemis MiSeqDx, NextSeq 550Dx või NovaSeq 6000Dx. Seadmete MiSeqDx ja NextSeq 550Dx puhul kasutatakse integreeritud DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager moodulit käituse seadistamiseks, käituse jälgimiseks ja FASTQ loomiseks aluse nimetustest. DRAGEN Serveri ja NovaSeq 6000Dx-iga NextSeq 550Dx puhul kasutatakse DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakendust käituse häälestamiseks ja sekundaarseks analüüsiks mitme saadaoleva töövooga.

## Protseduuri piirangud

- Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ühildub inimese rakkudest ja kudetest pärineva genoomse DNA-ga.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ühildub kaheaheelaliste gDNA sisenditega 50–1000 ng. Nendest lävedest väljapoole jäävate sisendite puhul ei ole jõudlus garanteeritud.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ei sisalda reagente DNA ekstraheerimiseks. Analüütiliste testimiste tulemused, sealhulgas häiretestid, mis on esitatud jaotises [Toimivusnäitajad leheküljel 58](#), on saadud täisverest ja FFPE-st kui representatiivsetest proovitüüpidest koos representatiivsete DNA ekstraheerimiskomplektidega. Kõik diagnostilised testid, mis on välja töötatud kasutamiseks koos Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiividega, nõuavad täielikku valideerimist kõigi valitud DNA ekstraheerimiskomplekti toimimise aspektide jaoks.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ei ole soovitatav halva kvaliteediga FFPE proovide puhul, mille  $\Delta Cq > 5$ . Proovide kasutamine, mille  $\Delta Cq > 5$ , võib suurendada teegi ettevalmistamise ebaõnnestumise tõenäosust ja vähendada analüüsi toimivust.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid on konfigureeritud ja testitud järgmises tabelis näidatud proovisisendi, rikastamisreaktsioonide ja kordsuse suhtes.

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx	Proovisisend	Rikastamise reaktsioonid	Rikastamise kordsus
16 prooviga komplekt	Halb kvaliteet (FFPE)	16 reaktsiooni	1-kordne
96 prooviga komplekt	Hea kvaliteet (nt täisveri)	8 reaktsiooni	12-kordne

- FFPE sisendi töötlemist on testitud ja see on soovitatav ainult 1-kordsete rikastamisreaktsioonide jaoks 16 prooviga komplekti kasutamise korral.
- 96 prooviga komplekti puhul on võimalikud mittestandardised kordsused (2-kordsed kuni 11-kordsed), kuid neil on järgmised piirangud.
  - Proovide töötlemine 2-kordsetes kuni 11-kordsetes rikastamisreaktsioonides vähendab komplekti läbilaskevõimet.
  - Optimaalsed tulemused pole garanteeritud. Mittestandardsete kordsuste jaoks sobiva rikastussaagise saamine võib nõuda täiendavat optimeerimist.
  - Väikese kordsusega kogumisstrateegiate (2-kordne kuni 8-kordne) puhul on nõutav erinevate järjestustega indeksadapterite valimine, et optimeerida eduka sekveneerimise ja andmeanalüüsi jaoks värvi tasakaalu. Moodul DNA Generate FASTQ Dx mudelitel MiSeqDx ja NextSeq 550Dx pakub käituse seadistamise ajal valikuid värvide tasakaalustatud indeksikombinatsioonide jaoks. Lisateavet kogumisstrateegiate kohta vt jaotisest [Kogumismeetodid leheküljel 34](#).
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx piirdub rikastatud teekide edastamisega, mis on sekveneeritud ainult mudelite MiSeqDx, NextSeq 550Dx ja NovaSeq 6000Dx abil. Teiste sekveneerimissüsteemide kasutamine nõuab jõudluse kõigi aspektide täielikku valideerimist.
- Rikastuspaneelid ei kuulu selle toote hulka. Analüütiliste testimiste tulemused, mis on esitatud jaotises [Toimivusnäitajad leheküljel 58](#), on saadud tüüpiliste rikastuspaneelide abil ja need on esitatud ainult teavitamise eesmärgil. Analüütiliste toimivusnäitajate eesmärk on näitlikustada analüüsi üldisi võimeid ja need ei määra ühegi konkreetse analüüsi väitega seotud võimalusi ega sobivust. Kõik diagnostilised testid, mis on välja töötatud kasutamiseks koos nende reaktiividega, nõuavad täielikku valideerimist kõigi aspektide jaoks.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ühildub nii Illumina kui kolmanda osapoole rikastuspaneelidega. Siiski ei ole toimivus kolmanda poole rikastuspaneelidega, mis ei vasta paneeli nõuetele, garanteeritud. Teavet paneeli nõuete kohta vt jaotisest [Rikastussondi paneeli nõuded leheküljel 10](#).
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kasutab 2-tunnist hübriidisatsiooniaega. Pikema hübriidisatsiooniaja kasutamine võib toimivusnäitajaid mõjutada.
- DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager moodulid MiSeqDx ja NextSeq 550Dx edastavad ainult FASTQ-faile. Nende moodulite kasutamisel peale läbi viima sekundaarse analüüsi valideerimise.

- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakendus on saadaval NextSeq 550Dx koos DRAGEN Serveri ja NovaSeq 6000Dx-iga. Rakendus toetab mitut sekundaarse analüüsi töövoogu, sealhulgas FASTQ genereerimist, FASTQ ja VCF-i genereerimist iduliini variantide tuvastamiseks ning FASTQ ja VCF-i genereerimist somaatiliste variantide tuvastamiseks. Kui kasutate rakendust VCF-i loomiseks, ei pea te sekundaarse analüüsi valideerimist tegema. Rakenduse piirangud hõlmavad järgmist:
  - Pikkusega > 18 bp insertioonid ja pikkusega > 21 bp deletsioonid ei ole valideeritud.
  - Suuri variante, sealhulgas mitmenukleotiidseid variante (MNV-d) ja suuri indeleid, võidakse VCF-väljundfailis märkida eraldi väiksemate variantidena.
  - Väikesed MNV-d esitatakse väljund-VCF-failis eraldi variantidena.
  - Deletsioone märgitakse VCF-is eelmise aluse koordinaadis VCF-vormingu kohaselt. Seega kaaluge läheduses olevaid variante, enne kui märgite, et konkreetse aluse nimetus on homosügootne referents.
  - Mooduli Germline piirangud:
    - Rakenduse DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Germline FASTQ ja VCF-i genereerimise töövoogu kasutamine on loodud pakkuma kvalitatiivseid tulemusi iduliini variantide (nt homosügootne, heterosügootne, metsik tüüp) nimetamiseks.
    - Koopiaarvu variatsioon võib mõjutada seda, kas variant tuvastatakse homosügooti või heterosügootina.
    - Süsteem ei esita ühes lookuses rohkem kui kahte varianti, isegi koopiite arvu variatsiooni korral.
  - Mooduli Somatic piirangud:
    - Rakenduse DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Somatic FASTQ ja VCF-i genereerimise töövoogu rakenduses kasutamine on ette nähtud pakkuma kvalitatiivseid tulemusi somaatiliste variantide (s.t somaatiliste variantide olemasolu) nimetamiseks.
    - Somaatiline FASTQ ja VCF-i genereerimise analüüsi töövoog ei suuda eristada iduliini ja somaatilisi variante. Moodul on ette nähtud variantide tuvastamiseks eri variantide sageduste seast, kuid variandi sagedust ei saa kasutada iduliini variantide ja somaatiliste variantide eristamiseks.
    - Proovis sisalduv normaalne kude mõjutab variantide tuvastamist. Kirjeldatud avastamispiir põhineb variandi sagedusel võrreldes kogu DNA-ga, mis on võetud nii kasvajas ja normaalsest koest.
    - Kui samas lookuses nimetatakse rohkem kui üks variantalleel, ei esitata ühtki alleeli läbivate variantidena. Selle asemel esitatakse alleelide täielik komplekt, kuid filtreeritakse läbi multialleelsildi.

## Toote komponendid

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx koosneb järgmistest komponentidest.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, kataloogi nr 20051354 (16 proovi) või nr 20051352 (96 proovi)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, kataloogi nr 20051355 (16 proovi) või nr 20051353 (96 proovi)

- Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Module seadmele NextSeq 550Dx, kataloogi nr 20063024
- Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Module seadme MiSeqDx jaoks, kataloogi nr 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx NovaSeq 6000Dx rakendus, kataloogi nr 20074609
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx NextSeq 550Dx rakendus, kataloogi nr 20074730

## Komplekti kuuluvad reaktiivid

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on täielik, kui see hõlmab toodet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A või toodet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Saate läbi viia järgmise hulga teegi ettevalmistamise ja rikastamise reaktsioone, kasutades 16 proovi või 96 prooviga komplekti.

<b>Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx</b>	<b>Proovisisend</b>	<b>Rikastamise reaktsioonid</b>	<b>Rikastamise kordsus</b>
16 prooviga komplekt	Halb kvaliteet (FFPE)	16 reaktsiooni	1-kordne
96 prooviga komplekt	Hea kvaliteet (nt täisveri)	8 reaktsiooni	12-kordne

## Illumina DNA ettevalmistus Enrichment Dx abil UD indeksite komplektiga A/B

### Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, hoida temperatuuril 15 °C kuni 30 °C

Järgmisi reaktiive tarnitakse toatemperatuuril. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht		Korgi värv	Täidetud maht	Toimeained
	16 proovi (nr 20050020)	96 proovi (nr 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Punane	350 µl	Pesuaine lahus vees.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Roheline	41 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab pesuainet ja soola.
Cleanup Beads (CB)	1	Ei kohaldata*	Punane	10 ml	Tahke faasi paramagnetilised helmed puhverdatud vesilahuses.

\* Cleanup Beads 96 prooviga komplekti puhul sisalduvad helmed Cleanup Beads komplektis Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (kataloogi nr 20050030).

### Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 proovi), hoida temperatuuril 15 °C kuni 30 °C

96 prooviga komplekti puhul sisalduvad Cleanup Beads komplektis Illumina Prep Dx Cleanup Beads Dx (kataloogi nr 20050030). Järgmine reaktiiv tarnitakse toatemperatuuril. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril. 16 prooviga komplekti puhul sisalduvad Cleanup Beads komplektis Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (kataloogi nr 20050020).

Reaktiivi nimi	Kogus	Korgi värv	Täidetud maht	Toimeained
Cleanup Beads (CB)	4	Punane	10 ml	Tahke faasi paramagnetilised helmed puhverdatud vesilahuses.

### Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, hoida temperatuuril 2 °C kuni 8 °C

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril. Hoidke eBLTS varulahuse katsutit püstises asendis, nii et helmed oleksid alati puhvrissse sukeldatud.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht		Korgi värv	Täidetud maht		Toimeained
	16 proovi (nr 20050021)	96 proovi (nr 20050026)		16 proovi	96 proovi	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Kollane	200 µl	290 µl	Magnethelmed Streptavidin Magnetic Beads, mis on ühendatud transposoomidega puhverdatud vesilahuses, mis sisaldab glütserooli, EDTA-d, ditiotreitooli, soola ja pesuainet.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Läbipaistev	1,8 ml	1,8 ml	Puhverdatud vesilahus.

### illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, hoida temperatuuril -25 °C kuni -15 °C

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht		Korgi värv	Täidetud maht		Toimeained
	16 proovi (nr 20050022)	96 proovi (nr 20050027)		16 proovi	96 proovi	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Läbipaistev	290 µl	290 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab magneesiumsoola ja dimetüülformamiidi.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Läbipaistev	200 µl	610 µl	DNA polümeraas ja dNTP-d puhverdatud vesilahuses.

### illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 proovi), hoida temperatuuril 2 °C kuni 8 °C

16 prooviga komplektide puhul on järgmised reaktiivid lisatud komplekti illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloogi nr 20050023). 96 prooviga komplektide puhul on reaktiivid lisatud komplekti illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloogi nr 20050028).

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht	Korgi värv	Täidetud maht	Toimeained
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Läbipaistev	1,2 ml	Magnethelmed Streptavidin Magnetic Beads puhverdatud vesilahuses, mis sisaldab formamiidi, pesuainet ja soola.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Läbipaistev	1,8 ml	Puhverdatud vesilahus.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Läbipaistev	200 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab pesuainet ja soola.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Läbipaistev	200 µl	Puhverdatud vesilahus.

## illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 proovi), hoida temperatuuril 2 °C kuni 8 °C

96 prooviga komplektide puhul on komplekti illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloogi nr 20050028) lisatud järgmised reaktiivid. 16 prooviga komplektide puhul on reaktiivid lisatud komplekti illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloogi nr 20050023).

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht	Korgi värv	Täidetud maht	Toimeained
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Läbipaistev	1,2 ml	Magnethelmed Streptavidin Magnetic Beads puhverdatud vesilahuses, mis sisaldab formamiidi, pesuainet ja soola.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Läbipaistev	1,8 ml	Puhverdatud vesilahus.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Läbipaistev	200 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab pesuainet ja soola.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Läbipaistev	200 µl	Puhverdatud vesilahus.



## illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, hoida temperatuuril -25 °C kuni -15 °C

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht		Korgi värv	Täidetud maht	Toimeained
	16 proovi (nr 20050024)	96 proovi (nr 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Läbipaistev	580 µl	Pesuaine lahus vees.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Oranž	4,1 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli ja pesuainet.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Läbipaistev	320 µl	PCR-i praimerite (oligonukleotiidide) segu
2N NaOH (HP3)	1	1	Läbipaistev	200 µl	2N naatriumhüdrosiidi (NaOH) lahus.
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Sinine	480 µl	Puhverdatud vesilahus koos Cot-1 DNA, väljatõrjuva aine ja formamiidiga
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Läbipaistev	200 µl	DNA polümeraas ja dNTP-d puhverdatud vesilahuses.

## illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, hoida temperatuuril -25 °C kuni -15 °C

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril. Indeksadapteri järjestusi vt [Lisa: illumina UD-indeksite adapterijärjestused leheküljel 63](#).

Komponent	Kogus
illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 indeksit), nr 20050038	1
illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 indeksit), nr 20050039	1

## Reaktiivid, mis ei kuulu komplekti

### Vajalikud, kuid komplekti mittekuuluvad reaktiivid

- DNA ekstraheerimise ja puhastamise reaktiivid
- DNA kvantifitseerimise reaktiivid
- Etanool (molekulaarbioloogia puhul 200 proof)
- Nukleasivaba vesi
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 1N NaOH lahus, molekulaarbioloogia klass
- Kui kasutate sekveneerimissüsteemi NextSeq 550Dx:
  - 200 mM Tris, pH 7,0 (saab lahjendada 1 M Tris-HCL-ist, pH 7,0)
  - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) (kataloogi nr 20028871)
- Kui kasutate sekveneerimissüsteemi MiSeqDx:
  - MiSeqDx Reagent Kit v3 (kataloogi nr 20037124)
- Kui kasutate sekveneerimissüsteemi NovaSeq 6000Dx:
  - 400 mM Tris, pH 8,0 (saab lahjendada 1 M Tris-HCL-ist, pH 8,0)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (kataloog nr 20046931)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (kataloog nr 20046933)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (kataloog nr 20062292)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (kataloog nr 20062293)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube (kataloog nr 20062290)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (kataloog nr 20062291)

### Rikastussondi paneeli nõuded

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid ühilduvad nii Illumina kui ka kolmanda poole rikastamise DNA oligonukleotiidipaneelidega. Kui kasutate kolmanda poole biotinüülit DNA-sonde (fikseeritud või kohandatud paneele), veenduge, et need vastaksid nõutavatele spetsifikatsioonidele.

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on optimeeritud ja valideeritud järgmiste kolmanda poole paneelidespetsifikatsioonide abil. Spetsifikatsioonidele mittevastavate kolmanda poole paneelide kasutamise korral ei garanteerita võrreldavat jõudlust.

- Sondi pikkus 80 bp või 120 bp
- 500 kuni 675 000 sondi
- Ühe- või kaheaahelaline DNA
- Sondi kogusisend  $\geq 3$  pmol 1-kordseks kuni 12-kordseks rikastamiseks.

