

SAMO ZA DIAGNOSTIČNO UPORABO IN VITRO. SAMO ZA IZVOZ.

## Predvidena uporaba

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit je komplet reagentov in potrošnega materiala za pripravo knjižnic vzorcev iz genomske DNK, pridobljene iz človeških celic in tkiva za razvoj *in vitro* diagnostičnih testov. Za pripravo knjižnic, ki so usmerjene na določene genomske regije, so potrebne ploščice s sondami, ki jih dobavi uporabnik. Ustvarjene knjižnice vzorcev so namenjene za uporabo s sistemi za sekvenciranje Illumina. Komplet Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx vključuje programsko opremo za nastavitev, spremljanje in analizo sekvenciranja.

## Načela postopka

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je namenjen ročni pripravi knjižnic za sekvenciranje DNK, obogatenih za ciljne regije iz genomske DNK, ekstrahirane iz človeških celic in tkiva.

Za obogatitev tarč so potrebne biotinitirane oligonukleotidne plošče, ki jih dobavi uporabnik. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z različnimi velikostmi plošč, vključno z majhnimi ploščami (< 20.000 sond) in velikimi ploščami (> 200.000 sond). Ustvarjene obogatene knjižnice so namenjene za sekvenciranje s sistemi za sekvenciranje Illumina.

Postopek Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vključuje naslednje korake:

- **Tagmentacija genomske DNK** – Uporablja Enrichment BLT Small (eBLTS) za tagmentacijo vhodne DNK. Med tagmentacijo je gDNK fragmentirana in tagmentirana z adapterji v enem koraku. Za nasičenje eBLTS v reakciji tagmentacije je treba vnesti najmanj 50 ng DNK. Ko so fragmenti eBLTS nasičeni, se določi število molekul DNK za oblikovanje normaliziranih knjižnic z dosledno porazdelitvijo velikosti fragmentov.
- **Čiščenje po tagmentaciji** – Očisti DNK z adapterji na eBLTS, čemur sledi ojačitev.
- **Ojačitev tagmentirane DNK** – Ojača tagmentirano DNK z uporabo programa PCR z omejenim ciklom. Na konce fragmentov DNK se dodajo enolični dvojni (UD) indeksi, ki omogočajo dvojno enolično črtno kodiranje knjižnic DNK in ustvarjanje gruč med sekvenciranjem.
- **Čiščenje knjižnic** – Uporablja postopek čiščenja s kroglicami za čiščenje in izbiro velikosti ojačanih knjižnic DNK.
- **Združevanje knjižnic** – Knjižnice DNK združi z enoličnimi indeksi v eno zbirko, ki vsebuje do 12 knjižnic. Knjižnice lahko združite glede na volumen ali maso.
- **Hibridizacija sond** – Vključuje reakcijo hibridizacije, med katero se knjižnice dvoverižne DNK denaturirajo, plošča z biotinitiranimi sondami DNK pa se hibridizira v ciljne genomske regije.
  - Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z več ploščami. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne vključuje plošče za obogatitev. Plošče s sondami dobavi uporabnik, pri čemer morajo izpolnjevati zahtevane specifikacije. Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so združljivi z

oligonukleotidnimi ploščami Illumina za obogatitev DNK tretjih strank, ki ustrezajo zahtevanim specifikacijam. Za informacije o zahtevanih specifikacijah za panele tretjih strank glejte [Zahteve za plošče s sondami za obogatitev na strani 11](#).

- **Zajem hibridiziranih sond** – Uporablja Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) za zajem biotiniziranih sond, hibridiziranih v interesne ciljne regije.
- **Ojačitev obogatenih knjižnic** – Uporablja PCR za ojačitev obogatenih knjižnic.
- **Čiščenje obogatenih knjižnic** – S postopkom čiščenja s kroglicami očisti obogatene knjižnice, pripravljene za sekvenciranje.
- **Sekvenciranje** – Sekvenciranje obogatenih knjižnic se izvede na sistemih za sekvenciranje MiSeqDx, NextSeq 550Dx ali NovaSeq 6000Dx. Za MiSeqDx in NextSeq 550Dx se integrirani modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager uporablja za nastavitev teka sekvenciranja, spremljanje teka in ustvarjanje FASTQ iz izpisov baz. Za NextSeq 550Dx s strežnikom DRAGEN in NovaSeq 6000Dx se aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx uporablja za nastavitev teka in sekundarno analizo z več razpoložljivimi poteki dela.

## Omejitve postopka

- Za diagnostično uporabo *in vitro*.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z genomsko DNK, ekstrahirano iz človeških celic in tkiva.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z vnosi 50–1000 ng dvoverižne gDNK. Ob vnosih izven teh vrednosti učinkovitost delovanja ni zagotovljena.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne vključuje reagentov za ekstrakcijo DNK. Rezultati analitičnega testiranja, vključno s testiranjem motenj, ki so navedeni v razdelku [Značilnosti delovanja na strani 59](#), so bili pridobljeni s polno krvjo in FFPE kot reprezentativnimi tipi vzorcev z reprezentativnimi kompleti za ekstrakcijo DNK. Vsi diagnostični testi, razviti za uporabo z reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, zahtevajo polno potrditev vseh vidikov delovanja z izbranim kompletom za ekstrakcijo DNK.
- Uporaba Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ni priporočljiva za vzorce FFPE slabe kakovosti z  $\Delta Cq > 5$ . Uporaba vzorcev z  $\Delta Cq > 5$  lahko poveča možnost neuspešne priprave knjižnice in zmanjša učinkovitost testa.
- Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so bili konfigurirani in testirani za vnos vzorcev, reakcije obogatitve in pleksnost, navedene v naslednji preglednici.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Vnos vzorca	Reakcije obogatitve	Pleksnost obogatitve
Komplet s 16 vzorci	Nizka kakovost (FFPE)	16 reakcij	1-pleksno
Komplet s 96 vzorci	Visoka kakovost (npr. polna kri)	8 reakcij	12-pleksno

- Obdelava vnosov FFPE je bila testirana, pri čemer se priporoča izključno za enopleksne reakcije obogatitve z uporabo kompleta s 16 vzorci.
- Za komplet s 96 vzorci so možne nestandardne pleksnosti (2- do 11-pleksno), vendar pa imajo naslednje omejitve:
  - Obdelava vzorcev v reakcijah 2- do 11-pleksne obogatitve zmanjša prepustnost kompleta.
  - Optimalni rezultati niso zagotovljeni. Za pridobitev ustreznega donosa obogatitve za nestandardno pleksnost je lahko potrebna dodatna optimizacija.
  - Za strategije združevanja z nizko pleksnostjo (2- do 8-pleksno) je za optimizacijo barvne uravnoteženosti za uspešno sekvenciranje in analizo podatkov potrebna izbira indeksiranih adapterjev z različnimi sekvencami. Modul DNA GenerateFASTQ Dx MiSeqDx in NextSeq 550Dx ponuja možnosti za barvno uravnotežene kombinacije indeksov med nastavitvijo teka. Za več informacij o strategijah združevanja glejte razdelek [Metode združevanja na strani 35](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je omejen na ustvarjanje obogatitvenih knjižnic, ki so lahko sekvencirane samo v sistemih MiSeqDx, NextSeq 550Dx in NovaSeq 6000Dx. Uporaba drugih sistemov za sekvenciranje zahteva popolno potrditev vseh vidikov delovanja.
- Plošče za obogatitev niso vključene v ta izdelek. Rezultati analitičnega testiranja, navedeni v razdelku [Značilnosti delovanja na strani 59](#), so bili pridobljeni z reprezentativnimi ploščami za obogatitev in so na voljo samo za informativne namene. Značilnosti analitske učinkovitosti služijo za ponazoritev splošnih zmogljivosti testa in ne določajo zmogljivosti ali primernosti v zvezi s kakršnimi koli specifičnimi trditvami o testu. Vsi diagnostični testi, razviti za uporabo s temi reagenti, zahtevajo polno potrditev vseh vidikov delovanja.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv tako z Illumina kot s ploščami za obogatitev tretjih strank. Vendar pa učinkovitost delovanja s ploščami za obogatitev tretjih strank, ki ne izpolnjujejo zahtev za plošče, ni zagotovljena. Za informacije o zahtevah za plošče glejte [Zahteve za plošče s sondami za obogatitev na strani 11](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit zahteva 2 uri za hibridizacijo. Izbira daljšega časa hibridizacije lahko vpliva na metriko učinkovitosti.
- Moduli DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager za MiSeqDx in NextSeq 550Dx ustvarjajo samo datoteke FASTQ. Če uporabljate te module, morate izvesti validacijo sekundarne analize.

- Aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je v sistemu NextSeq 550Dx na voljo s strežnikom DRAGEN Server in NovaSeq 6000Dx. Aplikacija podpira več sekundarnih analiznih potekov dela, vključno z ustvarjanjem FASTQ, ustvarjanjem FASTQ in VCF za zaznavanje variant zarodne linije ter ustvarjanjem FASTQ in VCF za zaznavanje somatskih variant. Če uporabljate aplikacijo za ustvarjanje VCF, vam ni treba izvesti validacije sekundarne analize. Omejitve aplikacije vključujejo naslednje:
  - Vstavljanja dolžin > 18 bp in izbrisi dolžin > 21 bp niso bili validirani.
  - Velike variante, vključno z multinukleotidnimi variantami (MNV) in velikimi indeli, so lahko v izhodni datoteki VCF navedene kot ločene manjše variante.
  - Majhne MNV so v izhodni datoteki VCF poročane kot ločene variante.
  - Izbrisi so v datoteki VCF na koordinatnem območju predhodne baze navedeni glede na obliko VCF. Preden poročate, da je posamezna izpisana baza homozigotna referenca, torej upoštevajte sosednje variante.
  - Omejitve, specifične za zarodne linije:
    - Germline FASTQ in analizni potek ustvarjanja VCF aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je zasnovan tako, da zagotavlja kvalitativne rezultate za izpis variant zarodne linije (npr. homozigotna, heterozigotna, divji tip).
    - Sprememba števila kopij lahko vpliva na to, ali je varianta opredeljena kot homozigotna ali heterozigotna.
    - Sistem ne poroča o več kot dveh variantah v enem lokusu, tudi v prisotnosti spremembe števila kopij.
  - Somatsko specifične omejitve:
    - Somatic FASTQ in analizni potek ustvarjanja VCF aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je zasnovan tako, da zagotavlja kvalitativne rezultate za izpis somatskih variant (tj. prisotnost somatske variante).
    - Potek dela analize Somatic FASTQ in ustvarjanja VCF ne razlikuje med zarodnimi in somatskimi variantami. Potek dela je zasnovan za odkrivanje variant v različnih variantnih frekvencah, vendar pa variantne frekvence ni mogoče uporabiti za razlikovanje somatskih variant od zarodnih variant.
    - Normalno tkivo v vzorcu vpliva na zaznavanje variant. Poročana meja zaznavnosti temelji na variantni frekvenci glede na skupno DNK, ekstrahirano iz tumorskega in normalnega tkiva.
    - Če se v istem lokusu izpiše več kot ena varianta alela, nobeden od alelov ne bo opredeljen kot prehodna varianta. Namesto tega bo opredeljen celotni nabor alelov, vendar pa bo filtriran z multialelno oznako.

## Komponente izdelka

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vključuje naslednje komponente.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, kataloška št. 20051354 (16 vzorcev) ali 20051352 (96 vzorcev)

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, kataloška št. 20051355 (16 vzorcev) ali 20051353 (96 vzorcev)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module for NextSeq 550Dx, kataloška št. 20063024
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module for MiSeqDx, kataloška št. 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NovaSeq 6000Dx, kataloška št. 20074609
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NextSeq 550Dx, kataloška št. 20074730

## Priloženi reagenti

Izvedba Illumina DNA Prep with Enrichment Dx zahteva komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s setom indeksov UD A ali komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s setom indeksov UD B. S kompletom s 16 ali 96 vzorci lahko izvedete naslednje število reakcij za pripravo in obogatitev knjižnic.

<b>Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit</b>	<b>Vnos vzorca</b>	<b>Reakcije obogatitve</b>	<b>Pleksnost obogatitve</b>
Komplet s 16 vzorci	Nizka kakovost (FFPE)	16 reakcij	1-pleksno
Komplet s 96 vzorci	Visoka kakovost (npr. polna kri)	8 reakcij	12-pleksno

## Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z indeksi UD set A/B

### Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, hranite pri temperaturi od 15 °C do 30 °C

Naslednji reagenti se pošljejo pri sobni temperaturi. Reagente nemudoma shranite pri označenih temperaturah shranjevanja, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja.

Ime reagenta	Količina v epruveti		Barva pokrovčka	Volumen polnjenja	Učinkovine
	16 vzorcev (št. 20050020)	96 vzorcev (št. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Rdeča	350 µl	Raztopina detergenta v vodi.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Zelena	41 ml	Puferirana vodna raztopina, ki vsebuje detergent in sol.
Cleanup Beads (CB)	1	Ni na voljo*	Rdeča	10 ml	Paramagnetne kroglice v trdni fazi v puferski vodni raztopini.

\* Cleanup Beads za 96 vzorcev so vključeni v Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (št. 20050030).

### Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 vzorcev), hranite pri temperaturi od 15 °C do 30 °C

Za komplete s 96 vzorci so Cleanup Beads priloženi izdelku Illumina Prep Dx Cleanup Beads (kataloška št. 20050030). Naslednji reagent se pošlje pri sobni temperaturi. Reagente nemudoma shranite pri označenih temperaturah shranjevanja, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja. Za 16 kompletov z vzorci so Cleanup Beads priloženi izdelku Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (kataloška št. 20050020).

Ime reagenta	Količina	Barva pokrovčka	Volumen polnjenja	Učinkovine
Cleanup Beads (CB)	4	Rdeča	10 ml	Paramagnetne kroglice v trdni fazi v puferski vodni raztopini.

## Reagenti 2 za tagmentacijo Illumina Prep Dx, shranjujte pri temperaturi od 2 °C do 8 °C.

Naslednji reagenti se pošljejo ohlajeni. Reagente nemudoma shranite pri označenih temperaturah shranjevanja, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja. Matično epruveto eBLTS hranite v pokončnem položaju tako, da so kroglice vedno potopljene v pufru.

Ime reagenta	Količina v epruveti		Barva pokrovčka	Volumen polnjenja		Učinkovine
	16 vzorcev (št. 20050021)	96 vzorcev (št. 20050026)		16 vzorcev	96 vzorcev	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Rumena	200 µl	290 µl	Kroglice Streptavidin Magnetic Beads, vezane s transpozomi v pufrski vodni raztopini, ki vsebuje glicerol, EDTA, ditiotreitrol, sol in detergent.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Prozorna	1,8 ml	1,8 ml	Puferirana vodna raztopina.

## Reagenti 3 za tagmentacijo Illumina Prep Dx, shranjujte pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.

Naslednji reagenti se pošljejo zamrznjeni. Reagente nemudoma shranite pri označenih temperaturah shranjevanja, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja.