## Säilitamine ja käsitlemine

- Toatemperatuur tähendab temperatuurivahemikku 15 °C kuni 30 °C.
- Reaktiivid on stabiilsed kuni komplekti etiketidel märgitud aegumiskuupäevani, kui neid hoiustatakse ettenähtud viisil. Hoiustamistemperatuuride kohta vt [Komplekti kuuluvad reaktiivid leheküljel 5](#).
- Külmutatud reaktiivid on stabiilsed maksimaalselt nelja külmutamis-sulatustsükli jooksul, mis toimuvad enne määratud aegumiskuupäeva.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx protseduur sisaldab järgmisi ohutuid peatumispunkte:
  - Pärast [Märgistatud DNA amplifitseerimine leheküljel 28](#) on amplifitseeritud teegid stabiilsed kuni 30 päeva, kui neid hoitakse temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.
  - Pärast [Teekide puhastamine leheküljel 31](#) on puhastatud amplifitseeritud teegid stabiilsed kuni 30 päeva, kui neid hoitakse temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.
  - Pärast [Eelrikastatud teekide ühendamine leheküljel 33](#) on kogutud teegid stabiilsed kuni 30 päeva, kui neid hoitakse temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.
  - Pärast [Rikastatud teekide amplifitseerimine leheküljel 44](#) võib rikastatud, amplifitseeritud teekide plaat jääda termotsüklerisse kuni 24 tunniks. Teise võimalusena võib plaati hoida temperatuuril 2 °C kuni 8 °C kuni 48 tundi.
  - Lõplikult puhastatud rikastatud teegid on temperatuuril –25 °C kuni –15 °C säilitamise korral stabiilsed kuni 7 päeva.
- Kui mõni komplekti Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pakend või sisu on kahjustatud või rikitud, võtke ühendust Illumina klienditeenindusega.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) võib moodustada nähtavaid sademeid või kristalle. Sademe täheldamise korral kuumutage 37 °C juures 10 minutit ja segage seejärel keerisseguril, kuni sade lahustub.
- Hybridization Oligos (HYB) ja Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) tuleb eelsoojendada samale temperatuurile nagu proovituubi ja sondi paneeli puhul kohaldatav hübriidisatsiooni säilitustemperatuur. Lisateavet NHB2 ja EEW käsitlemise kohta leiate jaotisest [Protseduuriga seotud märkused leheküljel 16](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) ja HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) võivad moodustada kristalle ja tekitada hägusust. Kui täheldate kristalle ja hägusust, segage keerisseguril või pipettige segamiseks üles-alla, kuni lahus on selge. Enne pipettimist soojendage kindlasti NHB2.
- Cleanup Beads (CB) käsitlemise käigus kasutage järgmisi parimaid tavasid.
  - Ärge kunagi külmutage helmeid.

- Segage helmeid vahetult enne kasutamist keerisseguril, kuni need on resuspendeerunud ja värvus on homogeenne.
- Enrichment BLT Small (eBLTS) käsitlemise käigus kasutage järgmisi parimaid tavasid.
  - Hoidke eBLTS-katsutit püstises asendis, nii et helmed oleksid alati puhvrise sukeldatud.
  - Segage eBLTS põhjalikult keerisseguril, kuni helmed on resuspendeerunud. Helmeste uuesti sadenemise vältimiseks ei ole tsentrifuugimine enne pipettimist soovitatav.
  - Kui helmed on kleepunud 96-süvendilise plaadi küljele või ülaosale, tsentrifuugige 280 × g juures 3 sekundit ja pipettige seejärel resuspendeerimiseks.
- Indeksiaadapteri plaatide käsitlemise korral kasutage järgmisi parimaid tavasid.
  - Ärge lisage indeksiaadapteri plaadile proove.
  - Iga indeksiplaadi süvend on ühekordseks kasutamiseks.

## Vajalikud, kuid komplekti mittekuuluvad seadmed ja materjalid

Veenduge enne protokolliga alustamist, et teil oleksid peale Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx olemas vajalikud seadmed ja materjalid.

### Seadmed

Enne protokolliga alustamist veenduge, et teil oleksid olemas vajalikud seadmed.

Protokoll on loetletud spetsifikatsioonidega toodete abil optimeeritud ja valideeritud. Seadmete kasutamise korral väljaspool spetsifikatsioone ei garanteerita võrreldavat jõudlust.

Mõned tooted on vajalikud ainult konkreetsete töövoogude jaoks. Need tooted on esitatud eraldi tabelites.

- Termotsükler järgmiste spetsifikatsioonidega.
  - Soojendusega kaas
  - Minimaalne temperatuuri reguleerimise vahemik 10 °C kuni 98 °C
  - Minimaalne temperatuuri täpsus ±0,25 °C
  - Maksimaalne reaktsioonimaht 100 µl
  - Ühildub täisäärikuga 96 süvendiga PCR-plaatidega
- Järgmiste spetsifikatsioonidega mikroproovi inkubaator
  - Ümbriseva õhu temperatuurivahemik +5,0 °C kuni 99,0 °C
  - Ühildub 96 süvendiga MIDI-plaatidega
- 96 süvendiga MIDI-plaatidega ühilduvad mikroproovi inkubaatori siseosad
- Kiire mikroplaadi raputi segamiskiirusega 200–3000 p/min

- Magnetalus, mis ühildub 96 süvendiga PCR-plaatidega
- Magnetalus, mis ühildub 96 süvendiga MIDI-plaatidega
- Fluoromeeter, mis ühildub teie kvantifitseerimismeetodiga
- DNA fragmentide analüsaator
- Täppispipetid
  - 10 µl ühe- ja mitmekanalilised pipetid
  - 20 µl ühe- ja mitmekanalilised pipetid
  - 200 µl ühe- ja mitmekanalilised pipetid
  - 1000 µl ühekanalilised pipetid
  - Täppispipetid tagavad reaktiivi ja proovi täpse doseerimise. Ühe- või mitmekanalilisi pipette saab kasutada, kui neid kalibreeritakse regulaarselt ja nende täpsus on kuni 5% märgitud mahust.
- Mikroplaadi tsentrifuug
- Mikrotsentrifuug
- Üks järgmistest Illumina sekveneerimissüsteemidest:
  - Seade MiSeqDx, kataloogi nr DX-410-1001
  - Seade NextSeq 550Dx, kataloogi nr 20005715 koos valikulise Illumina DRAGEN-serveriga seadmele NextSeq 550Dx, kataloogi nr 20086130
  - Seade NovaSeq 6000Dx, kataloogi nr 20068232
- [Valikuline] Vaakumkontsentraator
- [FFPE] Reaalajas PCR-i tuvastamise süsteem

## Materjalid

Enne protokolliga alustamist veenduge, et teil oleksid olemas vajalikud materjalid.

Mõned tooted on vajalikud ainult konkreetsete töövoogude jaoks. Need tooted on esitatud eraldi tabelites.

Protokoll on loetletud toodete abil optimeeritud ja valideeritud. Alternatiivsete materjalide kasutamise korral ei ole võrreldav jõudlus garanteeritud.

- Filtriga pipetiotsakud
- Koonilised tsentrifuugi katsutid, 15 ml või 50 ml
- 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutid
- RNAasi-/DNAasivabad mitmekanalilised reaktiivimahutid, ühekordselt kasutatavad
- RNAasi-/DNAasivabad 8 katsutiga ribad ja korgid
- Seroloogilised pipetid
- 96 süvendiga polüpropüleenist sügavate süvenditega hoiuplaat, 0,8 ml (MIDI-plaat)
- Hard-Shell 96 süvendiga täisäärikuga PCR-plaadid

- [FFPE]qPCR-i seadmega ühilduvad qPCR-plaadid
- Adhesiivtihendid 96 süvendiga plaatidele järgmiste spetsifikatsioonidega:
  - Kooritavad, läbipaistev polüester
  - Sobivad äärikuga PCR-plaatidele
  - Tugev adhesiiv, mis talub mitut temperatuurimuutust vahemikus –40 °C kuni 110 °C.
  - DNAasi-/RNAasivaba
- Plastist kulumaterjalid, mis ühilduvad valitud kvantifitseerimismeetodiga
- Fluoromeetiline dsDNA kvantifitseerimiskomplekt, mis ühildub valitud kvantifitseerimissüsteemiga.
  - Eelrikastatud amplifitseeritud teekide kvantifitseerimiseks võib kasutada laiaulatuslikku kvantifitseerimiskomplekti.
  - Rikastatud teekide kvantifitseerimise puhul oleneb kvantifitseerimiskomplekti ulatus kasutatavast sondipaneelist.
- Fragmentide analüüsi komplekt teegi kvalifitseerimiseks valitud kvalifikatsioonisüsteemiga.
  - Eelrikastatud amplifitseeritud teekide kvalifitseerimiseks võib kasutada laiaulatuslikku komplekti.
  - Rikastatud teekide kvalifitseerimise puhul oleneb kvalifitseerimiskomplekti ulatus kasutatavast sondipaneelist.
- [Valikuline] Komplekt DNA ekstraheerimiseks inimese rakkudest ja koest. Võite kasutada mis tahes valideeritud ekstraheerimismeetodit.

## Proovimaterjalide kogumine, transportimine ja säilitamine



### ETTEVAATUST

Käsitsege kõiki proovimaterjale potentsiaalselt nakkusohtlikena.

- See analüüs ühildub inimese rakkudest ja kudedest pärineva genoomse DNA-ga.
- Kaubanduslikult saadaoleva puhastatud gDNA puhul veenduge, et proove oleks transporditud õigetes tingimustes ja säilitatud vastavalt tootja juhistele. Järgige gDNA säilitamise ja külmutamise-sulatamise tsüklite parimaid tavasid.
- Täisvere sisendi korral järgige valitud DNA ekstraheerimismeetodi puhul kehtivaid vere kogumise, transportimise ja säilitamise nõudeid. Kasutada võib mis tahes valideeritud ekstraheerimismeetodit. Täisvere transport peab vastama riigi, föderaal-, osariigi ja kohalikele eeskirjadele etioloogiliste ainete transportimise kohta.
- DNA ekstraheerimiseks FFPE koest võib kasutada mis tahes valideeritud ekstraheerimismeetodit. Järgige valitud ekstraheerimismeetodi kohta kehtivaid juhiseid ja soovitusi järgmiste tavade kindlaksmääramiseks:

- Formaliinis fikseerimise ja parafiini sisestamise meetod kudedele, et tagada ekstraheeritud DNA parim kvaliteet.
- FFPE proovide säilitamine.
- Lähtematerjali nõuded, näiteks FFPE lõikude arv ja paksus. Enamik puhastusmeetodeid soovitab kasutada värskelt lõigatud lõike.

## Hoiatused ja ettevaatusabinõud

- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid sisaldavad potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Kandke kokkupuuteriskile vastavat kaitsevarustust, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit. Käsitsege kasutatud reaktiive keemiliste jäätmetena ja utiliseerige need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel. Keskkonna-, tervise- ja ohutusosalast lisateavet vaadake ohutuskaardilt (SDS) veebilehel [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- Teatage kohe kõigist selle tootega seotud tõsistest juhtumitest ettevõttele Illumina ning kasutaja ja patsiendi osariigi pädevale asutusele.
- Käsitsege kõiki vereproove inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV), inimese B-hepatiidi viiruse (HBV) või muude verega edasikanduvate patogeenide suhtes nakkusohulina (universaalsed ettevaatusabinõud).
- Järgige labori ettevaatusabinõusid. Ärge pipeteerige suuga. Ärge sööge, jooge ega suitsetage töökeskkonnas. Proovide ja komplekti reagentide käsitsemisel kandke ühekordseid kindaid ja laborikitleid. Pärast proovide ja komplekti reagentide käsitsemist peske käed põhjalikult puhtaks.
- Proovi või reaktiivi lagunemise vältimiseks veenduge enne protokolliga käivitamist, et kõik puhastamise käigus tekkivad naatriumhüperkloriti aurud oleksid täielikult hajunud.
- Proovide saastumine teiste PCR-produktide/amplikonidega võib põhjustada ebatäpseid ja ebausaldusväärseid tulemusi. Saastumise vältimiseks kasutage järgmisi parimaid tavasid.
  - Kasutage õigeid laboritavasid ja laborihügieeni.
  - Viige töövoog etapid läbi selleks ette nähtud amplifitseerimiseelsetes või -järgsetes piirkondades.
  - Enne teekide puhastamist hoidke kasutatud reaktiive amplifitseerimiseelsetes piirkondades.
  - Eraldage amplifitseerimiseelsed reaktiivid amplifitseerimisjärgsetest reaktiividest.
  - Veenduge, et amplifitseerimiseelsetes ja -järgsetes piirkondades oleks olemas vajalik varustus (nt pipetid, pipeti otsakud, keerissegisti ja tsentrifuug).
- Vältige ristsaastumist. Kasutage iga proovi jaoks ja iga reaktiivi väljutamise järel uusi pipetiotsakuid. Filtriga otsakute kasutamine vähendab amplikoni ülekandumise ja proovidevahelise ristsaastumise ohtu.
  - Proovide või reaktiivide põhisegude lisamise või ülekandmise korral vahetage kõigi proovide vahel otsakuid.
  - Mitmekanalilise pipetiga indeksadapterite lisamise korral vahetage otsakuid kõigi ridade või veergude vahel. Kui kasutate ühe kanaliga pipetti, vahetage kõigi proovide vahel otsakuid.

- Eemaldage kasutamata indeksiaadapteri plaadid tööalast.
- Kasutage etanooliga pesemiseks järgmisi parimaid tavasid:
  - Valmistage alati ette värske 80% etanool. Etanool võib absorbeerida õhust vett ja seeläbi tulemusi mõjutada.
  - Veenduge, et kogu etanool oleks pesemisetappide käigus süvendite põhjast eemaldatud. Etanoolijääk võib tulemusi mõjutada.
  - Täieliku aurustumise tagamiseks järgige magnetluse etappide jaoks ettenähtud kuivamisaega. Etanooli jääk võib mõjutada järgmiste reaktsioonide toimimist.
- Valmistage alati enne kasutamist põhiseadused ja ärge kunagi säilitage kombineeritud töölahuseid.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx toimivus ei ole tagatud, kui ei järgita pakendi infolehes kirjeldatud protseduure.
- Ärge kasutage ühtki komplekti osa pärast katsuti etiketil märgitud aegumiskuupäeva.
- Ärge kasutage analüüsikomponente teistest Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplektidest. Komplektid on märgitud komplekti etiketil.

## Protseduuriga seotud märkused

### DNA sisendi soovitused

Komplekti Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx protokoll ühildub kvaliteetsete kaheaheelise genoomse DNA (gDNA) sisenditega 50–1000 ng.

Veenduge, et esialgne gDNA proov ei sisaldaks > 1 mM EDTA-d ega orgaanilisi saasteaineid, nagu fenool ja etanool. Need ained võivad segada märgistamisreaktsiooni ja põhjustada analüüsi ebaõnnestumise.

#### gDNA sisend $\geq$ 50 ng

gDNA sisendite puhul vahemikus 50–1000 ng ei ole esialgse gDNA proovi kvantifitseerimine ja normaliseerimine vajalik.

#### gDNA sisend < 50 ng

Kasutada saab järgmiste kohandustega 10–50 ng DNA sisendeid.

- Kui kasutate 10–49 ng gDNA sisendit, on soovitatav esialgset gDNA proovi kvantifitseerida, et määrata pärast märgistamist vajalike PCR-tsüklite arv. Kasutage kaheaheelise gDNA sisendi kvantifitseerimiseks fluoromeetrilist meetodit. Vältige meetodeid, mis mõõdavad kogu nukleiinhapet, nagu NanoDrop või muud UV-kiirguse neeldumise meetodid.
- See protokoll ei normaliseeri eelrikastatud teegi lõplikku saagist 10–49 ng gDNA-lt ja seetõttu on tarvis teke enne ja pärast rikastamist kvantifitseerida ning normaliseerida.



- Komplekti Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on iseloomustatud ja kontrollitud 50–1000 ng DNA sisendite jaoks. Toote samaväärset jõudlust ei saa garanteerida gDNA sisendite puhul, mille suurus on < 50 ng.

## Vere sisendi soovitus

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ühildub perifeersest täisverest ekstraheeritud gDNA-ga. Kasutada võib mis tahes valideeritud ekstraheerimismeetodit. Täisverest gDNA ekstraheerimisel ei ole sisend-DNA esialgset kvantifitseerimist vaja ja Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx annab normaliseeritud eelrikastatud teegi saagiseid.