Ime reagenta	Količina v epruveti		Barva pokrovčka	Volumen polnjenja		Učinkovine
	16 vzorcev (št. 20050022)	96 vzorcev (št. 20050027)		16 vzorcev	96 vzorcev	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Prozorna	290 µl	290 µl	Puferirana vodna raztopina, ki vsebuje magnezijevo sol in dimetilformamid.

Ime reagenta	Količina v epruveti		Barva pokrovčka	Volumen polnjenja		Učinkovine
	16 vzorcev (št. 20050022)	96 vzorcev (št. 20050027)		16 vzorcev	96 vzorcev	
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Prozorna	200 µl	610 µl	DNK polimeraza in dNTP-ji v pufrski vodni raztopini.

## Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 vzorcev), hranite pri temperaturi od 2 °C do 8 °C

Za komplete s 16 vzorci so naslednji reagenti priloženi izdelku Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloška št. 20050023). Za komplete s 96 vzorci so naslednji reagenti priloženi izdelku Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloška št. 20050028).

Naslednji reagenti se pošljejo ohlajeni. Reagente nemudoma shranite pri označenih temperaturah shranjevanja, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja.

Ime reagenta	Količina v epruveti	Barva pokrovčka	Volumen polnjenja	Učinkovine
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Prozorna	1,2 ml	Kroglice Streptavidin Magnetic Beads v pufrski vodni raztopini, ki vsebuje formamid, detergent in sol.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Prozorna	1,8 ml	Puferirana vodna raztopina.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Prozorna	200 µl	Puferirana vodna raztopina, ki vsebuje detergent in sol.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Prozorna	200 µl	Puferirana vodna raztopina.



## Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 vzorcev), hranite pri temperaturi od 2 °C do 8 °C

Za komplete s 96 vzorci so naslednji reagenti priloženi izdelku Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloška št. 20050028). Za komplete s 16 vzorci so naslednji reagenti priloženi izdelku IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloška št. 20050023).

Naslednji reagenti se pošljejo ohlajeni. Reagente nemudoma shranite pri označenih temperaturah shranjevanja, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja.

Ime reagenta	Količina v epruveti	Barva pokrovčka	Volumen polnjenja	Učinkovine
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Prozorna	1,2 ml	Kroglice Streptavidin Magnetic Beads v puferski vodni raztopini, ki vsebuje formamid, detergent in sol.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Prozorna	1,8 ml	Puferirana vodna raztopina.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Prozorna	200 µl	Puferirana vodna raztopina, ki vsebuje detergent in sol.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Prozorna	200 µl	Puferirana vodna raztopina.

## Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, hranite pri temperaturi od -25 °C do -15 °C

Naslednji reagenti se pošljejo zamrznjeni. Reagente nemudoma shranite pri označenih temperaturah shranjevanja, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja.

Ime reagenta	Količina v epruveti		Barva pokrovčka	Volumen polnjenja	Učinkovine
	16 vzorcev (št. 20050024)	96 vzorcev (št. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Prozorna	580 µl	Raztopina detergenta v vodi.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Rjavorumena	4,1 ml	Puferirana vodna raztopina, ki vsebuje soli in detergent.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Prozorna	320 µl	Mešanica PCR-primerjev (oligonukleotidov).

Ime reagenta	Količina v epruveti		Barva pokrovčka	Volumen polnjenja	Učinkovine
	16 vzorcev (št. 20050024)	96 vzorcev (št. 20050029)			
2 N NaOH (HP3)	1	1	Prozorna	200 µl	2 N raztopina natrijevega hidroksida (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Modra	480 µl	Puferirana vodna raztopina z DNK Cot-1, sredstvom za stiskanje in formamidom.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Prozorna	200 µl	DNK-polimeraza in dNTP-ji v pufrski vodni raztopini.

### Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, hranite pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.

Naslednji reagenti se pošljejo zamrznjeni. Reagente nemudoma shranite pri označenih temperaturah shranjevanja, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja. Za zaporedja indeksiranih adapterjev glejte [Dodatek: Sekvence indeksiranih adapterjev UD družbe Illumina na strani 64.](#)

Komponenta	Količina
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 indeksov), št. 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 indeksov), št. 20050039	1

## Reagenti, ki niso priloženi

### Potrebni reagenti, ki niso priloženi

- Reagenti za ekstrakcijo in čiščenje DNK
- Reagenti za kvantifikacijo DNK
- Etanol (100-odstotni za molekularno biologijo)
- Voda brez nukleaze
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 1N raztopina NaOH stopnje molekularne biologije
- Če uporabljate sistem NextSeq 550Dx Sequencing System:
  - 200 mM Tris, pH 7,0 (lahko se razredči z 1 M Tris-HCL, pH 7,0)

- NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) (kataloška št. 20028871)
- Če uporabljate sistem MiSeqDx Sequencing System:
  - MiSeqDx Reagent Kit v3 (kataloška št. 20037124)
- Če uporabljate sistem NovaSeq 6000Dx Sequencing System:
  - 400 mM Tris, pH 8,0 (lahko se razredči z 1 M Tris-HCL, pH 8,0)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 ciklov) (kataloška št. 20046931)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 ciklov) (kataloška št. 20046933)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (kataloška št. 20062292)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (kataloška št. 20062293)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube (kataloška št. 20062290)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Paketov (kataloška št.20062291)

## Zahteve za plošče s sondami za obogatitev

Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so združljivi tako z Illumina kot z oligonukleotidnimi ploščami za obogatitev DNK tretjih strank. Če uporabljate biotinilirane sonde za DNK tretjih strank (fiksne ali prilagojene plošče), se prepričajte, da izpolnjujejo zahtevane specifikacije.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je bila optimizirana in potrjena z uporabo naslednjih specifikacij za plošče tretjih strank. Primerljiva učinkovitost delovanja pri uporabi plošč tretjih strank, ki ne ustrezajo specifikacijam, ni zagotovljena.

- Dolžina sonde 80 bp ali 120 bp
- Od 500 do 675.000 sond
- Enoverižna ali dvoverižna DNK
- Skupni vnos sond  $\geq 3$  pmol za obogatitev pri 1- do 12-pleksni varianti

## Shranjevanje in rokovanje

- Sobna temperatura je opredeljena kot temperatura od 15 °C do 30 °C.
- Reagenti so stabilni, če so shranjeni, kot je navedeno, do določenega roka uporabnosti na oznakah kompleta. Za temperature shranjevanja glejte razdelek [Priloženi reagenti na strani 5](#).
- Zamrznjeni reagenti so stabilni največ štiri cikle zmrzovanja in tajanja, izvedene pred navedenim rokom uporabe.
- Postopek Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vključuje naslednje točke za varno zaustavitev:
  - Po [Ojačitev tagmentacijske DNK na strani 29](#) so ojačene knjižnice stabilne do 30 dni, če so shranjene pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.

- Po [Čiščenje knjižnic na strani 32](#) so očiščene ojačene knjižnice stabilne do 30 dni, če so shranjene pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.
- Po [Združevanje predhodno obogatenih knjižnic na strani 34](#) so zbrane knjižnice stabilne do 30 dni, če so shranjene pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.
- Po [Ojačitev obogatene knjižnice na strani 45](#) lahko plošča z obogatenimi ojačanami knjižnicami na cikličnem termostatu ostane do 24 ur. Ploščo lahko do 48 ur hranite pri temperaturi od 2 °C do 8 °C.
- Končne očiščene obogatene knjižnice so stabilne do 7 dni, če so shranjene pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.
- Če je katera koli embalaža ali vsebina Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit poškodovana ali ogrožena, se obrnite na službo Illumina za pomoč strankam.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) lahko tvori vidne oborine ali kristale. Če opazite oborine, 10 minut segrevajte pri 37 °C in nato vrtinčite, dokler se oborine ne raztopijo.
- Hybridization Oligos (HYB) in Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) predhodno segrejte na fiksno temperaturo hibridizacije glede na vrsto vzorca in ploščo s sondo. Za več informacij o ravnanju z NHB2 in EEW glejte [Postopkovne opombe na strani 17](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) in HYB Buffer+IDT NXT blokatorji (NHB2) lahko razvijejo kristale in postanejo motni. Če opazite kristale in motnost, mešajte z vrtinčenjem ali pipetiranjem navzgor in navzdol, dokler se raztopina ne zbistri. Prepričajte se, da pred pipetiranjem ogrejete NHB2.
- Pri ravnanju z Cleanup Beads (CB) uporabite naslednje najboljše prakse:
  - Kroglic ne zamrzujte.
  - Tik pred uporabo kroglice vrtinčite, dokler se ne resuspendirajo in dokler niso homogene barve.
- Pri ravnanju z Enrichment BLT Small (eBLTS) uporabite naslednje najboljše prakse:
  - Epruveto eBLTS hranite v pokončnem položaju tako, da so kroglice vedno potopljene v pufru.
  - Temeljito vrtinčite eBLTS, da se kroglice resuspendirajo. V izogib premiku kroglic centrifugiranje pred pipetiranjem ni priporočljivo.
  - Če se kroglice držijo stranskega dela ali vrha 96-kanalne plošče, 3 sekunde centrifugirajte pri 280 × g in nato pipetirajte, da se resuspendirajo.
- Pri rokovanju s ploščami z indeksiranimi adapterji upoštevajte naslednje najboljše prakse:
  - Ploščam z indeksiranimi adapterji ne dodajajte vzorcev.
  - Vsak kanal indeksirane plošče je samo za enkratno uporabo.

## Potrebna oprema in materiali, ki niso priloženi

Pred začetkom protokola se prepričajte, da imate poleg Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vso potrebno opremo in materiale.

## Oprema

Pred začetkom protokola se prepričajte, da imate vso potrebno opremo.

Protokol je optimiziran in potrjen z uporabo predmetov z navedenimi specifikacijami. Primerljiva učinkovitost delovanja ob uporabi opreme, ki ni skladna s specifikacijami, ni zagotovljena.

Nekateri elementi so potrebni samo za določene poteke dela. Ti elementi so navedeni v ločenih preglednicah.

- Ciklični termostat z naslednjimi specifikacijami:
  - Ogrevan pokrov
  - Najmanjši razpon nadzora temperature od 10 °C do 98 °C
  - Najmanjša natančnost temperature  $\pm 0,25$  °C
  - Največji reakcijski volumen 100  $\mu$ l
  - Združljivo s 96-kanalnimi PCR-ploščami s polno podlogo
- Inkubator za mikrovzorke z naslednjimi specifikacijami:
  - Temperaturni razpon od +5,0 °C do 99,0 °C
  - Združljivo s 96-kanalnimi MIDI-ploščami
- Inkubator za mikrovzorke, združljiv s 96-kanalnimi MIDI-ploščami
- Visokohitrostni stresalnik za mikroplošče z mešalno hitrostjo 200–3000 vrt./min
- Magnetno stojalo, združljivo s 96-kanalnimi PCR-ploščami
- Magnetno stojalo, združljivo s 96-kanalnimi MIDI-ploščami
- Fluorometer, združljiv z vašo kvantifikacijsko metodo
- Analizator fragmentov DNK
- Natančne pipete:
  - 10-mikrolitrške enokanalne in večkanalne pipete
  - 20-mikrolitrške enokanalne in večkanalne pipete
  - 200-mikrolitrške enokanalne in večkanalne pipete
  - 1000-mikrolitrške enokanalne pipete
  - Natančne pipete zagotavljajo natančno dovajanje reagentov in vzorcev. Enokanalne ali večkanalne pipete lahko uporabljate, če jih redno kalibrirate in če omogočajo natančnost do 5 % navedenega volumna.
- Centrifuga za mikroplošče
- Mikrocentrifuga
- Eden od naslednjih sistemov za sekvenciranje Illumina:
  - MiSeqDx Instrument, kataloška št. DX-410-1001
  - NextSeq 550Dx Instrument, kataloška št. 20005715, z izbirnim strežnikom Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx, kataloška št. 20086130

- NovaSeq 6000Dx Instrument, kataloška št. 20068232
- [Izbirno] Vakuumski koncentrador
- [FFPE] Sistem za znavanje PCR v realnem času

## Materiali

Pred začetkom protokola se prepričajte, da imate vse potrebne materiale.

Nekateri elementi so potrebni samo za določene poteke dela. Ti elementi so navedeni v ločenih preglednicah.

Protokol je optimiziran in potrjen z uporabo navedenih elementov. Primerljiva učinkovitost delovanja ob uporabi alternativnih materialov ni zagotovljena.

- Konice filtrirnih pipet
- Stožčaste centrifugirke, 15-mililitrske ali 50-mililitrske
- 1,5-mililitrske mikrocentrifugirke
- Večkanalni rezervoarji za reagent brez RNaze/DNaze, za enkratno uporabo
- Nizi 8 epruvt in pokrovčki brez RNaze/DNaze
- Serološke pipete
- 96-kanalna globoka polipropilenska plošča, 0,8 ml (MIDI-plošča)
- Trde 96-kanalne PCR-plošče s polno podlogo
- [FFPE] qPCR-plošče, združljive z instrumentom qPCR
- Samolepilne folije za 96-kanalne plošče z naslednjimi specifikacijami:
  - Odstranljiv, prozoren poliester
  - Primerno za PCR-plošče s podlogo
  - Močno lepilo, ki prenese več temperaturnih sprememb od -40 °C do 110 °C
  - Brez DNaze/RNaze
- Plastični potrošni material, združljiv z izbrano kvantifikacijsko metodo
- Fluorometrični komplet za kvantifikacijo dsDNK, združljiv z izbranim kvantifikacijskim sistemom:
  - Za kvantifikacijo vnaprej obogatenih ojačanih knjižnic lahko uporabite komplet za kvantifikacijo širokega razpona.
  - Za kvantifikacijo obogatenih knjižnic je razpon kompleta za kvantifikacijo odvisen od uporabljene plošče s sondami.
- Komplet za analizo fragmentov za kvalifikacijo knjižnic z izbranim kvalifikacijskim sistemom:
  - Za kvalifikacijo vnaprej obogatenih ojačanih knjižnic lahko uporabite komplet širokega razpona.
  - Za kvalifikacijo obogatenih knjižnic je razpon kompleta za kvalifikacijo odvisen od uporabljene plošče s sondami.

- [Izbirno] Komplet za ekstrakcijo DNK iz človeških celic in tkiva. Uporabite lahko katero koli potrjeno metodo ekstrakcije.

## Zbiranje, transport in shranjevanje vzorcev



### OPOZORILO

Z vsemi vzorci ravnajte, kot da so potencialni povzročitelji okužb.