Järgmised tegurid võivad ebasoodsalt mõjutada täisvereproovidest saadud DNA kogust ja seega ka teegi normaliseerumist.

- Vereproovi vanus
- Säilitustingimused
- Valgevereliblede arvu mõjutavad haigusseisundid

## FFPE koeproovi sisendi soovitus

Edukaks teegi ettevalmistamiseks sobiva sisendi määramiseks kasutage järgmisi FFPE DNA kvaliteedikriteeriume.

- FFPE proovide puhul, mille  $\Delta Cq$  väärtus on  $\leq 5$ , on soovitatav DNA sisend 50–1000 ng.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ei ole soovitatav kasutada halva kvaliteediga FFPE proovide puhul, mille  $\Delta Cq > 5$ . Võimalik on kasutada proove, mille  $\Delta Cq > 5$ , kuid see võib suurendada teegi ettevalmistamise ebaõnnestumise tõenäosust või vähendada analüüsi jõudlust.

### FFPE ekstraheerimine

Kasutage nukleiinhappe eraldamise meetodit, mis annab kõrge saagikuse, minimeerib proovi kulu ja säilitab proovi terviklikkuse. Võite kasutada FFPE proovidest DNA ekstraheerimiseks mis tahes valideeritud meetodit. FFPE koest gDNA ekstraheerimisel on nõutav DNA sisendi esialgne kvantifitseerimine ja Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ei anna normaliseeritud eelrikastatud teegi saagiseid.

### FFPE DNA kvaliteedi määramine

FFPE koest eraldatud gDNA tuleb enne kasutamist kvalifitseerida. Optimaalse jõudluse tagamiseks hinnake DNA proovi kvaliteeti, kasutades FFPE proovidest ekstraheeritud DNA kvaliteedi määramiseks valideeritud ekstraheerimismeetodit. Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx protokoll ühildub FFPE DNA proovidega, mille  $\Delta Cq$  väärtus on  $\leq 5$ . Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ei ole soovitatav kasutada halva kvaliteediga FFPE proovide puhul, mille  $\Delta Cq > 5$ . Võimalik on kasutada proove, mille  $\Delta Cq > 5$ , kuid see võib suurendada teegi ettevalmistamise ebaõnnestumise tõenäosust või vähendada analüüsi toimivust.

## [Valikuline] FFPE võrdlusproovid

Kasutage protokollil läbiviimisel positiivse kontrollina iseloomustatud võrdlusmaterjale, nagu Horizon HD799 (DNA). Võrdlusproovidena võib kasutada ka kvalifitseeritud FFPE materjale, mis on pärit rakuliinist saadud ksenosiirikutest. Enne kasutamist kasutage võrdlusmaterjalide kvantifitseerimiseks fluoromeetrilist meetodit.

**MÄRKUS** Positiivse kontrolli võrdlusproovi käivitamine või matriitsi kontrolli puudumine kulutab reaktiive ja vähendab töödeldavate tundmatute proovide koguarvu.

## Proovi sisestamise soovitused

Järgmises tabelis on kokkuvõtlikud proovisisendi soovitused Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx jaoks.

tabel 1 Proovi sisestamise soovitused

Proovisisendi tüüp	Proovisisendi kogus	Nõutav sisend-DNA kvantifitseerimine	Nõutav DNA-sisendi kvaliteet	Normaliseeritud eelrikastatud teegi saagis
gDNA	10–49 ng	Jah	260/280 määr 1,8–2,0	Ei
gDNA	50–1000 ng	Ei	260/280 määr 1,8–2,0	Jah
Verest ekstraheeritud gDNA	50–1000 ng	Ei	260/280 määr 1,8–2,0	Jah
FFPE-st ekstraheeritud gDNA	50–1000 ng	Jah	$\Delta Cq$ väärtus $\leq 5$	Ei

eBLTS PCR-programmi soovitatavad PCR-tsüklid on kohandatud proovi sisendkontsentratsiooni ja kvaliteedi alusel. Lisateavet vt jaotisest [Märgistatud DNA amplifitseerimine leheküljel 28](#).

## Näpunäiteid ja tehnikaid

### Ristsaastumise vältimine

- Proovide või reaktiivide põhisegude lisamise või ülekandmise korral vahetage *kõigi proovide* vahel otsakuid.
- Mitmekanalilise pipetiga indeksadapterite lisamise korral vahetage otsakuid *kõigi ridade* või *veergude* vahel. Kui kasutate ühe kanaliga pipetti, vahetage *kõigi proovide* vahel otsakuid.

## Plaadi sulgemine

- Katke 96 süvendiga plaat alati uue kleepuva tihendiga, kasutades plaadi katmiseks kummirullikut, enne kui järgite järgmisi protokollide etappe:
  - Raputamise etapid
  - Inkubatsiooni etapid. Kui plaati ei suleta ettenähtud viisil, võib see põhjustada inkubeerimise ajal aurustumise.
  - Tsentrifugimise etapid
  - Hübridisatsiooni etapid
- Veenduge, et servad ja süvendid oleksid tihedalt suletud, et vähendada ristsaastumise ning aurustumise ohtu.
  - Kui märkate tihendil või plaadi süvendite seintel vedelikku või kondensaati, tsentrifugeerige vajaduse korral enne tihendi eemaldamist.
- Asetage plaat tasasele pinnale, seejärel eemaldage tihend aeglaselt.

## Käitlemine Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Hoidke eBLTS varulahuse katsutit külmikus püstises asendis, nii et helmed oleksid alati puhvrises sukeldatud.
- Segage eBLTS varulahuse katsutit vahetult enne kasutamist põhjalikult keerisseguri abil, kuni helmed on resuspendeerunud. Helmeste uuesti sadenemise vältimiseks ei ole tsentrifugimine enne pipettimist soovitatav.
- Kui helmed on kleepunud 96-süvendilise plaadi küljele või ülaosale, tsentrifugeerige 280 × g juures 3 sekundit ja pipettige seejärel resuspendeerimiseks.
- Pestes eBLTS:
  - Kasutage plaadi jaoks sobivat magnetlust.
  - Hoidke plaati magnetlusel, kuni see tuleb juhiste kohaselt eemaldada.
  - Kui helmed aspireeritakse pipetiotsakutesse, väljutage need tagasi magnetalusel olevale plaadile ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).



## Kasutusjuhised

Selles peatükis kirjeldatakse protokollu Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

- Toodete ja katseparameetrite ühilduvuse tagamiseks vaadake üle planeeritud täielik sekveneerimise töövoog alates proovist kuni analüüsini.
- Enne jätkamist kontrollige komplekti sisu ja veenduge, et teil oleksid vajalikud komponendid, seadmed ning materjalid.
  - Kolmanda poole biotinüülitud sondid peavad vastama konkreetsetele nõuetele. Vt [Rikastussondi paneeli nõuded leheküljel 10](#) veendumaks, et teie kolmanda osapoole sondid vastavad nõuetele.
- Järgige protokolle näidatud järjekorras, kasutades määratud mahte ja inkubatsiooni parameetreid.
- Kui protokollis pole peatumiskohta määratud, jätkake kohe järgmise etapiga.
- Põhisegu valmistamisel arvestatakse pakutavate mahtude hulka ülejääk.
- Kasutage kindlasti oma plaaditüübile sobivat magnetlust.

## Ühendamiseks ettevalmistamine

See etapp on vajalik rikastatud teekide eduka sekveneerimise tagamiseks. Teekide ühendamine võib toimuda enne rikastamist ja enne sekveneerimist.

**Enne rikastamist** – üksikud indekseeritud amplifitseeritud teegid ühendatakse rikastamiseks valitud sondipaneeliga. See loob rikastatud teekide multipleksitud kogumi. FFPE proovisendi puhul on töötlemist testitud ja see on soovitatav ainult 1-kordsete rikastamisreaktsioonide jaoks. Kvaliteetse gDNA jaoks on testitud 12-kordseid teeke, kuid võimalikud on ka 2- kuni 11-kordsed teegid.

**Enne sekveneerimist** – 1-kordsed rikastatud teegid ja/või multipleksiga rikastatud teegid ühendatakse enne sekveneerimist. Nende rikastatud teekide arv, mida saab sekveneerida, sõltub sekveneerimissüsteemi iga proovi sihtlugemissügavusest.

## Unikaalne topeltindekseerimine

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kasutab unikaalseid topeltindekseid.

- Topeltindeksiga teegid lisavad indeksi 1 (i7) ja indeksi 2 (i5) järjestused, et luua unikaalselt märgistatud teeke.
- UD-indeksitel on i7 ja i5 indeksi lugemi jaoks erinevad, mitteseotud indeksijärjestused. Indeksid on 10 aluse pikkused.

Erinevate järjestustega indeksadapterite valimine kogutud teekide jaoks optimeerib eduka järjestuse ja andmete analüüsi jaoks värvitasakaalu. Kordsuse kogumid, mis on  $\geq 10$ -kordsed, on oma olemuselt värvitasakaaluga, nii et saate kasutada mis tahes indeksadapteri kombinatsiooni. Sekveneerimise käituse ajal pakub DNA Generate FASTQ DxLocal Run Manager moodul valikuid värvitasakaaluga indeksikombinatsioonide jaoks ja teavitab teid, kui valitud indeksikombinatsioonid ei ole piisavalt mitmekesised.

Teavet Illumina UD indeksiaadapteri järjestuste ja plaatide paigutuste kohta vt [Lisa: Illumina UD-indeksite adapterijärjestused leheküljel 63](#)

## Toetatud rikastamise kordsused

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid on konfigureeritud ja testitud 1- ja 12-kordse rikastamise kordsusega. Kuigi on võimalikud ka muud rikastamise kordsused, nõuavad mõned kordsused täiendavaid rikastamiseelse teegi ettevalmistamise ja rikastussondi paneeli reaktiive.

Mittestandardse rikastamise kordsuse jaoks sobiva rikastusaaigse saamine võib nõuda täiendavat optimeerimist. Optimaalsed tulemused pole garanteeritud.

- **Rikastamise kordsus** – eelrikastatud teekide arv (1–12), mis on ühendatud ühes rikastamisreaktsioonis rikastussondi paneelidega hübriidiseerimiseks. Näiteks 12 eelrikastatud teegi ühendamine loob 12-kordse rikastuskogumi.
- **Rikastusreaktsioon** – ainulaadsete rikastusreaktsiooni preparaatide arv olenemata reaktsiooni kohta kogutud eelrikastatud teekide arvust. Näiteks võib ühe rikastamisreaktsiooniga valmistada 1-kordse või 12-kordse rikastuskogumi.

Järelrikastatud teekide koguarvu arvutamiseks korrutage rikastamise kordsus reaktsiooni kohta rikastamisreaktsioonide arvuga. Näiteks 12-kordse rikastuskogumi üks rikastamisreaktsioon annab 12 järelrikastatud teeki hõlmava kogumi.

Eelrikastatud teekide kogumise korral toetavad komplekti Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid järgmisi rikastamisreaktsioone ja kordsust.

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Reaktiivid	Rikastamise reaktsioonid	Rikastamise kordsus
16 prooviga komplekt	16 reaktsiooni	1-kordne
96 prooviga komplekt	8 reaktsiooni	12-kordne

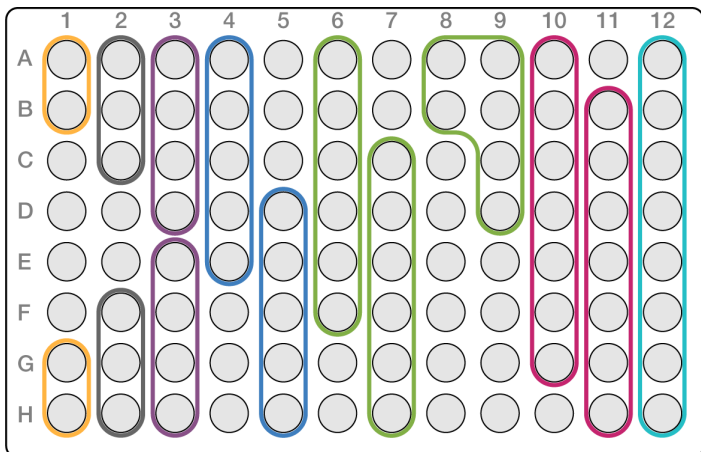
## Kahe- kuni kaheksa-kordse kogumise strateegiad

Järgmises tabelis on toodud indeksiaadapterid (süvendid), mida saab kombineerida 2–8-kordses kogumis, samas kui värvikoodiga joonis illustreerib iga kombinatsiooni.

Koguge veeru üla- või alaosast mis tahes kordsus, mis on  $\geq 2$ . Äрге koguge realt.

Kordsus	Kombinatsioonid	Värv joonisel
2	Esimesed või viimased kaks süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A ja B</li> <li>• G ja H</li> </ul> Ridu C–F ei kasutata.	Oranž

Kordsus	Kombinatsioonid	Värv joonisel
3	Esimesed või viimased kolm süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–C</li> <li>• F–H</li> </ul> Ridu D ja E ei kasutata.	Hall
4	Esimesed või viimased neli süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–D</li> <li>• E–H</li> </ul>	Lilla
5	Esimesed või viimased viis süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–E</li> <li>• D–H</li> </ul>	Sinine
6	[1. valik] Esimesed või viimased kuus süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–F</li> <li>• C–H</li> </ul> [2. valik] Esimesed kaks süvendit (A ja B) või kaks viimast süvendit (G ja H) ühes veerus ning mis tahes neli süvendit külgnevas veerus.	Roheline
7	Esimesed või viimased seitse süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–G</li> <li>• B–H</li> </ul>	Roosa
8	Kogu veerg.	Sinakasroheline

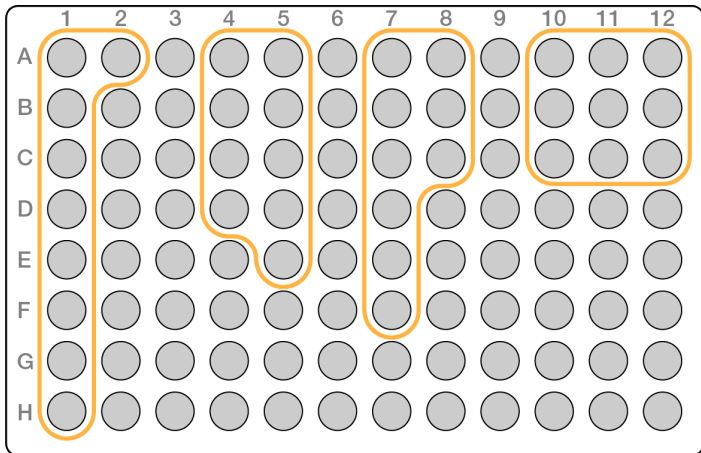


## Üheksakordse kogumise strateegiad

Kasutage indeksiaptereid mis tahes süvenditest, mis optimeerivad sekveneerimiskäituse korral värvitasakaalu, näiteks:

- A1–H1 ja A2
- A4–D4 ja A5–E5
- A7–F7 ja A8–C8
- A10–C10, A11–C11 ja A12–C12

Järgmisel joonisel on toodud kõik neli näidet.



## Märgistatud genoomne DNA

Selles etapis kasutatakse DNA märgistamiseks toodet Enrichment BLT Small (eBLTS), mis fragmenteerib ja märgistab DNA adapterijärjestustega.

### Kulutarvikud

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (kollane kork)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nukleasivaba vesi
- 96 süvendiga PCR-plaat
- Kleepuv tihend
- 1,7 ml mikrotsentrifuugi katsutid
- 8 katsutiga riba
- Pipetiotsakud
  - 200 µl mitmekanalilised pipetid



**ETTEVAATUST**

See reaktiivide komplekt sisaldab potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Kandke kokkupuuteriskile vastavat kaitsevarustust, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit. Käsitsege kasutatud reaktiive keemiliste jäätmetena ja utiliseerige need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel. Keskkonna-, tervise- ja ohutusalast lisateavet vaadake ohutuskaardilt (SDS) veebilehel [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

**Teave reaktiivide kohta**

- eBLTS tuleb hoida temperatuuril 2 °C kuni 8 °C. Ärge kasutage seda eBLTS, mida on hoitud temperatuuril alla 2 °C.
- Ärge tsentrifuugige eBLTS.