- Ta test je združljiv z genomsko DNK, ekstrahirano iz človeških celic in tkiva.
- Pri komercialno dostopni prečiščeni gDNK se prepričajte, da so bili vzorci transportirani pod ustreznimi pogoji in shranjeni v skladu z navodili proizvajalca. Za shranjevanje, zamrzovanje in odtajanje ciklov gDNK sledite najboljšim praksam.
- Za vnos polne krvi upoštevajte zahteve glede zbiranja, transporta in shranjevanja krvi, ki veljajo za izbrano metodo ekstrakcije DNK. Uporabite lahko katero koli potrjeno metodo ekstrakcije. Transport polne krvi mora biti v skladu z državnimi, zveznimi in lokalnimi predpisi za prevoz etioloških sredstev.
- Za ekstrakcijo DNK iz tkiva FFPE lahko uporabite katero koli potrjeno metodo ekstrakcije. Upoštevajte navodila in priporočila, ki veljajo za metodo ekstrakcije za določanje naslednjih praks:
  - Metode fiksacije tkiv v formalinu in vlaganja tkiv v parafinu za zagotovitev najboljše kakovosti ekstrahirane DNK.
  - Shranjevanje vzorcev FFPE.
  - Zahteve za začetni material, npr. število in debelina rezin FFPE. Večina metod čiščenja priporoča uporabo svežih rezin.

## Opozorila in previdnostni ukrepi

- Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vsebujejo kemikalije, ki so lahko nevarne. Do telesnih poškodb lahko pride zaradi vdihavanja, zaužitja, stika s kožo in z očmi. Uporabljajte zaščitno opremo, vključno z zaščito za oči, rokavicami in laboratorijsko haljo, glede na tveganje izpostavljenosti. Uporabljene reagente obravnavajte kot kemične odpadke in jih zavržite v skladu z veljavnimi regijskimi, nacionalnimi in lokalnimi zakoni in uredbami. Za dodatne informacije o varovanju okolja in zdravja ter zagotavljanju varnosti glejte varnostne liste (SDS) na spletnem mestu [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- O resnih zapletih, povezanih s tem izdelkom, takoj poročajte družbi Illumina in pristojnim organom držav članic, v katerih prebivata uporabnik in bolnik.
- Z vsemi vzorci krvi ravnajte, kot da so znani povzročitelji okužbe z virusom humane imunske pomanjkljivosti (HIV), virusom humanega hepatitisa B (HBV) in drugimi patogeni, ki se prenašajo s krvjo (univerzalni previdnostni ukrepi).

- Sprejemajte rutinske laboratorijske previdnostne ukrepe. Ne pipetirajte z usti. Ne jejte, pijte ali kadite na določenih delovnih območjih. Pri ravnanju z vzorci in reagenti v kompletu nosite rokavice za enkratno uporabo in laboratorijske plašče. Po ravnanju z vzorci in reagenti v kompletu si temeljito umijte roke.
- Za preprečitev razgradnje vzorcev ali reagentov se pred začetkom postopka prepričajte, da v prostoru ni več hlapov natrijevega hipoklorita, ki nastanejo ob čiščenju.
- Kontaminacija vzorcev z drugimi izdelki/pomnožki PCR lahko povzroči netočne in nezanesljive rezultate. V izogib kontaminaciji uporabite naslednje najboljše prakse:
  - Upoštevajte ustrezne laboratorijske prakse in laboratorijsko higieno.
  - Korake poteka dela izvajajte v ločenih namenskih prostorih za postopke pred ojačitvijo in po njej.
  - Uporabljene reagente pred čiščenjem knjižnic shranite v prostoru, namenjenem postopkom pred ojačitvijo.
  - Reagente, uporabljene v postopkih pred ojačitvijo, ločite od reagentov, uporabljenih v postopkih po ojačitvi.
  - Zagotovite, da imajo prostori, namenjeni postopkom pred ojačitvijo, in prostori, namenjeni postopkom po ojačitvi, ločeno opremo, npr. pipete, pipetne konice, vrtinčni mešalnik in centrifugo.
- Preprečite navzkrižno kontaminacijo. Med posameznimi vzorci in odmerjanjem posameznih reagentov uporabite sveže pipetne konice. Uporaba filtrirnih konic zmanjša tveganje za prenos pomnožkov in navzkrižne kontaminacije vzorcev.
  - Ko dodajate ali prenašate vzorce ali glavne mešanice reagentov, po vsakem vzorcu zamenjajte konico.
  - Ko dodajate indeksirane adapterje z večkanalno pipeto, zamenjajte konice med vsako vrstico ali vsakim stolpcem. Če uporabljate enokanalno pipeto, konico zamenjajte po vsakem vzorcu.
  - Z delovnega območja odstranite neuporabljene plošče z indeksiranimi adapterji.
- Pri korakih pranja z etanolom uporabite naslednje najboljše prakse:
  - Vselej pripravite 80-odstotni etanol. Etanol lahko absorbira vodo iz zraka, kar lahko vpliva na rezultate.
  - Med koraki postopka pranja se prepričajte, da z dna kanalov odstranite ves etanol. Ostanke etanola lahko vplivajo na rezultate.
  - Upoštevajte navedeni čas sušenja za korake dela z magnetnim stojalom, da zagotovite popolno izhlapiitev. Ostanek etanola lahko vpliva na poznejše reakcije.
- Glavne mešanice vedno pripravite pred uporabo in nikoli ne shranjujte kombiniranih delovnih raztopin.
- Če postopkov ne upoštevate v skladu z navodili za uporabo, učinkovitost Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ni zagotovljena.
- Ne uporabljajte komponent kompleta s preteklim rokom uporabnosti, navedenim na oznaki kompleta.
- Ne zamenjujte komponent iz različnih kompletov Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Ime posameznega kompleta je navedeno na njegovi oznaki.



# Postopkovne opombe

## Priporočila za vnos DNK

Protokol Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z vnosi 50–1000 ng visokokakovostne dvoverižne genomske DNK (gDNK).

Prepričajte se, da začetni vzorec gDNK ne vsebuje > 1 mM EDTA in da ne vsebuje organskih onesnaževalcev, kot sta fenol in etanol. Te snovi lahko zmotijo reakcijo tagmetacije in onemogočijo uspešno izvedbo testa.

### Vnos gDNK $\geq$ 50 ng

Vnosi gDNK 50–1000 ng ne zahtevajo kvantifikacije in normalizacije začetnega vzorca gDNK.

### Vnos gDNK < 50 ng

Vnosi 10–50 ng DNK se lahko uporabijo z naslednjimi prilagoditvami:

- Če vnašate 10–49 ng gDNK, priporočamo kvantifikacijo začetnega vzorca gDNK za določitev števila ciklov PCR, potrebnih po tagmentaciji. Uporabite fluorometrično metodo za kvantifikacijo vnosa dvoverižne gDNK. Izogibajte se metodam za merjenje skupne količine nukleinske kisline, kot so NanoDrop ali druge metode absorpcije UV.
- Ta protokol ne normalizira končnih donosov predhodno obogatenih knjižnic iz 10–49 ng gDNK, zaradi česar sta pred in po obogatitvi potrebni kvantifikacija in normalizacija knjižnic.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je bil opredeljen in preverjen za vnos 50–1000 ng DNK. Enakovredne učinkovitosti delovanja izdelka ni mogoče zagotoviti za vnose gDNK < 50 ng.

## Priporočila za vnos krvi

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z gDNK, ekstrahirano iz periferne polne krvi. Uporabite lahko katero koli potrjeno metodo ekstrakcije. Pri pridobivanju gDNK iz polne krvi začetna kvantifikacija vhodne DNK ni potrebna, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit pa zagotavlja normalizirane predhodno obogatene donose knjižnic.

Naslednji dejavniki lahko negativno vplivajo na količino DNK, pridobljene iz vzorcev polne krvi, in s tem normalizacijo knjižnic:

- Starost vzorca krvi
- Pogoji shranjevanja
- Osnovna zdravstvena stanja, ki vplivajo na število belih krvnih celic

## Priporočila za vnos vzorca tkiva FFPE

Za določitev ustreznega vnosa za uspešno pripravo knjižnic uporabite naslednja merila kakovosti DNK iz FFPE:

- Za vzorce FFPE z vrednostjo  $\Delta Cq \leq 5$  je priporočen vnos 50–1000 ng DNK.
- Uporabo Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ne priporočamo za vzorce FFPE slabe kakovosti z  $\Delta Cq > 5$ . Uporaba vzorcev z  $\Delta Cq > 5$  je možna, vendar pa lahko poveča možnost neuspešne priprave knjižnice ali zmanjša učinkovitost testa.