**Ettevalmistamine**

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
eBLTS (kollane kork)	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile. Kasutage vahetult enne kasutamist segamiseks keerissegurit. Ärge tsentrifuugige enne pipettimist.
TB1	-25 °C kuni -15 °C	Tooge toode toatemperatuurile. Kasutage segamiseks keerissegurit.

2. Segage keerisseguriga või pipettige DNA, seejärel tsentrifuugige lühidalt.
3. Salvestage termotsüklerisse järgmine TAG-programm.
  - Valige kaane eelsoojendus ja seadke see väärtusele 100 °C
  - Määrake reaktsiooni maht väärtusele 50 µl
  - 55 °C 5 minutit
  - Hoida temperatuuril 10 °C

## Protseduur

1. Lisage 2–30 µl DNA-d 96-süvendilise PCR-plaadi igasse süvendisse nii, et sisendkogus oleks 50–1000 ng. Kui DNA maht on < 30 µl, lisage nukleasivaba vett DNA-proovidele, et viia kogu maht 30 µl-ni.
2. Segage eBLTS põhjalikult keerisseguril, kuni helmed on täielikult resuspendeerunud.
3. Kombineerige järgmisi mahte katsutis märgistamise põhisegu valmistamiseks. Korrutage iga maht töödeldavate proovide arvuga.
  - eBLTS (11.5 µl)
  - TB1 (11.5 µl)Reaktiivi ülejääk sisaldub mahus.
4. Pipettige segamiseks põhjalikult märgistamise põhisegu.
5. Jagage märgistamise põhisegu maht võrdselt 8 katsutiga ribale.
6. Kasutades 200 µl mitmekanalilist pipetti, kandke 20 µl märgistamise põhisegu igasse proovi sisaldavasse PCR-plaadi süvendisse. Kasutage iga prooviveeru või -rea jaoks värskeid otsakuid.
7. Visake 8 katsutiga riba pärast märgistamise põhisegu väljastamist ära.
8. Pipettige väärtusele 40 µl määratud 200 µl multikanalilise pipeti abil segamiseks 10 korda. Kasutage iga prooviveeru jaoks värskeid otsakuid.

Teise võimalusena sulgege PCR-plaat ja kasutage plaadiraputit 1 minuti jooksul kiirusel 1600 pööret minutis.
9. Sulgege plaat ja asetage see eelprogrammeeritud termotsüklerisse ning käivitage TAG-programm.
10. Oodake, kuni TAG-programm on saavutanud hoidmistemperatuuri 10 °C, seejärel eemaldage plaat kohe.
11. Laske 96 süvendiga PCR plaadil 2 minutit toatemperatuuril seista ja liikuge seejärel järgmise etapini.

## Märgistamisjärgne puhastus

Selles etapis pestakse adapteriga märgistatud DNA-d eBLTS enne PCR-i amplifitseerimist.

### Kulutarvikud

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96-süvendiline PCR-plaadi magnetalus
- Kleepuv tihend
- 8 katsutiga riba
- Pipetiotsakud
  - 20 µl mitmekanalilised pipetid
  - 200 µl mitmekanalilised pipetid
- Valmistage ette hilisemaks protseduuriks:
  - EPM (Enhanced PCR Mix)

- Indeksiaadapteri plaat

## Teave reaktiivide kohta

- Kasutage kindlasti oma plaaditüübile sobivat magnetlust. MIDI-plaadi magnetluse kasutamine PCR-plaadi puhul võib takistada TWB2 kleepumist helmestele.
- Pipettige TWB2 aeglaselt, et minimeerida vahutamist vältimaks mahu valet aspiratsiooni ja mittetäielikku segamist.

## Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud:

Toode	Säilitamine	Juhised
EPM	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage 1 tunni jooksul jää peal. Segamiseks pöörake ümber ja kasutage seejärel lühidalt tsentrifuugi.
ST2	15 °C kuni 30 °C	Sademe täheldamise korral kuumutage 37 °C juures 10 minutit ja segage seejärel keerisseguril, kuni sade lahustub. Kasutage toatemperatuuril.
TWB2	15 °C kuni 30 °C	Kasutage toatemperatuuril.
Indeksiadapteri plaat	-25 °C kuni -15 °C	Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada.

## Protseduur

1. Lisage 10 µl ST2 igale märgistamisreaktsioonile. Kui kasutate mitmekanalilist pipetti, pipettige ST2 8 katsutiga ribale ja kandke seejärel sobivad kogused PCR-plaadile. Kasutage iga prooviveeru või -rea jaoks värsked otsakuid.
2. Kasutades 200 µl pipetti, mis on seatud 50 µl peale, pipettige helmeste resuspendeerimiseks aeglaselt igas süvendis 10 korda.  
Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1600 pööret minutis. Vajaduse korral korrake toimingut.
3. Sulgege plaat ja tsentrifuugige seejärel 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
4. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
5. Asetage plaat PCR-plaadi magnetlusele ja oodake, kuni vedelik on selge (3 minutit).
6. [≤ 48 proovi] Peske kolm korda järgmiselt.

- a. Eemaldage tasemele 60 µl seatud 200 µl mitmekanalilise pipeti abil kogu supernatant ja visake see ära, häirimata seejuures helmegraanulit.
  - b. Eemaldage plaat magnetaluselt.
  - c. Vahetult pärast seda lisage aeglaselt 100 µl TWB2 otse helmestele.
  - d. Pipettige aeglaselt, kuni helmed on täielikult resuspendeeritud. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage kiirusel 1600 pööret minutis 1 minuti jooksul.
  - e. Pritsimise korral tsentrifugeerige 280 × g juures 10 sekundit.
  - f. Asetage plaat PCR-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (3 minutit).  
Jätke plaat magnetalusel ja TWB2 süvenditesse, et vältida ülekuivamist kolmanda pesemise ajal.  
Pärast PCR-i põhiseгу valmistamist eemaldage supernatant ja visake see ära.
  - g. Eemaldage tasemele 100 µl seatud 200 µl mitmekanalilise pipeti abil kogu supernatant ja visake see ära.
  - h. Korrake etappe c–f kaks korda kokku kolme pesu jaoks.
7. [ $> 48$  proovi] Peske kolm korda järgmiselt.
- a. Järgige etappe b ja c 1- või 2-veerulise sammuga, kuni kõik veerud on ülekuivamise vältimiseks töödeldud.
  - b. Eemaldage tasemele 60 µl seatud 200 µl mitmekanalilise pipeti abil kogu supernatant ja visake see ära.
  - c. Eemaldage plaat magnetaluselt.
  - d. Vahetult pärast seda lisage aeglaselt 100 µl TWB2 otse helmestele.
  - e. Pipettige aeglaselt, kuni helmed on täielikult resuspendeeritud. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage kiirusel 1600 pööret minutis 1 minuti jooksul.
  - f. Pritsimise korral tsentrifugeerige 280 × g juures 10 sekundit.
  - g. Asetage plaat PCR-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (3 minutit).  
Jätke plaat magnetalusel ja TWB2 süvenditesse, et vältida ülekuivamist kolmanda pesemise ajal.  
Pärast PCR-i põhiseгу valmistamist eemaldage supernatant ja visake see ära.
  - h. Eemaldage tasemele 100 µl seatud 200 µl mitmekanalilise pipeti abil kogu supernatant ja visake see ära.
  - i. Eemaldage plaat magnetaluselt ja lisage aeglaselt 100 µl TWB2 otse helmestele.
  - j. Korrake etappe h ja i 1- või 2-veerulise sammuga, kuni kõik veerud on töödeldud.
  - k. Korrake etappe e–h kaks korda kokku kolme pesu jaoks.
8. Hoidke plaati magnetalusel kuni etapini 4 jaotises *Protseduur* peatükis *Märgistatud DNA amplifitseerimine*. TWB2 jääb süvenditesse, et vältida helmeste ülekuivamist.

## Märgistatud DNA amplifitseerimine

See etapp amplifitseerib märgistatud DNA-d, kasutades piiratud tsükliga PCR-programmi. PCR-etapp lisab indeksi 1 (i7) adapterid, indeksi 2 (i5) adapterid ja järjestused, mis on vajalikud klastri loomise sekveneerimiseks.

### Kulutarvikud

- EPM (Enhanced PCR Mix)

- Indeksiaadapteri plaat
- 96 süvendiga PCR-plaat
- Nukleaaasivaba vesi
- Kleepuv tihend
- 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutid
- Pipetiotsakud
  - 20 µl mitmekanalilised pipetid
  - 200 µl mitmekanalilised pipetid

## Teave reaktiivide kohta

- Indeksiaadapteri plaadid
  - Süvend võib sisaldada > 10 µl indeksiaadaptereid.
  - Ärge lisage indeksiaadapteri plaadile proove.
  - Iga indeksiplaadi süvend on ühekordseks kasutamiseks.

## Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
EPM	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage 4 °C juures või jää peal 1 tund. Segamiseks pöörake ümber ja kasutage seejärel lühidalt tsentrifuugi.
Indeksiaadapteri plaat	-25 °C kuni -15 °C	Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada.

2. Salvestage järgmine eBLTSPCR-programm termotsüklerisse, kasutades sobivat arvu PCR-tsükleid, mis on näidatud allolevas tabelis.

- Valige kaane eelsoojendus ja seadke see väärtusele 100 °C
- Määrake reaktsiooni maht väärtusele 50 µl
- 72 °C 3 minutit
- 98 °C 3 minutit
- X tsükli:
  - 98 °C 20 sekundit
  - 60 °C 30 sekundit
  - 72 °C 1 minut
- 72 °C 3 minutit
- Hoida temperatuuril 10 °C

Kogu tööaeg on 9 tsükli puhul ~38 minutit ja 12 tsükli puhul ~46 minutit.

Proovisisendi tüüp	PCR-tsüklike arv (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1000 ng gDNA	9
FFPE-st ekstraheeritud 50–1000 ng gDNA	12
Verest ekstraheeritud gDNA	9

## Protseduur

1. Kombineerige PCR-põhisegu valmistamiseks järgmised. Korrutage iga maht töödeldavate proovide arvuga.
  - EPM (23 µl)
  - Nukleaasivaba vesi (23 µl)
 Reaktiivi ülejääk sisaldub mahus.
2. Pipettige PCR-põhisegu segamiseks aeglaselt 10 korda ja tsentrifuugige seejärel lühidalt.
3. Kui plaat on magnetalusel, kasutage TWB2 eemaldamiseks ja äraviskamiseks 200 µl mitmekanalilist pipetti. Süvendi seintele jääv vaht ei avalda teegile negatiivset mõju.
4. Eemaldage plaat magnetaluselt.
5. Lisage kohe 40 µl PCR-põhisegu otse igas süvendis olevatele helmestele.
6. Pipettige kohe segamiseks, kuni helmed on täielikult resuspendeerunud. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1600 pööret minutis.

7. Sulgege prooviplaat ja tsentrifuugige 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
8. Tsentrifuugige indeksadapteri plaati 1 minuti jooksul 1000 × g juures.
9. Valmistage ette indeksadapteri plaat.
  - [< 96 proovi] Torgake iga süvendi jaoks uue pipetiotsakuga indeksadapteri plaadi fooliumtihendisse auk ainult vastavalt töödeldavate proovide arvule.
  - [96 proovi] Joondage uus pooläärikuga PCR-plaat indeksadapteri plaadi kohale ja vajutage fooliumtihendi läbitorkamiseks alla. Visake PCR-plaat, mida kasutati fooliumtihendi läbitorkamiseks, minema.
10. Kasutades uut pipetiotsikut, lisage 10 µl eelpaaristatud indeksadaptereid igasse süvendisse.
11. Pipettige 40 µl pipeti abil segamiseks 10 korda. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1600 pööret minutis.
12. Sulgege plaat ja tsentrifuugige seejärel 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
13. Asetage termotsüklerisse ja käivitage eBLTS PCR-programm.

#### OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral hoidke toodet kuni 30 päeva temperatuuril -25 °C kuni -15 °C.

## Teekide puhastamine

Selles etapis kasutatakse amplifitseeritud teekide puhastamiseks kahepoolset helmeste puhastamise protseduuri.

#### Kulutarvikud

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Värskest valmistatud 80% etanool (EtOH)
- 96 süvendiga 0,8 ml polüpropüleenist sügavate süvenditega hoiuplaat (MIDI-plaat)
- 96 süvendiga PCR-plaat
- MIDI-plaadi magnetalus
- PCR-plaadi magnetalus
- 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutid
- Nukleasivaba vesi

#### Teave reaktiivide kohta

- Cleanup Beads
  - Segage enne igat kasutuskorda keerisseguril.
  - Segage keerisseguril sageli, et helmed oleksid ühtlaselt jaotunud.

- Lahuse viskoossuse tõttu aspireerige ja doseerige aeglaselt.

## Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud:

Toode	Säilitamine	Juhised
CB	Toatemperatuur	Segage keerisseguril ja pöörake ümber, et segada, kuni vedeliku värvus on homogeenne.
RSB	2 °C kuni 8 °C	Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada. Kasutage segamiseks keerissegurit.

## Protseduur

1. Raputage 96 süvendiga PCR-plaati 1 minuti jooksul kiirusel 1800 pööret minutis ja tsentrifuugige seejärel lühidalt.
2. Asetage plaat PCR-plaadi magnetilusele ja oodake, kuni vedelik on selge (1 minut).
3. Keerutage CB 3 korda 10 sekundit ja pöörake seejärel mitu korda resuspendeerimiseks ümber.
4. Kvaliteetse gDNA puhul toimige järgmiselt.
  - a. Lisage 77 µl nukleaasivaba vett uue MIDI-plaadi igasse süvendisse.
  - b. Lisage 88 µl CB igasse uue MIDI-plaadi süvendisse.
  - c. Kandke 45 µl supernatanti igast PCR-plaadi süvendist vastavasse MIDI-plaadi süvendisse.
  - d. Visake PCR-plaat ära.
  - e. Pipettige igat süvendit 10 korda segamiseks. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 pööret minutis.
  - f. Sulgege plaat ja inkubeerige plaati toatemperatuuril 5 minutit.
  - g. Veenduge, et poleks õhumulle. Kui märkate mulle, tsentrifuugige vedelik põhja.
  - h. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetilusele ja oodake, kuni vedelik on selge (5 minutit).
  - i. Inkubeerimise ajal segage CB põhjalikult keerisseguril ja lisage seejärel 20 µl igasse süvendisse *uue* MIDI plaadil.
  - j. Kandke 200 µl supernatanti igast MIDI-plaadi süvendist vastavasse uue MIDI-plaadi süvendisse (mis sisaldab 20 µl CB).
  - k. Visake esimene MIDI-plaat ära.
  - l. Pipettige igat uue MIDI-plaadi 10 korda segamiseks. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 pööret minutis.
5. Ekstraheeritud FFPE puhul toimige järgmiselt.
  - a. Lisage 81 µl CB igasse uue MIDI-plaadi süvendisse.
  - b. Kandke 45 µl supernatanti igast PCR-plaadi süvendist vastavasse MIDI-plaadi süvendisse.
  - c. Visake PCR-plaat ära.



- d. Pipettige igat süvendit 10 korda segamiseks. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 pööret minutis.
6. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
7. Veenduge, et poleks õhumulle. Kui märkate mulle, tsentrifugeerige vedelik põhja.
8. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (5 minutit).
9. Helmeid häirimata eemaldage ja visake supernatant ära.
10. Peske kerakesi järgmiselt.
  - a. Kui plaat on magnetalusel, lisage ilma segamata 200 µl värsket 80% EtOH-d.
  - b. Inkubeerige 30 sekundit.
  - c. Eemaldage supernatant helmeid häirimata ja visake see ära.
11. Peske kerakesi **teist** korda.
12. Kuivatage plaati 5 minutit magnetalusel õhu käes.
13. Kasutage kuivatamisel 20 µl pipetti, et eemaldada ja visata järelejäänud EtOH ära.
14. Eemaldage plaat magnetaluselt.
15. Lisage 17 µl RSB-d helmestele.
16. Sulgege plaat ja raputage 2 minuti jooksul kiirusel 1800 pööret minutis.
17. Inkubeerige 2 minutit toatemperatuuril.
18. Veenduge, et poleks õhumulle. Kui märkate mulle, tsentrifugeerige vedelik põhja.
19. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
20. Kandke 15 µl supernatanti uuele 96 süvendiga PCR-plaadile.

#### OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral sulgege plaat ja hoidke toodet kuni 30 päeva temperatuuril -25 °C kuni -15 °C.

## Eelrikastatud teekide ühendamine

Selles etapis ühendatakse ainulaadsete indeksitega DNA teegid üheks kuni 12 teegist koosnevaks kogumiks.

## Kogumismeetodid

Saate ühendada mahu või massi järgi. Kasutage oma sisendi jaoks sobiva meetodi määramiseks järgmist tabelit.

tabel 2 Soovitatavad kogumismeetodid

Proovisisend	Kogumismeetod
10–49 ng gDNA	Mass
50–1000 ng gDNA	Maht
FFPE-st ekstraheeritud gDNA	Mass
Verest ekstraheeritud gDNA	Maht

- Ühekordne rikastamine ei nõua eelrikastatud teekide ühendamist. Siiski võib osutada vajalikuks RSB lisamine.
- Pärast teegi eelrikastatud kvantifitseerimist saab optimaalse indeksi tasakaalu saavutamiseks kõiki proovisisendite tüüpe massi järgi ühendada.
- Eraldi eksperimentaalsetes preparaatides loodud eelrikastatud teekide lõplik saagis võib varieeruda. Seetõttu on optimaalse indeksitasakaalu saavutamiseks soovitatav ühendada massi järgi.
- Kasutage 1-kordset rikastamist järgmistes olukordades.
  - 10–49 ng gDNA
  - FFPE-st ekstraheeritud 50–1000 ng gDNA
  - Madala väiksema alleeli sageduse tuvastamine somaatilise variandi kutsumiseks.

## Massi põhjal kogumine

Järgmistes olukordades kvantifitseerige teegid, et kasutada rikastamiseks DNA massi teegi kohta, mis on määratletud jaotises [Eelrikastatud teekide kogumine võrdses kontsentratsioonis leheküljel 35](#).

- 10–49 ng gDNA proovisisend
- FFPE proovisisendist ekstraheeritud 50–1000 ng gDNA
- Madala väiksema alleeli sageduse tuvastamine somaatilise variandi kutsumiseks
- Verest ekstraheeritud gDNA optimaalse indeksitasakaalu saavutamiseks

## Eelrikastatud teekide kvantifitseerimine

- Käitage 1 µl eelrikastatud teekidest, kasutades eelistatud fluorestsentsipõhist kvantifitseerimismeetodit, mis kasutab dsDNA interkalatsioonivärvi.
  - 50–1000 ng kvaliteetse gDNA puhul eeldage  $\geq 500$  ng eelrikastatud teegi saagisest.
  - FFPE-st ekstraheeritud 50–1000 ng gDNA puhul eeldage 500–6000 ng eelrikastatud teegi saagisest olenevalt esialgse proovi kvaliteedist.

**MÄRKUS** Erinevate lävedega kvantifitseerimismeetodite puhul kvalifitseerige selle töövoogu jaoks kvantifitseerimismeetod. Kontsentratsiooni tulemused võivad olenevalt kasutatud meetodist erineda.

## Eelrikastatud teekide kogumine võrdses kontsentratsioonis

Kasutage järgmist tabelit, et määrata rikastamiseks vajalik DNA mass teegi kohta vastavalt proovi tüübile ja rikastamise kordsusele. Soovitatust madalama eelrikastatud teegi saagise kasutamisel ei ole optimaalne rikastussaagis ja analüüsi tulemuslikkus garanteeritud.

Rikastusreaktsiooni DNA kogumass ei tohiks ületada 6000 ng.

Proovisisend	Rikastamise kordsus	DNA mass teegi kohta (ng)	Kogu DNA teegi mass (ng)
Kvaliteetne gDNA	12	250–500	3000–6000
FFPE-st ekstraheeritud gDNA	1	200	200

- Salvestage nende teekide indeksid, mida kavatsete selles etapis koguda.
- Arvutage iga teegi kontsentratsiooni põhjal välja maht, mis tuleb vajaliku DNA massi saavutamiseks rikastamisreaktsioonile lisada.
  - Kvaliteetne gDNA: Arvutage 250–500 ng sisendi jaoks vajaliku teegi maht.
  - FFPE-st ekstraheeritud gDNA: Arvutage 200 ng sisendi jaoks vajaliku teegi maht.
- Lisage iga teegi puhul arvutatud maht PCR-plaadi samasse süvendisse.
- Kvaliteetse gDNA kasutamise korral tehke üht järgmistest toimingutest, võttes aluseks kogutud eelrikastatud teekide kogumahu:
  - Kui eelrikastatud teegi maht = 30 µl, jätkake jaotisega [Sondide hübridisatsioon leheküljel 37](#).
  - Kui eelrikastatud teegi maht on < 30 µl, lisage RSB, et saavutada kogumaht 30 µl.
  - Kui eelrikastatud teegi maht on > 30 µl, kasutage kogutud proovi kontsentreerimiseks helmepõhist meetodit või vaakumkontsentraatorit. Lisage kontsentreeritud kogutud proovile RSB, et saavutada kogumaht 30 µl.
- FFPE-st ekstraheeritud gDNA kasutamise korral tehke üht järgmistest toimingutest, võttes aluseks kogutud eelrikastatud teekide kogumahu.

- Kui eelrikastatud teegi maht = 7,5 µl, jätkake jaotisega [Sondide hübridisatsioon leheküljel 37](#).
- Kui eelrikastatud teegi maht on < 7,5 µl, lisage RSB, et saavutada kogumaht 7,5 µl.

## OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral sulgege plaat ja hoidke toodet kuni 30 päeva temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.

## Mahu põhjal kogumine

Kui sisend on 50–1000 ng gDNA-d, ei ole samas katses loodud üksikute teekide kvantifitseerimine ja normaliseerimine vajalik.

Optimaalse jõudluse saavutamiseks ühendage ainult sama kasutaja ettevalmistatud eelrikastatud teegi kogumise proovid, reaktiivipartii ja indeksadapteri plaat.

1. Salvestage nende teekide indeksid, mida kavatsete selles etapis koguda.
2. Kombineerige järgmised eelrikastatud teegi ja RSB mahud rikastamise kordsuse tagamiseks uue PCR-plaadi samasse süvendisse.  
Saadud maht on 30 µl.

Rikastamise kordsus *	Iga eelrikastatud teegi maht (µl)	RSB maht (µl)
1-kordne	14	16
2-kordne	14	2
3-kordne	10	0
4-kordne	7,5	0
5-kordne	6	0
6-kordne	5	0
7-kordne	4,2	0,6
8-kordne	3,7	0,4
9-kordne	3,3	0,3
10-kordne	3	0
11-kordne	2,7	0,3
12-kordne	2,5	0

\*Mittestandardsete kordsuste (2-kordne kuni 11-kordne) kohta teabe saamiseks vt [Protseduuri piirangud leheküljel 2](#).

## OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral sulgege plaat ja hoidke toodet kuni 30 päeva temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.

## [Valikuline] Eelrikastatud teekide kvalifitseerimine

Kui ühendatakse mahu järgi, kasutage eelrikastatud teekide kvantifitseerimiseks fluoromeetrilist meetodit, mis kasutab dsDNA interkalatsioonivärvi. Eelrikastatud teekide kvalifitseerimiseks kasutage DNA fragmentide analüsaatorit koos sobiva fragmendianalüüsi komplektiga.

Kasutage teegi kvalifitseerimiseks kokku 1 µl. Eelrikastatud teegid on piisavalt kontsentreeritud, et võimaldada väikeseid lahjendusi kvantifitseerimiseks või fragmentide analüüsiks.

## Sondide hübridisatsioon

Selles etapis seotakse DNA sihtpiirkonnad kinnistussondidega.

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid ühilduvad nii Illumina kui ka kolmanda poole rikastamise DNA oligonukleotiidipaneelidega. Teavet kolmanda poole paneelide nõutavate spetsifikatsioonide kohta vt jaotisest [Rikastussondi paneeli nõuded leheküljel 10](#).

### Kulutarvikud

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (sinine kork)
- Rikastussondi paneel
- 96 süvendiga PCR-plaat
- Kleepuv tihend
- Valmistage ette hilisemaks protseduuriks:
  - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
  - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (oranž kork)

### Teave reaktiivide kohta

- NHB2 sadestub ja eraldub säilitamise ajal.
- Rikastussondi paneel viitab Illumina müüja valitud rikastamise oligonukleotiidipaneelile.

### Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud:

Toode	Säilitamine	Juhised
EHB2	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile. Kasutage segamiseks keerisegurit. Kui täheldate kristalle ja hägusust, korrake keeriseguril segamist või pipettige segamiseks üles-alla, kuni lahus on selge.
Rikastussondi paneel	-25 °C kuni -15 °C (illumina)	Nii illumina kui ka muude tootjate paneelide puhul soojendage toatemperatuurini. Kasutage segamiseks keerisegurit.
NHB2 (sinine kork)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuuril. Kui see on toatemperatuuril, eelsoojendage mikroproov inkubaatoris 5 minuti jooksul kasutatava sondiga samale temperatuurile. Resuspendeerimiseks segage keeriseguril maksimaalsel kiirusel 10 sekundi jooksul 3 korda. Tsentrifugeerige lühidalt. Pipettige katsuti põhjast üles ja alla. Kui täheldate kristalle ja hägusust, korrake keeriseguril segamist või pipettige segamiseks üles-alla, kuni lahus on selge. Kasutage soojana, et vältida sademete tekkimist.
SMB3*	2 °C kuni 8 °C	Kui jätkate järgmise protseduuriga kohe pärast HYB-programmi 90-minutilise ooteaega, soojendage toode toatemperatuurile vähemalt 2 tundi enne HYB-programmi käivitamist.
EEW* (oranž katsuti)	-25 °C kuni -15 °C	Kui jätkate järgmise protseduuriga kohe pärast HYB-programmi 90-minutilise ooteaega, soojendage toode toatemperatuurile vähemalt 2 tundi enne HYB-programmi käivitamist. Eelsoojendage toatemperatuuril mikroproovi inkubaatoris sobiva hübridisatsiooni- ja sidumistemperatuurini 30 minutit enne HYB-programmi lõppu.

\* Kui lõpetate enne järgmist protseduuri, lükake selle reaktiivi ettevalmistamine edasi, kuni jõuate selle protseduurini.

2. Salvestage järgmine HYB-programm termotsüklerisse kasutades loetletud sobivat arvu tsükleid, mis on toodud tabel 3.

- Valige kaane eelsoojendus ja seadke see väärtusele 100 °C
- Määrake reaktsiooni maht
  - [Kvaliteetne gDNA] 100 µl
  - [FFPE-st ekstraheeritud gDNA] 25 µl
- 98 °C 5 minutit
- X 1-minutilist tsükli, alustades esimese tsükli puhul temperatuuril 98 °C, seejärel langetades temperatuuri 2 °C tsükli kohta
- Hoidke toodet 90 minutit sobival temperatuuril.
  - [FFPE-st ekstraheeritud gDNA] 58 °C
  - [80-meer sondi paneelid] 58 °C
  - [Somaatilise variandi nimetamine] 58 °C
  - [Kõik muu] 62 °C

Kogu käitusaeg on ~115 minutit.

tabel 3 Tsüklike arv proovi või paneeli kohta

Proovi ja paneeli tüüp	Tsüklike arv (X)
FFPE-st eraldatud gDNA (olenemata paneeli tüübist)	20
80-meer sondi paneelid (olenemata proovi tüübist)	20
Somaatilise variandi nimetamine	20
Kõik muud proovid ja paneelid	18

## Protseduur

1. [Kvaliteetne gDNA] Lisage järgmised reaktiivid *loetletud järjekorras* igale PCR-plaadi kogutud teegile. Ärge valmistage põhisegu. NHB2 ja EHB2 põhisegu valmistamine mõjutab rikastamise jõudlust negatiivselt.
  - NHB2 (sinine kork) (50 µl)
  - Rikastussondi paneel (10 µl)
  - EHB2 (10 µl)
2. [Kvaliteetne gDNA] Kasutades pipetti, mis on seatud väärtusele 90 µl, pipettige iga süvendit 10 korda segamiseks.
3. [FFPE-st ekstraheeritud gDNA] Lisage järgmised reaktiivid *loetletud järjekorras* igale PCR-plaadi kogutud teegile. Ärge valmistage põhisegu. NHB2 ja EHB2 põhisegu valmistamine mõjutab rikastamise jõudlust negatiivselt.
  - NHB2 (sinine kork) (12,5 µl)

- Rikastussondi paneel (2,5 µl)
  - EHB2 (2.5 µl)
4. [FFPE-st ekstraheeritud gDNA] Kasutades pipetti, mis on seatud väärtusele 20 µl, pipettige igas süvendis 10 korda segamiseks.
  5. Sulgege plaat ja tsentrifugege 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
  6. Asetage prooviplaat eelprogrammeeritud termotsüklerisse ja käivitage HYB-programm.
  7. Kui HYB-programmi temperatuuri säilitamise aeg lõpeb, jätkake kohe järgmise protseduuriga.



### ETTEVAATUST

Kui hübridisatsiooni reaktsiooni temperatuur langeb alla toatemperatuuri, tekib sade.

## Hübridiseeritud sondide sidumine

See etapp kasutab sihitud huvipiirkondadele hübridiseeritud sondide kinnistamiseks Streptavidin Magnetic Beads (SMB3).

### Kulutarvikud

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (oranž kork)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsuti
- 96 süvendiga MIDI-plaat
- 96 süvendiga PCR-plaat
- Kleepuv tihend
- MIDI-plaadi magnetalus
- Valmistage ette hilisemaks protseduuriks.
  - Enhanced PCR Mix (EPM)
  - PCR Primer Cocktail (PPC)

### Teave reaktiivide kohta

- EEW
  - Veenduge, et EEW oleks enne mikroproovi inkubaatoris eelkuumutamist vähemalt 2 tundi toatemperatuuril sulanud.



- Veenduge, et EEW-d oleks mikroproovi inkubaatoris kuumutatud 30 minutit enne HYB-programmi lõppu.
  - Jätke EEW mikroproovi inkubaatorisse, kui seda ei kasutata. EEW peaks jääma kuumutatuks kogu protokollil vältel.
  - Pärast toatemperatuurile jõudmist võib olla hägune.
  - Võib tunduda kollane.
- SMB3
    - SMB3 peab olema enne kasutamist toatemperatuuril.

## Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
SMB3	2 °C kuni 8 °C	Laske 2 tundi seista ja toatemperatuurile soojeneda. Pöörake ümber ja segage seejärel keerisseguril, kuni toode on täielikult resuspendeeritud.
EEW (oranž katsuti)	-25 °C kuni -15 °C	Pärast 2-tunnist inkubeerimist toatemperatuuril eelsoojendage mikroproovi inkubaatoris sobiva hübridisatsiooni- ja sidumistemperatuurini 30 minutit enne HYB-programmi lõppu.
EE1	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile ja segage seejärel keerisseguril.
HP3	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile ja segage seejärel keerisseguril.
ET2	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile. Kasutage segamiseks keerissegurit.
EPM	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage ühe tunni jooksul jää peal. Segamiseks pöörake ümber ja tsentrifugeerige seejärel lühidalt. Tõstke kõrvale jää peale.
PPC	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage ühe tunni jooksul jää peal. Keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt. Tõstke kõrvale jää peale.

2. Eelsoojendage ühte mikroproovi inkubaatorit MIDI soojendusploki siseosaga, et inkubeerida prooviplaati ühel järgmistest temperatuuridest. Valikulist teist mikroproovi inkubaatorit saab kasutada EEW eelsoojendamiseks. Asetage EEW MIDI soojendusploki siseosa peale.