## Ekstrakcija FFPE

Uporabite metodo izolacije nukleinske kisline, ki omogoča visoke donose obnove, zmanjša porabo vzorca in ohrani celovitost vzorca. Uporabite lahko katero koli potrjeno metodo za ekstrakcijo DNK iz vzorcev FFPE. Za gDNK, ekstrahirano iz tkiva FFPE, začetna kvantifikacija vhodne DNK ni potrebna, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit pa zagotavlja normalizirane predhodno obogatene donose knjižnic.

## Kvalifikacija DNK iz FFPE

gDNK, ekstrahirana iz tkiva FFPE, zahteva kvalifikacijo pred uporabo. Za optimalno učinkovitost delovanja ocenite kakovost vzorca DNK z uporabo validirane metode ekstrakcije za kvalifikacijo DNK, ekstrahirane iz vzorcev FFPE. Protokol Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z vzorci DNK iz FFPE z vrednostjo  $\Delta Cq \leq 5$ . Uporaba Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ni priporočljiva pri vzorcih FFPE slabe kakovosti z  $\Delta Cq > 5$ . Uporaba vzorcev z  $\Delta Cq > 5$  je možna, vendar pa lahko poveča možnost neuspešne priprave knjižnice ali zmanjša učinkovitost testa.

## [Izbirno] Referenčni vzorci FFPE

Pri izvajanju protokola uporabite označene referenčne materiale, kot je Horizon HD799 (DNK). Kot referenčne vzorce lahko uporabite tudi kvalificirane materiale FFPE iz ksenograftov iz celičnih linij. Za kvantifikacijo referenčnih materialov pred uporabo uporabite fluorometrično metodo.

**OPOMBA** Izvajanje tekov s pozitivnim kontrolnim referenčnim vzorcem ali brez kontrolne predloge poveča porabo reagentov in zmanjša skupno število neznanih vzorcev, ki jih je mogoče obdelati.

## Priporočila za vnos vzorcev

Priporočila za vnos vzorcev za Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so povzeta v naslednji preglednici.

Preglednica 1 Priporočila za vnos vzorcev

Vrsta vnesenih vzorcev	Količina vnesenih vzorcev	Kvantifikacija zahtevane količine vhodne DNK	Zahtevana kakovost vhodne DNK	Normalizirani donos predhodno obogatene knjižnice
gDNK	10–49 ng	Da	Razmerje 260/280 1,8–2,0	Ne
gDNK	50–1000 ng	Ne	Razmerje 260/280 1,8–2,0	Da
gDNK iz krvi	50–1000 ng	Ne	Razmerje 260/280 1,8–2,0	Da
gDNK iz FFPE	50–1000 ng	Da	$\Delta Cq$ vrednost $\leq 5$	Ne

Priporočeni cikli PCR za program PCR eBLTS se prilagodijo glede na koncentracijo in kakovost vhodnih vzorcev. Za več informacij glejte [Ojačitev tagmentacijske DNK na strani 29](#).

## Nasveti in tehnike

### Preprečevanje navzkrižne kontaminacije

- Ko dodajate ali prenašate vzorce, po *vsakem vzorcu* zamenjajte konico.
- Ko indeksirane adapterje dodajate z večkanalno pipeto, po *vsaki vrstici* ali *stolpcu* zamenjajte konico. Če uporabljate enokanalno pipeto, konico zamenjajte po vsakem vzorcu.

### Zatesnitev plošče

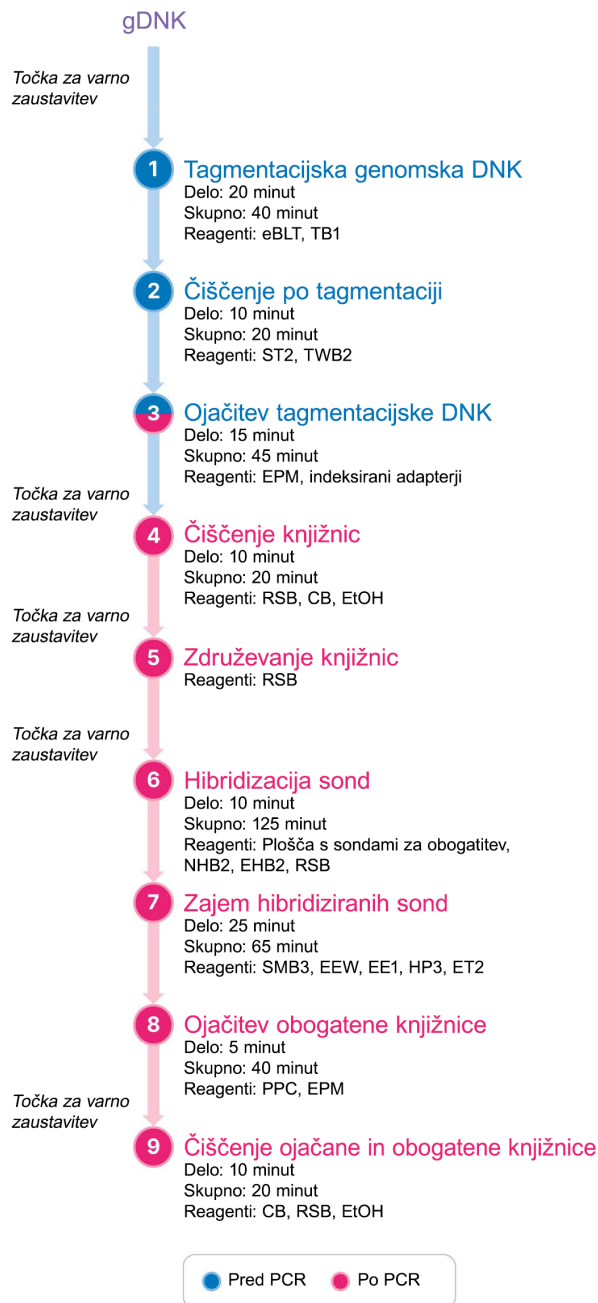
- 96-kanalno ploščo vedno zatesnite z novo samolepilno folijo, in sicer tako, da jo na ploščo s pomočjo gumijastega valjčka namestite pred naslednjimi koraki v protokolu:
  - Koraki postopka stresanja
  - Koraki postopka inkubacije Če plošče ne zatesnite pravilno, lahko med inkubacijo pride do izhlapevanja.
  - Koraki postopka centrifugiranja
  - Koraki postopka hibridizacije
- Prepričajte se, da so robovi in kanali popolnoma zatesnjeni, da zmanjšate tveganje za navzkrižno kontaminacijo in izhlapevanje.
  - Če na foliji ali stranskem delu kanalov plošče opazite tekočino ali kondenzacijo, ploščo pred odprtjem po potrebi centrifugirajte.
- Ploščo postavite na ravno površino in z nje počasi odstranite folijo.

**Rokovanje z Enrichment BLT Small (eBLTS)**

- Matično epruveto eBLTS v hladilniku hranite v pokončnem položaju tako, da so kroglice vedno potopljene v pufri.
- Matično epruveto eBLTS tik pred uporabo temeljito vrtinčite, da se kroglice resuspendirajo. V izogib premiku kroglic centrifugiranje pred pipetiranjem ni priporočljivo.
- Če se kroglice držijo stranskega dela ali vrha 96-kanalne plošče, 3 sekunde centrifugirajte pri 280 × g in nato pipetirajte, da se resuspendirajo.
- Pri pranju eBLTS:
  - Za ploščo uporabite ustrezno magnetno stojalo.
  - Ploščo hranite na magnetnem stojalu, dokler navodila ne zahtevajo, da jo odstranite.
  - Če se kroglice aspirirajo v pipetne konice, jih vrnite v ploščo na magnetnem stojalu in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).

# Potek dela z Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Naslednji diagram ponazarja potek dela z Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Med koraki so označene točke za varno zaustavitev. Časovne ocene temeljijo na obdelavi 12 vzorcev ob 12-pleksni obogatitvi.



# Navodila za uporabo

To poglavje opisuje protokol Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Preglejte celotni načrtovani potek dela sekvenciranja, od vzorcev do analize, da zagotovite združljivost izdelkov in eksperimentalnih parametrov.
- Pred nadaljevanjem potrdite vsebino kompleta in se prepričajte, da imate vse potrebne komponente, opremo in materiale.
  - Biotinilirane sonde tretjih strank morajo izpolnjevati posebne zahteve. Če se želite prepričati, da vaše sonde tretjih strank izpolnjujejo zahteve, glejte [Zahteve za plošče s sondami za obogatitev na strani 11](#).
- Sledite protokolu v prikazanem vrstnem redu, pri čemer upoštevajte navedene volumne in inkubacijske parametre.
- Če v protokolu ni navedena točka za varno zaustavitev, takoj nadaljujte z naslednjim korakom.
- Pri ustvarjanju glavne mešanice upoštevajte, da je v navedenih volumnih vključen presežek.
- Prepričajte se, da uporabljate ustrezno magnetno stojalo za vašo vrsto plošče.

## Priprava na združevanje

Ta korak je potreben za zagotovitev uspešnega sekvenciranja obogatenih knjižnic. Združevanje knjižnic se lahko izvede pred obogatitvijo in pred sekvenciranjem.

**Pred obogatitvijo** – Posamezne indeksirane ojačane knjižnice se združijo za obogatitev z izbrano ploščo s sondami. S tem se ustvari multipleksna zbirka obogatenih knjižnic. Za vnos vzorca FFPE je bila obdelava testirana, pri čemer se priporoča izključno za enopleksne reakcije obogatitve. Za visokokakovostno gDNK je bila testirana 12-pleksna obogatitev, vendar je mogoča 2- do 11-pleksna obogatitev.

**Pred sekvenciranjem** – 1-pleksno obogatene knjižnice in/ali multipleksno obogatene knjižnice se združijo pred sekvenciranjem. Število obogatenih knjižnic, ki jih je mogoče sekvencirati, je odvisno od globine ciljnega odčitavanja za vsak vzorec izbranega sistema za sekvenciranje.

## Enolično dvojno indeksiranje

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit uporablja enolične dvojne indekse.

- Dvojno indeksirane knjižnice dodajo sekvence indeksa 1 (i7) in indeksa 2 (i5), s čimer ustvarijo enolično označene knjižnice.
- Indeksi UD imajo različne, nepovezane sekvence indeksov za odčitavanja indeksov i7 in i5. Indeksi so dolgi 10 baz.

Izbira indeksiranih adapterjev z različnimi sekvencami za združene knjižnice optimizira barvno uravnoteženost za uspešno sekvenciranje in analizo podatkov. Zbirke, ki so  $\geq 10$ -pleksne, so inherentno barvno uravnotežene,

zaradi česar lahko uporabite katero koli kombinacijo indeksiranih adapterjev. Med izvajanjem sekvenciranja modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager ponudi možnosti za barvno uravnotežene kombinacije indeksov in vas obvesti, če izbrane kombinacije indeksov niso dovolj raznolike.

Za informacije o sekvencah UD indeksiranih adapterjev Illumina in postavitvi plošč glejte [Dodatek: Sekvence indeksiranih adapterjev UD družbe Illumina na strani 64](#)

## Podprte pleksnosti za obogatitev

Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so konfigurirani in testirani za 1- in 12-pleksno obogatitev. Čeprav so možne tudi druge pleksnosti obogatitve, pa nekatere pleksnosti pred obogatitvijo zahtevajo dodatno pripravo knjižnic in dodatne reagentne na plošči sonde za obogatitev.

Za pridobitev ustreznega donosa obogatitve za nestandardno pleksnost obogatitve je lahko potrebna dodatna optimizacija. Optimalni rezultati niso zagotovljeni.

- **Pleksnost obogatitve** – Število predhodno obogatenih knjižnic (1–12), združenih v eno reakcijo obogatitve za hibridizacijo s ploščami s sondami za obogatitev. Na primer: če združite 12 predhodno obogatenih knjižnic, lahko ustvarite 12-pleksno zbirko za obogatitev.
- **Reakcija obogatitve** – Število enoličnih preparatov za reakcijo obogatitve, ne glede na število predhodno obogatenih knjižnic, zbranih s posamezno reakcijo. Na primer: z eno reakcijo obogatitve lahko pripravite 1- ali 12-pleksno zbirko za obogatitev.

Za izračun skupnega števila naknadno obogatenih knjižnic pleksnost obogatitve na reakcijo pomnožite s številom reakcij obogatitve. Na primer: z eno reakcijo obogatitve 12-pleksne zbirke za obogatitev lahko pridobite zbirko 12 naknadno obogatenih knjižnic.

Pri združevanju predhodno obogatenih knjižnic reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit podpirajo naslednje reakcije obogatitve in pleksnost.

Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Reakcije obogatitve	Pleksnost obogatitve
Komplet s 16 vzorci	16 reakcij	1-pleksno
Komplet s 96 vzorci	8 reakcij	12-pleksno

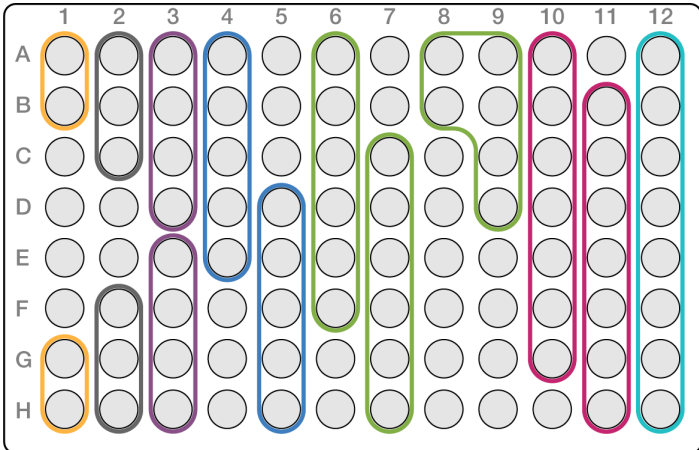
## Strategije združevanja 2- do 8-pleksnih adapterjev

V spodnji preglednici so prikazani indeksirani adapterji (kanali), ki jih je mogoče združiti v 2–8-pleksne zbirke, barvno kodirana slika pa ponazarja posamezne kombinacije.

Združite lahko adapterje s poljubno pleksnostjo  $\geq 2$  z vrha ali dna stolpca. Adapterjev ne združujte po vrsticah.