- [FFPE] 58 °C
- [80-meer sondi paneelide kohta] 58 °C

- [Somaatilise variandi nimetamine] 58 °C
- [Kõik muu] 62 °C

## Protseduur

### Sidumine

1. Lisage SMB3 uue MIDI-plaadi vastavasse süvendisse järgmiselt.
  - [Kvaliteetne gDNA] Lisage 250 µl SMB3.
  - [FFPE-st ekstraheeritud gDNA] Lisage 62.5 µl SMB3.
2. Kasutades pipetti, mis on seatud väärtusele 100 µl kvaliteetse gDNA jaoks või 25 µl FFPE puhul, kandke iga ühendatud teek 96 süvendiga PCR-plate uude MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
3. Sulgege plaat ja raputage 4 minuti jooksul kiirusel 1200 pööret minutis.
4. Pritsimise korral tsentrifugeerige lühidalt plaati.
5. Asetage kogutud teekide plaat mikroproovi inkubaatoris MIDI-soojendusploki siseosale EEW katsuti alla, sulgege kaas, ja inkubeerige seejärel 15 minutit sobival temperatuuril:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80-meer sondi paneel] 58 °C
  - [Somaatilise variandi nimetamine] 58 °C
  - [Kõik muu] 62 °C
6. Eemaldage kogutud teekide plaat ja tsentrifugeerige 30 sekundi jooksul 280 × g juures.
7. Asetage plaat kohe MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
8. [Kvaliteetne gDNA] Eemaldage tasemele 200 µl seatud pipeti abil kõigist süvenditest, visake ära supernatant igast süvendist helmegraanulit häirimata.
9. [FFPE-st ekstraheeritud gDNA] eemaldage tasemele 90 µl seatud pipeti abil kõigist süvenditest, visake ära supernatant igast süvendist helmegraanulit häirimata.
10. Eemaldage kogu järelejäänud supernatant ja visake see ära.

### Pesemine

1. Eemaldage magnetaluselt.
2. [Kvaliteetne gDNA] Eemaldage kiirest EEW mikroproovi inkubaatorist ja lisage 200 µl igasse süvendisse
3. [FFPE-st ekstraheeritud gDNA] Eemaldage kiiresti EEW mikroproovi inkubaatorist ja lisage 50 µl igasse süvendisse.
4. Viige kasutamata EEW tagasi mikroproovi inkubaatorisse ja hoidke soojendatuna.
5. Sulgege ja raputage 4 minuti jooksul kiirusel 1800 pööret minutis.

6. Asetage prooviplaat mikroprooviinkubaatoris MIDI-soojendusploki siseosale EEW katsuti alla, sulgege kaas, ja inkubeerige seejärel 5 minutit sobival temperatuuril:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80-meer sondi paneelid] 58 °C
  - [Somaatilise variandi nimetamine] 58 °C
  - [Kõik muud paneelid] 62 °C
7. Asetage plaat kohe MIDI-plaadi magnetlusele ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
8. Kasutades pipetti, mis on seatud väärtusele 200 µl kvaliteetse gDNA puhul või 50 µl FFPE puhul, eemaldage ja visake ära kogu supernatant igast süvendist.
9. Korrake etappe 1–8 kaks korda kokku kolme pesu jooksul.

## Pesemise ülekandmine

1. Eemaldage plaat magnetlusele.
2. [ Kvaliteetne gDNA ] Eemaldage kiiresti mikroproovi EEW inkubaatorist ja lisage 200 µl igasse süvendisse.
3. [FFPE-st ekstraheeritud gDNA] Eemaldage EEW kiiresti mikroproovi inkubaatorist ja lisage 50 µl igasse süvendisse.
4. Sulgege plaat ja raputage 4 minuti jooksul kiirusel 1800 pööret minutis. Pritsimise korral vähendage kiirust väärtuseni 1600 pööret minutis.
5. Viige resuspendeeritud helmeste lahus uuele MIDI-plaadile üle.  
Osa proovi võib jääda süvenditesse.



### ETTEVAATUST

Reaktiivi ülekandmine minimeerib reaktiivide jääkide ülekandumist, mis võivad pärssida allavoolu PCR-i.

6. Asetage prooviplaat mikroproovi inkubaatoris MIDI-soojendusploki siseosale, sulgege kaas ja inkubeerige seejärel 5 minutit sobival temperatuuril:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80-meer sondi paneelid] 58 °C
  - [Somaatilise variandi nimetamine] 58 °C
  - [Kõik muu] 62 °C
7. Asetage plaat kohe MIDI-plaadi magnetlusele ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
8. Kasutades pipetti, mis on seatud väärtusele 200 µl kvaliteetse gDNA jaoks või 50 µl FFPE jaoks, eemaldage ja visake ära kogu supernatant igast süvendist.
9. Tsentrifugeerige plaati 30 sekundi jooksul 280 × g juures.
10. Asetage MIDI-plaat 10 sekundiks magnetlusele.
11. Kasutage 20 µl pipetti, et eemaldada järelejäänud vedelik igast süvendist ja see ära visata.

12. Jätka ke viivitamatult jaotisega *Elueerimine* leheküljel 44 et vältida helmeste liigset kuivamist ja teegi saagise vähenemist.

## Elueerimine

1. Ühendage järgmised mahud elueerimisseguga valmistamiseks. Korrutage iga maht töödeldavate kogutud teekide arvuga.
  - EE1 (28,5 µl)
  - HP3 (1,5 µl)Täiendav reaktiivi ülejääk sisaldub mahus.
2. Segage keerisseguril ja tsentrifuugige seejärel lühidalt.
3. Eemaldage MIDI-plaat magnetaluselt.
4. Lisage 23 µl elueerimisseguga igasse süvendisse.
5. Sulgege plaat ja raputage 2 minuti jooksul kiirusel 1800 pööret minutis.
6. Inkubeerige plaati 2 minutit toatemperatuuril.
7. Tsentrifugeerige plaati 30 sekundi jooksul 280 × g juures.
8. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
9. Kandke 21 µl supernatanti MIDI-plaadilt vastavasse uue 96 süvendiga PCR-plaadi süvendisse.
10. Visake MIDI-plaat ära.
11. Lisage 4 µl ET2 igassesüvendisse, mis sisaldab 21 µl supernatanti.
12. Seadke pipett väärtusele 20 µl ja pipettige segamiseks aeglaselt igat süvendit 10 korda.
13. Sulgege plaat ja tsentrifuugige seejärel 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
14. Inkubeerige plaati 1 minuti jooksul toatemperatuuril.

## Rikastatud teekide amplifitseerimine

Selles etapis kasutatakse rikastatud teegi amplifitseerimiseks PCR-i.

### Kulutarvikud

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Kleepuv tihend

## Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
EPM	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage ühe tunni jooksul 4 °C juures või jää peal. Segamiseks pöörake ümber ja tsentrifuugige seejärel lühidalt. Tõstke kõrvale jää peale.
PPC	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage ühe tunni jooksul 4 °C juures jää peal. Keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt. Tõstke kõrvale jää peale.

2. Salvstage järgmine AMP-programm termotsüklerisse, kasutades sobivat arvu PCR-tsükleid, mis on loetletud järgmises tabelis.

- Valige kaane eelsoojendus ja seadke see väärtusele 100 °C
- Määrake reaktsiooni maht väärtusele 50 µl
- 98 °C 45 sekundit
- (X) tsükli järgmistest:
  - 98 °C 30 sekundit
  - 60 °C 30 sekundit
  - 72 °C 30 sekundit
- 72 °C 5 minutit
- Hoida temperatuuril 10 °C

Kogu käitusaeg on ~35 minutit.

Proovi ja paneeli tüüp	(X) tsükli
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) kvaliteetse gDNA jaoks	10
Illumina Exome Panel (CEX) FFPE jaoks	12
Kõik muud proovid ja paneelid	12 <sup>1234</sup>

<sup>1</sup> Saab reguleerida kuni 15 tsükli väikeste kolmanda osapoole paneelide jaoks hilisema optimeerimise kaudu. Kui kasutate FFPE-d, saab tsükli arvu reguleerida kuni 17-ni.

<sup>2</sup> Saab reguleerida kuni 17 tsükli kolmandate poolte paneelide jaoks, millel on ainult 500 sondi. Kui kasutate FFPE-d, saab tsükli arvu reguleerida kuni 19-ni.

<sup>3</sup> FFPE proovide jaoks saab reguleerida kuni 14 tsükli.

<sup>4</sup> PCR-tsükli arvu suurendamine võib põhjustada FFPE proovide suuremat dubleerimissagedust ja väiksemaid fragmentide suurusi.

## Protseduur

1. Lisage 5 µl PPC igasse süvendisse.
2. Lisage 20 µl EPM igasse süvendisse.
3. Sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1200 pööret minutis.
4. Tsentrifugege plaati 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
5. Asetage see eelprogrammeeritud termotsüklerisse ja käivitage AMP-programm.

## OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral hoidke toodet kuni kaks päeva temperatuuril 2 °C kuni 8 °C. Teise võimalusena jätke termotsükler kuni 24 tunniks tööle.

## Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine

Selles etapis kasutatakse Cleanup Beads rikastatud teegi puhastamiseks ja soovimatute saaduste eemaldamiseks.

## Kulutarvikud

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Värskest valmistatud 80% etanool (EtOH)
- Kleepuvad tihendid
- 96 süvendiga MIDI-plaat
- 96 süvendiga PCR-plaat
- MIDI-plaadi magnetalus

## Teave reaktiivide kohta

- Cleanup Beads
  - Segage enne igat kasutuskorda keerisseguril.
  - Segage keerisseguril sageli, et helmed oleksid ühtlaselt jaotunud.
  - Lahuse viskoossuse tõttu aspireerige ja doseerige aeglaselt.

## Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
CB	Toatemperatuur	Segage keerisseguril ja pöörake ümber, et segada, kuni vedeliku värvus on homogeenne.
RSB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile. Kasutage segamiseks keerissegurit.

2. Valmistage absoluutetanoolist värsket 80% EtOH.

## Protseduur

1. Tsentrifugeerige PCR-plaati 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
2. Segage CB 10 sekundi jooksul 3 korda keerisseguril ja pöörake seejärel ümber.
3. Lisage 40,5 µl CB igasse süvendisse uuel **MIDI** plaadil.
4. Kandke 45 µl igast PCR-plaadi süvendist vastavasse MIDI-plaadi süvendisse.
5. Sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 pööret minutis.
6. Inkubeerige MIDI-plaati 5 minutit toatemperatuuril.
7. Tsentrifugeerige plaat 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
8. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake kuni vedelik on selge (5 minutit).
9. Kasutades väärtusele 95 µl seatud pipetti, eemaldage ja visake ära kogu supernatant kõigist süvenditest.
10. Peske kaks korda järgmiselt.
  - a. Kui plaat on magnetalusel, lisage ilma segamata 200 µl värsket 80% EtOH-d.
  - b. Inkubeerige 30 sekundit.
  - c. Eemaldage supernatant helmeid häirimata ja visake see ära.
11. Kuivatage 5 minutit magnetalusel õhu käes.
12. Õhu käes kuivatamise ajal kasutage 20 µl pipetti, et eemaldada ja visata ära üleliigne EtOH igast süvendist.
13. Eemaldage magnetaluselt ja lisage 32 µl RSB igasse süvendisse.
14. Sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 pööret minutis.
15. Inkubeerige plaat 5 minutit toatemperatuuril.
16. Tsentrifugeerige plaat 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
17. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
18. Kandke 30 µl supernatanti 96 süvendiga MIDI-plaadilt vastavasse uue PCR-plaadi süvendisse.
19. Visake MIDI-plaat ära.

## OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral sulgege plaat ja hoidke toodet kuni 7 päeva temperatuuril -25 °C kuni -15 °C.

## Rikastatud teekide kontrollimine

Kaheaheelalise gDNA sisendi kvantifitseerimiseks kasutage fluorestsentsil põhinevat meetodit, mis kasutab interkalatsioonivärvi. Vältige meetodeid, mis mõõdavad kogu nukleiinhapet, nagu NanoDrop või muud UV-kiirguse neeldumise meetodid.

1. Käitage 1 µl rikastatud teeki, kasutades oma kvantifitseerimismeetodit.

**MÄRKUS** Sondi kogumolaarsus mõjutab proportsionaalselt rikastamisjärgset teegi saagist.

Eeldatakse, et fragmendi keskmine suurus on 125–235 bp ja DNA fragmentide jaotus suurusvahemikus ~200 bp kuni ~1000 bp.



## Teekide lahjendamine lähtekontsentratsioonini

Selles etapis lahjendatakse teegid sekveneerimissüsteemi lähtekontsentratsioonini ja see on seerialahjenduse esimene samm. Pärast lähtekontsentratsioonini lahjendamist on teegid valmis denatureerimiseks ja lõpliku laadimiskontsentratsioonini lahjendamiseks.

Sekveneerimiseks, olenemata kasutatavast rikastussondi paneelist, soovib Illumina seadistada paarisotsalise käituse 151 tsükliga lugemi (2 × 151) ja 10 tsükliga indeksi lugemi kohta. Kui soovite vähem kattuvaid lugemeid või vähem töötlemata katvust, saate järjestada kuni väärtuseni 2 × 126 või 2 × 101.

1. Arvutage teegi või kogutud teekide molaarsuse väärtus järgmise valemi abil.

- DNA fragmentide analüsaatoriga kvalifitseeritud teekide puhul kasutage teegi jaoks saadud keskmist suurus.
- Kõigi muude kvalifitseerimismeetodite puhul kasutage teegi keskmise suurusena väärtust 350 bp.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{keskmine teegi suurus (bp)}} = \text{Molaarsus (nM)}$$

Näiteks kui teegi kontsentratsioon on 20 ng/μl ja keskmine suurus on 350 bp, on saadud molaarsuse väärtus 86,58 nM.

$$\frac{20 \text{ ng} / \mu \text{l} \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times 350 \text{ (bp)}} = 86,58 \text{ (nM)}$$

2. Kasutades molaarsuse väärtust, arvutage RSB ja teegi mahud, mis on vajalikud teekide lahjendamiseks algkontsentratsioonini teie süsteemis.

Sekveneerimissüsteem	Minimaalne nõutav teegi maht (μl)	Lähtekontsentratsioon (nM)	Lõplik laadimiskontsentratsioon (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) või 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM on algne kontsentratsioon lõplikul laadimiskontsentratsioonil 350 pM. Vajaduse korral reguleerige lõplikku laadimiskontsentratsiooni järgmise tabeli abil.

Lõplik laadimiskontsentratsioon (pM)	Ühendatud teegi kontsentratsioon (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1

Lõplik laadimiskontsentratsioon (pM)	Ühendatud teegi kontsentratsioon (nM)
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

### 3. Teekide lahjendamine RSB abil:

- **Multipleksitud teegikogumina kvantifitseeritud teegid** – lahjendage kogumit lähtekontsentratsioonini oma süsteemis.
- **Individaalselt kvantifitseeritud teegid** – lahjendage igat teeki oma lähtekontsentratsioonini oma süsteemis. Multipleksitud teegikogumi loomiseks lisage katsutisse igast lahjendatud teegist 10 µl.

### 4. Järgige oma süsteemi denatureerimise ja lahjendamise juhiseid, et lahjendada lõpliku laadimiskontsentratsioonini.

- Teavet süsteemi NextSeq 550Dx kohta vt jaotisest [Süsteemi NextSeq 550Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 50](#).
- Süsteemi MiSeqDx kohta vt jaotisest [Süsteemi MiSeqDx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 52](#).
- Süsteemi NovaSeq 6000Dx kohta vt jaotisest [Süsteemi NovaSeq 6000Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 53](#).

Lõplikud laadimiskontsentratsioonid on lähtepunktiks ja üldiseks juhiseks. Optimeerige kontsentratsioone oma töövoos ja kvantifitseerimismeetodi jaoks järgnevate järjestuste või läbivooluküveti tiitrimise abil.

## Süsteemi NextSeq 550Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine

Järgige järgmisi juhiseid teekide denatureerimiseks ja lahjendamiseks sekveneerimise jaoks sekveneerimissüsteemis NextSeq 550Dx.

### Kulutarvikud

- HT1 (Hübriidisatsioonipuhver)
- 1N NaOH
- 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

## Ettevalmistamine

Valmistage sekveerimiseks ette *värske* lahjendus 0,2 N NaOH denatureeritud teekidele. Lisamaht on ette valmistatud, et vältida väikeste pipettimisvigade mõjutamist lõpliku NaOH kontsentratsiooniga.



### ETTEVAATUST

Värskelt lahjendatud 0,2 N NaOH on denatureerimisprotsessi jaoks hädavajalik. Vale denatureerimine võib saagikust vähendada.

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
HT1	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuuril. Hoidke temperatuuril 2 °C kuni 8 °C, kuni olete valmis denatureeritud teeke lahjendama.

2. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et valmistada ette värske NaOH lahjendus:
  - Laborikvaliteediga vesi (800 µl)
  - 1N NaOH (200 µl)
 Tulemus on 1 ml 0,2 N NaOH.
3. Pöörake katsutit segamiseks mitu korda.
4. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et valmistada ette 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.
  - Laborikvaliteediga vesi (800 µl)
  - 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)
 Tulemus on 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

**MÄRKUS** Hoidke katsuti korgiga kinni. Kasutage värsket lahjendust **12 tunni** jooksul.

## Teekide denatureerimine

1. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised teekide mahud ja värskelt lahjendatud 0,2 N NaOH.
  - 10 µl teek
  - 10 µl 0,2 N NaOH
2. Segage lühidalt keeriseguril ja tsentrifuugige seejärel 280 × g juures 1 minuti jooksul.
3. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
4. Lisage 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

## Denatureeritud teekide lahjendamine 20 pM-ni

1. Lisage denatureeritud teeke sisaldavasse katsutisse 970 µl eeljahutatud HT1. Tulemus on 20 pM denatureeritud teek.

2. Segage lühidalt keeriseguril ja tsentrifuugige seejärel 280 × g juures 1 minuti jooksul.
3. Asetage 20 pM teegid jääle, kuni olete valmis jätkama lõplikku lahjendamist.

## Teekide lahjendamine laadimiskontsentratsioonini

1. Lisage järgmised mahud, et lahjendada denatureeritud 20 pM teegi lahus kontsentratsioonini 1,2 pM.
  - Denatureeritud teegi lahus (78 µl)
  - Eeljahutatud HT1 (1222 µl)Kogumaht on 1,3 ml 1,2 pM juures.
2. Segamiseks pöörake ümber ja kasutage seejärel impulsstsentrifuugi.
3. Jätkake sekveneerimisega. Juhised leiate seadme *NextSeq 550Dx Instrument viitejuhendist (dokument nr 100000009513)* ja tarkvara *Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx töövoos juhendist seadme NextSeq 550Dx jaoks (dokument nr 200015671)* või *DRAGEN-i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakenduse NextSeq 550Dx kasutusjuhendis (dokument nr 200025238)*.

## Süsteemi MiSeqDx sekveneerimiseks ettevalmistamine

Järgige järgmisi juhiseid teekide denatureerimiseks ja lahjendamiseks sekveneerimise jaoks MiSeqDx sekveneerimissüsteemis.

### Kulutarvikud

- HT1 (Hübridisatsioonipuhver)
- 1N NaOH

### Ettevalmistamine

Valmistage sekveneerimiseks ette *värske* lahjendus 0,2 N NaOH denatureeritud teekidele. Lisamaht on ette valmistatud, et vältida väikeste pipettimisvigade mõjutamist lõpliku NaOH kontsentratsiooniga.



#### ETTEVAATUST

Värskelt lahjendatud 0,2 N NaOH on denatureerimisprotsessi jaoks hädavajalik. Vale denatureerimine võib saagikust vähendada.

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
HT1	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuuril. Hoidke temperatuuril 2 °C kuni 8 °C, kuni olete valmis denatureeritud teekide lahjendama.

2. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et valmistada ette värske NaOH lahjendus:

- Laborikvaliteediga vesi (800 µl)
- 1N NaOH (200 µl)

Tulemus on 1 ml 0,2 N NaOH.

**MÄRKUS** Hoidke katsuti korgiga kinni. Kasutage värsket lahjendust **12 tunni** jooksul.

## 4 nM teegi denatureerimine

- Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud.
  - 4 nM teek (5 µl)
  - 0,2N NaOH (5 µl)
- Segage lühidalt keeriseguril ja tsentrifugeerige seejärel 280 × g juures 1 minuti jooksul.
- Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
- Lisage denatureeritud teeki sisaldavasse katsutisse 990 µl eeljahutatud HT1.  
Tulemus on 1 ml 20 pM denatureeritud teek.

## Denatureeritud 20 pM teegi lahjendamine

- Lahjendage soovitud kontsentratsioonini järgmiste mahtude abil.

Kontsentratsioon	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM teek	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Eeljahutatud HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- Segamiseks pöörake ümber ja kasutage seejärel impulsstsentrifuugi.
- Jätkake sekveneerimisega. Juhised leiate jaotisest *Seadme MiSeqDx viitejuhend seadme MOS v4 jaoks (dokument nr 1000000157953)*, ja tarkvara *Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx töövoogu juhendist seadme MiSeqDx jaoks (dokument nr 200015661)*.

## Süsteemi NovaSeq 6000Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine

Järgige järgmisi juhiseid teekide denatureerimiseks ja lahjendamiseks sekveneerimise jaoks sekveneerimissüsteemis NovaSeq 6000Dx.

### Kulutarvikud

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (Resuspension Buffer)
- 1N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 400 mM Tris-HCl, pH 8.0

- NovaSeq 6000Dx teegitoru

## Ettevalmistamine

Valmistage sekveneerimiseks ette *värsk* lahjendus 0,2 N NaOH denatureeritud teekidele. Lisamaht on ette valmistatud, et vältida väikeste pipettimisvigade mõjutamist lõpliku NaOH kontsentratsiooniga.



### ETTEVAATUST

Värskelt lahjendatud 0,2 N NaOH on denatureerimisprotsessi jaoks hädavajalik. Vale denatureerimine võib saagikust vähendada.

1. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised teekide mahud, et lahjendada 1N NaOH 0,2 N NaOH-ks:  
tabel 4 S2 režiim

Reaktiiv	Ühe läbivooluküveti maht (µl)	Kahe läbivooluküveti maht (µl)
Laborikvaliteediga vesi	40	80
Varu 1N NaOH	10	20

Nende mahtude tulemuseks on 50 µl 0,2N NaOH ühe läbivooluküveti kohta või 100 µl 0,2N NaOH kahe läbivooluküveti kohta.

tabel 5 S4 režiim

Reaktiiv	Ühe läbivooluküveti maht (µl)	Kahe läbivooluküveti maht (µl)
Laborikvaliteediga vesi	80	160
Varu 1N NaOH	20	40

Nende mahtude tulemuseks on 100 µl 0,2N NaOH ühe läbivooluküveti kohta või 200 µl 0,2N NaOH kahe läbivooluküveti kohta.

2. Pöörake segamiseks mitu korda ümber või keeristage põhjalikult.
3. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et valmistada ette 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.

- Laborikvaliteediga vesi (600 µl)
- 1 M Tris-HCl, pH 8,0 (400 µl)

Tulemus on 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0

### MÄRKUS

Hoidke katsuti korgiga kinni. Kasutage värsket lahjendust **12 tunni** jooksul.

## Normaliseeritud teegi ühenduse loomine

Laadimiskontsentratsioon võib varieeruda sõltuvalt teegi ettevalmistamisest, kvantifitseerimisest ja normaliseerimismeetoditest.

Kasutage teekide sobiva kontsentratsiooni normaliseerimiseks ja seejärel ühendamiseks järgmisi juhiseid. Samal läbivooluküvetil sekveneeritud teegid tuleb ühendada üheks normaliseeritud kogumiks.

**MÄRKUS** Maksimaalne proovide arv, mida saab süsteemiga raja kohta analüüsida Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx abil, on 192. See piir on tingitud UD indeksite kogu arvust A ja B komplektis.

## Teekide normaliseerimine ühendamise jaoks

- Määrake soovitud lõpliku laadimiskontsentratsiooni põhjal soovitud ühendatud teegi kontsentratsioon.
  - Lõpliku laadimiskontsentratsiooni 350 pM korral on nõutav ühendatud teegi kontsentratsioon 1,75 nM.
  - Ühendatud teegi kontsentratsiooni määramiseks erineva lõpliku laadimiskontsentratsiooni jaoks vt jaotist [Teekide lahjendamine lähtekontsentratsioonini leheküljel 49](#).
- Normaliseerige teegid soovitud ühendatud teegi kontsentratsioonini, kasutades 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Abi saamiseks teekide lahjendamisel sobivale kontsentratsioonile vaadake [ühendamiskalkulaatorit](#) Illumina veebilehel.

### Soovitavad laadimiskontsentratsioonid

Optimaalne DNA laadimiskontsentratsioon oleneb teegi tüübist ja sisestussuurusest. Teekide puhul > 450 bp võivad olla vajalikud suuremad laadimiskontsentratsioonid.

## Ühenda normaliseeritud teegid ja lisa valikuline PhiX-i kontroll

- Ühendage iga normaliseeritud teegi sobiv maht uues mikrotsentrifuugi katsutis, et saada üks järgmistest lõplikest mahtudest.

Režiim	Lõplik maht (µl)
S2	150
S4	310

- [Valikuline] Loputage 1% denatureerimata kujul PhiX-i järgmiselt.
  - Lahjendage 10 nM PhiX-i 2,5 nM-ni, kasutades 10 mM Tris-HCl-d, pH 8,5.
  - Lisage denatureerimata 2,5 nM PhiX-i sobiv kogus denatureerimata teegikogumi katsutisse.

Režiim	Mittedenatureeritud 2,5 nM PhiX (µl)	Mittedenatureeritud teegikogu (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

PhiX-is raputades on 1% soovitatav kogus hästi tasakaalustatud teekidele. Madala mitmekesisusega teegid võivad nõuda rohkem. PhiX-i kontrolli kasutamiseks vähese mitmekesisusega teekidega pöörduge juhiste saamiseks Illumina tehnilise toe poole.

## Denature Library Pool ja valikuline PhiX-i kontroll

1. Lisage denatureerimata teegikogumi ja valikulise PhiX-i katsutisse 0,2N NaOH järgmiselt.

Läbivooluküvett	0.2N NaOH	Mittedenatureeritud teegikogu (µl)	Tulemuse maht
S2	37	150	187 µl või 187,9 µl koos PhiX-iga
S4	77	310	387 µl või 388,9 µl koos PhiX-iga

2. Sulgege kork ja seejärel keeristage lühidalt.
3. Tsentrifugeerige 280 × g juures kuni 1 minut.
4. Inkubeerige denatureerimiseks 8 minutit toatemperatuuril.
5. Lisage neutraliseerimiseks 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Režiim	400 mM Tris-HCl, pH 8.0 (µl)	Tulemuse maht
S2	38	225 µl või 225,9 µl koos PhiX-iga
S4	78	465 µl või 466,9 µl koos PhiX-iga

6. Sulgege kork ja seejärel keeristage lühidalt.
7. Tsentrifugeerige 280 × g juures kuni 1 minut.
8. Kandke kogu denatureeritud teegi või denatureeritud teegi ja PhiX-i maht NovaSeq 6000Dx teegikatsutisse.
9. Jätkake sekveneerimisega. Juhised leiate *seadme NovaSeq 6000Dx toote dokumentatsioonist (dokument nr 200010105)* ja *DRAGEN-ist Illumina DNA Prep with Enrichment Dx for NovaSeq 6000Dx jaoks (dokument nr 200014776)*.



## Tõrkeotsing

Töövoos tõrkeotsinguks kasutage järgmist tabelit. Kui sekveneerimiskäitus või proovi teekide valmistamine nurjub kaks korda, võib vajalik olla täiendav tõrkeotsing. Võtke ühendust Illumina tehnilise toega.

Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Sekveneerimiskäitus ei läbi kvaliteedikontrolli Spetsifikatsioon	Kasutaja viga või laboriseadme tõrge analüüsi töövoos	<p>Kvalifitseerige rikastatud teeke, et tagada teegi sobiv saagis ja fragmentide suuruse jaotus. Korrake teekide valmistamist ühes järgmistest etappidest olenevalt sellest, kus kahtlustatav kasutusviga või seadme tõrge tekkis. Kui te viga ei tuvasta või tekivad muud tõrked, pöörduge käituse tõrkeotsinguks Illumina tehnilise toe poole.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekveneerige uuesti teeke. Vaadake jaotist <a href="#">Süsteemi NextSeq 550Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine</a> leheküljel 50, <a href="#">Süsteemi MiSeqDx sekveneerimiseks ettevalmistamine</a> leheküljel 52 või <a href="#">Süsteemi NovaSeq 6000Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine</a> leheküljel 53.</li> <li>• Rikastage uuesti teeke. Vt jaotist <a href="#">Sondide hübriidisatsioon</a> leheküljel 37.</li> </ul> <p>Käivitage teekide valmistamine alates töövoos algusest. Vt <a href="#">Kasutusjuhised</a> leheküljel 21.</p>
	Seadme probleem	Võtke ühendust Illumina tehnilise toega.
Tõrge FASTQ loomisel või üldine sekveneerimissüsteemi tõrge (nt võrgutõrge, tõrked reaktiivide sisestamisel/eemaldamisel jne)	Tarkvara või seadme probleem	<p>Analüüsiga abi saamiseks vaadake mooduli või rakenduse juhendist või vaadake <a href="#">Seadme NextSeq 550Dx Instrument viitejuhend (dokument nr 1000000009513)</a>, <a href="#">Seadme MiSeqDx viitejuhend seadme MOS v4 jaoks (dokument nr 1000000157953)</a>. või seadme <a href="#">NovaSeq 6000Dx tootedokumentatsiooni (dokument nr 200010105)</a>. Täiendava abi saamiseks pöörduge Illumina tehnilise toe poole.</p>

Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
DNA teek ei anna järjestuse laadimiseks piisavat saagist	Proovi sisendmahu nõuded pole täidetud	Veenduge, et proovi sisendmaht oleks sobiv, ja korrake teekide ettevalmistamist. Vaadake jaotist <a href="#">Proovi sisestamise soovitusel leheküljel 18</a> .
	Kasutamiseviga või seadme tõrge analüüsi töövoos	Korrake teekide valmistamist ühes järgmistest etappidest olenevalt sellest, kus kahtlustatakse kasutusviga või seadme tõrge tekkis. Kui te viga ei tuvasta või tekivad muud tõrked, pöörduge käituse tõrkeotsinguks illumina tehnilise toe poole.  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sekveneerige uuesti teeke. Vaadake jaotist <a href="#">Süsteemi NextSeq 550Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 50</a>, <a href="#">Süsteemi MiSeqDx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 52</a> või <a href="#">Süsteemi NovaSeq 6000Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 53</a>.</li> <li>• Rikastage uuesti teeke. Vt jaotist <a href="#">Sondide hübriidtsatsioon leheküljel 37</a>.</li> </ul> Käivitage teekide valmistamine alates töövoos algusest. Vt <a href="#">Kasutusjuhised leheküljel 21</a> .
	Rikastussondi paneelile esitatavad nõuded ei olnud täidetud	Veenduge, et rikastussondi paneel oleks sobiv, ja korrake teekide ettevalmistamist. Vt jaotist <a href="#">Rikastussondi paneeli nõuded leheküljel 10</a> .

## Toimivusnäitajad

### Jõudlus tervete Exome Panelitega

Exome Paneli jõudlust analüüsiti, kasutades Coriell Cell Line gDNA NA12878 madalaimat (50 ng) ja kõrgeimat (1000 ng) soovitud sisendit koos teadaoleva tõekomplektiga iduliini variantide tuvastamiseks (Coriell Platinum Genome). Esinduspaneelidena kasutati Exome Panel 1 (45 Mb) ja Exome Panel 2 (36,8 Mb). 24 tehnilist replikaati analüüsiti analüüsiga Komplekt illumina DNA Prep with Enrichment Dx kasutades Exome Panel 1 (45 Mb) kahes 12-kordses rikastamisreaktsioonis. 12 tehnilist replikatsiooni analüüsiti analüüsiga Komplekt illumina DNA Prep with Enrichment Dx, kasutades Exome Panel 2 (36,8 Mb) ühes 12-kordses rikastamisreaktsioonis. Seejärel sekveneeriti rikastatud teeke sekveneerimissüsteemis NextSeq 550Dx tarkvara DNA Generate FASTQ Dx mooduliga Local Run Manager.

Järgmises tabelis on esitatud iga paneeliga analüüsitud tehniliste replikatsioonide sekundaarse sekveneerimise ja variantide kutsumise jõudlusmõõdikute keskmised väärtused.

tabel 6 Testi jõudlus kahe terve Exome Paneliga

Paneel	Polsterdatu d ainulaadne lugemirikastus	Katvuse ühtsus	Fragmendi pikkuse mediaan	SNV tagasikutsumine <sup>1</sup>	SNV täpsus <sup>2</sup>	Indeli tagasikutsumine <sup>1</sup>	Indeli täpsus <sup>2</sup>
Exome Panel 1 (45 Mb)	80%	96%	186 bp	96%	99%	90%	89%
Exome Panel 2 (36,8 Mb)	93%	98%	188 bp	96%	99%	92%	93%

<sup>1</sup> Tagasikutsumine = positiivsed / (tõesed positiivsed + valenegatiivsed)

<sup>2</sup> Täpsus = tõesed positiivsed / (tõesed positiivsed + valepositiivsed)

## Avastamispiir

Avastamispiiri testimiseks kasutati Horizon HD799 DNA etalonstandardit. HD799 koosneb mõõdukalt kahjustatud formaliiniga töödeldud DNA-st, mille SNV-d on alleelsete sageduste vahemikus 1–24,5%. Kasutati madalaimat soovitatavat DNA sisendit (50 ng) ja hinnati SNV-de tuvastamise kiirust  $\geq 5,0\%$  alleelivariandi sageduse (VAF) korral. 16 tehnilist replikatsiooni analüüsi analüüsiga Komplekt illumina DNA Prep with Enrichment Dx, kasutades FFPE töövoogu, rikastati vähiülse rikastuspaneeliga (1,94 Mb) 16 (1-kordses) rikastamises ja sekveneeriti seejärel seadme NextSeq 550Dx mooduliga DNA Generate FASTQ Dx.

Kõik proovid vastasid paneelispetsiifiliste proovide jõudlusnõuetele, nagu on näidatud järgmises tabelis.

tabel 7 Proovi jõudlus tuvastamispiiri puhul

Paneel	SNV-de variandi tuvastamise määr $\geq 5,0\%$ VAF	Keskmine Katvuse ühtsus
Vähiülene rikastuspaneel (1,94 Mb, 523 geeni)	100%	99%

## Segavad ained

Võimalike häirijate mõju hinnati Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx abil, hinnates analüüsi toimivust häirivate ainete juuresolekul.

### Häired täisvere puhul

Atsetaminofeeni (eksogeenne ühend, ravim), kreatiniini ja triglütseriide (endogeensed metaboliidid) analüüsiti, lisades need enne DNA ekstraheerimist inimese täisvere proovidesse. Vere kogumisest (alla soovitatud mahu) tulenevate häirete hindamiseks lisati EDTA-d ka täisvereproovidesse. Peale selle lisati proovi ettevalmistamisest tulenevate häirete hindamiseks täisverest ekstraheeritud DNA-sse molekulaarse klassi etanool.

Järgmises tabelis on toodud analüüsitavad kontsentratsioonid häirija kohta.

tabel 8 Täisveres analüüsitud potentsiaalselt häirivad ained ja kontsentratsioonid

Analüüsitav aine	Analüüsitav kontsentratsioon
Atsetaminofeen	15,6 mg/dl* Kolm korda suurem kontsentratsioon, mida oodatakse pärast ravimi raviannust.
Kreatiniin	15 mg/dl* Suurim täheldatud kontsentratsioon elanikkonnas.
Triglütseriidid	1,5 g/dl* Suurim täheldatud kontsentratsioon elanikkonnas.
EDTA	6 mg/ml Oodatust kolm korda suurem kontsentratsioon veres, mis on kogutud EDTA katsutitesse.
Molekulaarse klassi etanool	15% v/v Eluaadis pärast DNA ekstraheerimist.

\* Standardi CLSI EP37-ED1:2018 kohaselt

Iga häiriva aine puhul analüüsiti analüüsiga Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx tehnilist replikatsiooni, mida rikastati ühekordse (12-kordse) rikastamise korral Exome Panel 1-ga (45 Mb) ja sekveneeriti seejärel seadme NextSeq 550Dx mooduliga DNA Generate FASTQ Dx.

Analüüsitud ainete puhul vastasid kõik 12 proovi jõudlusnõuetele ja mingeid häireid analüüsi toimimises ei täheldatud.

### Häired FFPE koe puhul

Kaht kolorektaalset FFPE proovi analüüsiti hemoglobiini olemasolu ja puudumise korral 0,1 mg juures 10 µm FFPE lõigu kohta, mis esindas halvimat stsenaariumit, mille puhul on saastunud 50% FFPE koeproovist kõrge hemoglobiinitasemega verega. Proove analüüsiti analüüsiga Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx,

kasutades ühekordse rikastamise tüüpilise paneelina 1. vähiülest rikastuspaneeli (1,94 Mb). Seejärel sekveneeriti rikastatud teeke seadmes NextSeq 550Dx mooduliga DNA Generate FASTQ Dx. Kõik proovid vastasid proovi jõudluse nõuetele ja näidati, et hemoglobiin ei mõjuta analüüsi toimimist.

Proovi ettevalmistamisest tulenevate häirete hindamiseks lisati põievähi FFPE koeproovist ekstraheeritud DNA-le kaks eksogeenset ühendit. Analüüsitud eksogeensed ained on ekstraheerimislahused, mida tavaliselt kasutatakse DNA ekstraheerimise protsessis, ja need on koos analüüsitud kogustega loetletud järgmises tabelis.

Analüüsitava aine lahused on kaubanduslikult saadaval kolonnipõhistes DNA isoleerimiskomplektides.

tabel 9 FFPE-s analüüsitud potentsiaalselt häirivad eksogeensed ained ja kontsentratsioonid

Analüüsiv aine	Analüüsiv kontsentratsioon (µl / 30 µl eluaat)
Deparafiinimislahus	113 × 10 <sup>-6</sup>
Pesupuhver AW2	0,417

Iga häiriva aine kohta analüüsiti analüüsiga Komplekt illumina DNA Prep with Enrichment Dx kaheksat tehnilist kordust, mida rikastati ühekordse rikastamise korral vähiülese rikastuspaneeliga (1,94 Mb) ja sekveneeriti seejärel seadme NextSeq 550Dx mooduliga DNA Generate FASTQ Dx.

Mõlema analüüsitud aine puhul vastasid kõik kaheksa proovi jõudlusnõuetele ja mingeid häireid analüüsi toimimises ei täheldatud.

## Ristsaastumine

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (naiselt, 10 proovi), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (mehelt, 12 proovi) ja matriitsita kontrollmaterjale (NTC, 2 proovi) analüüsiti analüüsiga Komplekt illumina DNA Prep with Enrichment Dx malelauaplaadi paigutuses. Kõik proovid kasutasid proovi ristsaastumise hindamiseks kõige rangemat tingimusest kõrgeimat (1000 ng) gDNA sisendi soovitusi. Analüüsi viisid kaks korda läbi kaks eraldi operaatorit. 12-kordsetes rikastamisreaktsioonides kasutati Exome Panel 1 (45 Mb). Seejärel sekveneeriti rikastatud teeke seadmes NextSeq 550Dx mooduliga DNA Generate FASTQ Dx. Hindamine viidi läbi, hinnates meesspetsiifilise Y-kromosoomi katvust naiste proovides võrreldes naiste proovide täisplaadi taustatasemega ja NTC proovide indeksi esitusega.

tabel 10 Ristsaastumise tulemused

Naiste proovid meeste Y-kromosoomi katvusega < 3x algtaseme müraga	Indeksi esitus NTC-s
100%	< 0,0005%

## DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application Performance

NovaSeq 6000Dx DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rakenduse toimivusnäitajad on toodud *seadme NovaSeq 6000Dx pakendi infolehes (dokument nr 200025276)*.

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx seadmel NextSeq 550Dx on samad sekundaarse analüüsi töövood, mis seadme NovaSeq 6000Dx rakendusel, sh järgmised kolm töövoogu: FASTQ genereerimine, FASTQ ja VCF-i genereerimine idulliini variantide tuvastamiseks ning FASTQ ja VCF-i genereerimine somaatiliste variantide tuvastamiseks.

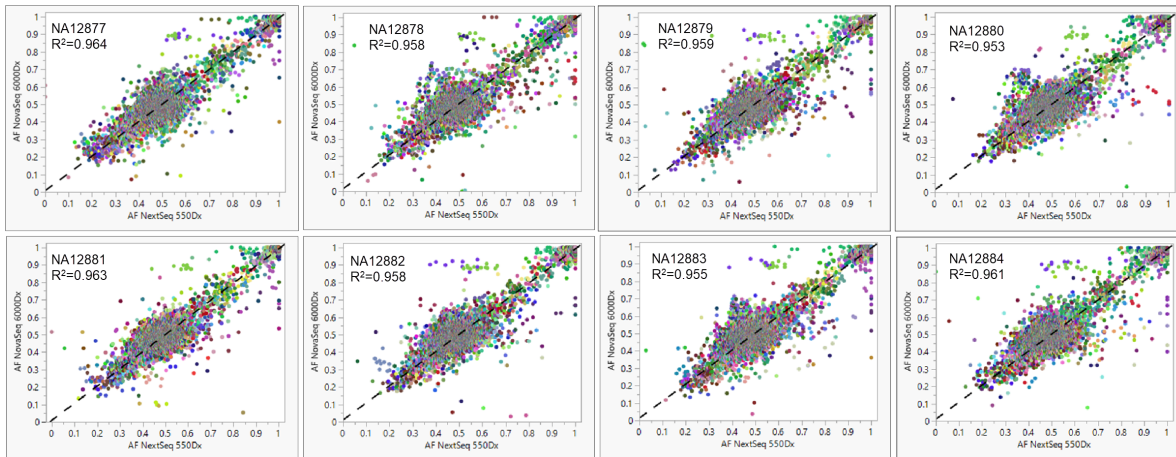
Võrreldav sekundaarse analüüsi jõudlus saadi mõlemal platvormil sekveneeritud samast teegi ettevalmistusest. Variandi tuvastamise määra ([tabel 11](#)) ja esinemissageduse ühtivust ([joonis 1](#)) Coriell Cell Line gDNA proovide puhul hinnati, kasutades representatiivset analüüsi, mis on loodud mitmesuguste geenide päringuks, hõlmates 1 970 505 alust (9 232 sihtmärki) kõigis 23 inimese kromosoomis. Testiti kaheksat Platinum Genome'i DNA proovi, seitse replikaati kuuest (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) ja üks (NA12881) viiest replikaadist (vt [joonis 1](#)). Teeke sekveneeriti kolme käitusega seadmetel NovaSeq 6000Dx ja NextSeq 550Dx ning variantide nimetamine viidi läbi FASTQ ja VCF-i genereerimisega DRAGEN-i idulliini variantide tuvastamise analüüsi töövooga jaoks rakenduse Illumina DNA Prep with Enrichment Dx jaoks.

Seadmete NovaSeq 6000Dx ja NextSeq 550Dx rakenduse toimivuse tugeva korrelatsiooni põhjal määratakse, et rakenduse NextSeq 550Dx jaoks kehtivad ka *seadme NovaSeq 6000Dx pakendi infolehes (dokument nr 200025276)* esitatud sekundaarse analüüsiga seotud toimivusnäitajad DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx jaoks.

tabel 11 Rakenduse toimivus – SNV-de variandi tuvastamise määr, insertioonid ja deletsioonid

Paneel	Variantide tuvastamise määr seadmel NovaSeq 6000Dx	Variantide tuvastamise määr seadmel NextSeq 550Dx
Ülegenoomne paneel (1,97 Mb, 9 232 sihtmärki, 23 kr.)	99,9%	99,9%

joonis 1 Variantide sageduse võrdlus NovaSeq 6000Dx ja NextSeq 550Dx kaituste puhul DRAGEN-iga rakenduse IDPE Dx analüüsi jaoks



## Lisa: Illumina UD-indeksite adapterijärjestused

Need ainulaadsed kahe (UD) indeksiga adapterid on paigutatud plaadile, et jõustada soovitud sidumisstrateegia. Indeksadapterid on 10 aluse pikkused tavalise kaheksa aluse asemel.

Index 1 (i7) adapterid

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [ i 7 ] GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (i5) adapterid

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [ i 5 ] TCGTCGGCAGCGTC

1. lugemi ja 2. lugemi adapterite kärpimiseks kasutatakse järgmist järjestust.

CTGTCTCTTATACACATCT

## Plaat A / kogum 1 indeksiadapterid

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG



Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACCTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGCACTAATG	TGACTACATA
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGGT	CTCATAGCGA
UDP0083	GTAAGGCATA	AGACACATTA
UDP0084	GTCCACTTGT	GCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	CATGAGTACT
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	CATGTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

**Plaat B / kogum 2 indeksiadapterid**

<b>Indeksi nimi</b>	<b>i7 alust adapteris</b>	<b>i5 alust adapteris</b>
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCTTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

## Muudatuste ajalugu

Dokument	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
Dokument nr 200038118 v00	Juuli 2023	<p>Esialgne väljalase.</p> <p>Eelmine dokument 200019584 asendati selle dokumendiga. Muudatused dokumendist 200019584 v2 selle uue dokumendi osas:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lisatud sisu, mis toetab sekveneerimist seadmes NextSeq 550Dx, kasutades DRAGEN-i rakenduse Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application jaoks NextSeq 550Dx jaoks.</li> <li>• Täiendati mitte saadaval olevate reagentide loendit.</li> <li>• Lisati esinemissageduste aruandluse teave hoiatustele ja ettevaatusabinõudele.</li> <li>• Selgitatud rikastamisteede ootus.</li> <li>• Lisatud juhised 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 ettevalmistamiseks.</li> <li>• Eemaldati sekveneerimise ettevalmistamise etapi tüpograafilise viga.</li> </ul> <p>Dokumendis 200019584 varem tehtud muudatused:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lisati sisu, mis toetab sekveneerimist seadmel NovaSeq 6000Dx.</li> <li>• Lisati sekveneerimissüsteemide nimed ja katalooginumbrid.</li> <li>• Eemaldati ühe indeksiga teekide ainulaadne topeltindekseerimise teave.</li> </ul>

## Patendid ja kaubamärgid

See dokument ja selle sisu kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. ja selle tütarettevõtetele („Illumina“) ning on mõeldud kasutamiseks ainult ettevõtte lepingulistele klientidele seoses selles dokumendis kirjeldatud toote (toodete) kasutamisega ega ole mõeldud mitte mingiks muuks otstarbeks. Seda dokumenti ega selle sisu ei tohi mis tahes viisil kasutada ega muul eesmärgil levitada ja/või edastada, avaldada või reprodutseerida ilma Illumina eelneva kirjaliku nõusolekuta. Illumina ei anna selle dokumendiga kolmandale isikule oma patendi-, kaubamärgi-, autori-, tava- või muu sarnase õiguse alusel mitte ühtegi litsentsi.

Kvalifitseeritud ja asjakohase koolituse saanud töötajad peavad selles dokumendis kirjeldatud juhiseid järgima rangelt ja üksikasjalikult, et tagada siin kirjeldatud toote (toodete) õige ja ohutu kasutusviis. Siinse dokumendi sisu tuleb enne nimetatud toote (toodete) kasutamist täies ulatuses läbi lugeda ja endale selgeks teha.

SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD JUHISTE MITTE LUGEMINE JA MITTE ÜKSIKASJALIKULT JÄRGIMINE VÕIB KAHJUSTADA TOODET (TOOTEID), VIGASTADA INIMESI (SH KASUTAJAID VÕI TEISI) JA KAHJUSTADA MUUD VARA. NIMETATUD JUHUL EI KEHTI ÜKSKI TOOTELE (TOODETELE) ANTUD GARANTII.

ILLUMINA EI VASTUTA SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD TOOTE (TOODETE) (SEALHULGAS TOOTE OSAD VÕI TARKVARA) VÄÄRKASUTUSE EEST.

© 2023 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

Kõik kaubamärgid kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. või nende vastavatele omanikele. Kaubamärgi kohta lisateabe saamiseks vt [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktteave



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 USA  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (väljaspool Põhja-Ameerikat)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



### Sponsor Austraalias

Illumina Australia Pty Ltd  
Nursing Association Building  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Austraalia

## Toote märgistus

Toote pakendil ja etikettidel olevate sümbolite täieliku kirjelduse leiате, kui külastate aadressi [support.illumina.com](http://support.illumina.com) ja avate oma komplekti vahekaardi *Documentation* (Dokumentatsioon).