Pleksnost	Kombinacije	Barva na sliki
2	Prva dva ali zadnja dva kanala v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A in B</li> <li>• G in H</li> </ul> Vrstice C–F se ne uporabljajo.	Oranžna
3	Prvi trije ali zadnji trije kanali v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–C</li> <li>• F–H</li> </ul> Vrstici D in E se ne uporabljata.	Siva
4	Prvi štirje ali zadnji štirje kanali v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–D</li> <li>• E–H</li> </ul>	Vijolična
5	Prvih pet ali zadnjih pet kanalov v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–E</li> <li>• D–H</li> </ul>	Modra
6	[Možnost 1] Prvih šest ali zadnjih šest kanalov v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–F</li> <li>• C–H</li> </ul> [Možnost 2] Prva dva kanala (A in B) ali zadnja dva kanala (G in H) v enem stolpcu in kateri koli štirje kanali v sosednjem stolpcu.	Zelena
7	Prvih sedem ali zadnjih sedem kanalov v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–G</li> <li>• B–H</li> </ul>	Rožnata
8	Celotni stolpec.	Turkizna



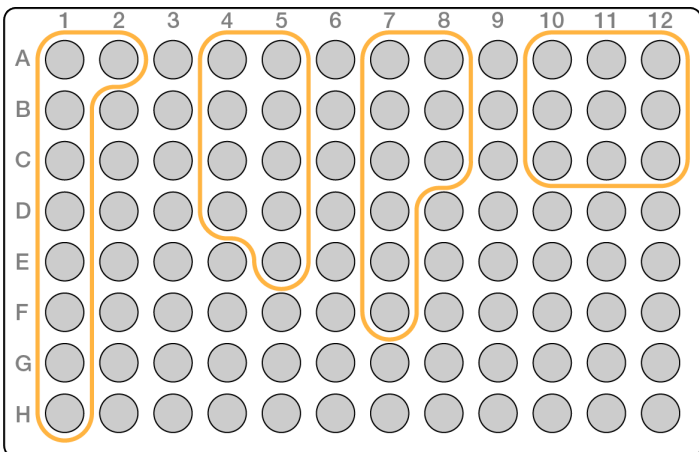


## Strategije združevanja 9-pleksnih adapterjev

Uporabite indeksirane adapterje iz vseh kanalov, ki optimizirajo barvno uravnoteženost pri sekvenciranju, na primer:

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

Naslednja slika prikazuje vse štiri primere.



## Tagmentacijska genomska DNK

Ta korak uporablja Enrichment BLT Small (eBLTS) za tagmentacijo DNK, ki je postopek za fragmentacijo in označevanje DNK z adapterskimi sekvencami.

## Potrošni material

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (rumen pokrovček)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Voda brez nukleaze
- 96-kanalna PCR-plošča
- Samolepilna folija
- 1,7-mililitrske mikrocentrifugirke
- Niz 8 epruвет
- Pipetne konice
  - 200-mikrolitrске večkanalne pipete



### OPOZORILO

**Ta nabor reagentov vsebuje kemikalije, ki so lahko nevarne. Do telesnih poškodb lahko pride zaradi vdihavanja, zaužitja, stika s kožo in z očmi. Uporabljajte zaščitno opremo, vključno z zaščito za oči, rokavicami in laboratorijsko haljo, glede na tveganje izpostavljenosti. Uporabljene reagente obravnavajte kot kemične odpadke in jih zavržite v skladu z veljavnimi regijskimi, nacionalnimi in lokalnimi zakoni in uredbami. Za dodatne informacije o varovanju okolja in zdravja ter zagotavljanju varnosti glejte varnostne liste (SDS) na spletnem mestu [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**

## O reagentih

- eBLTS shranjujte pri temperaturah od 2 °C do 8 °C. Ne uporabljajte eBLTS, ki je bil shranjen pri temperaturi pod 2 °C.
- eBLTS ne centrifugirajte.

## Priprava

1. Pripravite naslednji potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
eBLTS (rumen pokrovček)	Od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo. Tik pred uporabo premešajte z vrtinčenjem. Pred pipetiranjem ne centrifugirajte.
TB1	Od -25 °C do -15 °C	Segrejte na sobno temperaturo. Premešajte z vrtinčenjem.

2. DNK vrtinčite ali pipetirajte ter jo na kratko centrifugirajte.
3. Na cikličnem termostatu shranite naslednji program TAG:
  - Izberite možnost predgretja pokrova in temperaturo nastavite na 100 °C

- Volumen reakcije nastavite na 50 µl
- 5 minut pri 55 °C
- Ohranite na temperaturi 10 °C

## Postopek

1. 2–30 µl DNK dodajte v vsakega od kanalov 96-kanalne PCR-plošče, tako da je skupna vhodna količina 50–1000 ng.  
Če je volumen DNK < 30 µl, v vzorce DNK dodajte vodo brez nukleaze, s čimer bo skupni volumen 30 µl.
2. Temeljito vrtinčite eBLTS, da se kroglice v celoti resuspendirajo.
3. Za pripravo glavne mešanice za tagmentacijo v epruveti združite naslednje volumne. Vsak volumen pomnožite s številom obdelanih vzorcev.
  - eBLTS (11,5 µl)
  - TB1 (11,5 µl)Presežek reagenta je vključen v volumen.
4. Temeljito premešajte glavno mešanico za tagmentacijo.
5. Volumen glavne mešanice za tagmentacijo enakomerno razdelite v niz 8 epruвет.
6. Z 200-mikrolitrsko večkanalno pipeto prenesite 20 µl glavne mešanice za tagmentacijo v vsak kanal PCR-plošče z vzorcem. Za vsak stolpec ali vrstico vzorcev uporabite svežo konico.
7. Po razdelitvi glavne mešanice za tagmentacijo zavržite niz 8 epruвет.
8. Z 200-mikrolitrsko večkanalno pipeto, nastavljeno na 40 µl, vsak vzorec premešajte tako, da ga 10-krat pipetirate. Za vsak stolpec vzorcev uporabite svežo konico.  
Namesto tega lahko zatesnite PCR-ploščo in jo na stresalniku 1 minuto stresate pri 1600 vrt./min.
9. Ploščo zatesnite in jo namestite na vnaprej programirani ciklični termostat ter zaženite program TAG.
10. Počakajte, da program TAG doseže fiksno temperaturo 10 °C, nakar ploščo takoj odstranite.
11. 96-kanalno PCR-ploščo 2 minuti pustite na sobni temperaturi ter nadaljujte z naslednjim korakom.

## Čiščenje po tagmentaciji

Ta korak opere DNK z adapterjem na eBLTS pred ojačanjem s PCR.

### Potrošni material

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- Magnetno stojalo za 96-kanalno PCR-ploščo
- Samolepilna folija
- Niz 8 epruвет

- Pipetne konice
  - 20-mikrolitrške večkanalne pipete
  - 200-mikrolitrške večkanalne pipete
- Pripravite se na poznejši postopek:
  - EPM (Enhanced PCR Mix)
  - Plošča z indeksiranimi adapterji

## O reagentih

- Prepričajte se, da uporabljate ustrezno magnetno stojalo za vašo ploščo. Če za PCR-ploščo uporabite magnetno stojalo za MIDI-plošče, lahko onemogočite lepljenje TWB2 na kroglice.
- TWB2 pipetirajte počasi, da zmanjšate penjenje in s tem preprečite nepravilno aspiracijo volumna in nepopolno mešanje.

## Priprava

1. Pripravite naslednji potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
EPM	Od -25 °C do -15 °C	Na ledu odmrzujte 1 uro. Premešajte z obračanjem ter na kratko centrifugirajte.
ST2	Od 15 °C do 30 °C	Če opazite oborine, 10 minut segrevajte pri 37 °C in nato vrtinčite, dokler se oborine ne raztopijo. Uporabite pri sobni temperaturi.
TWB2	Od 15 °C do 30 °C	Uporabite pri sobni temperaturi.
Plošča z indeksiranimi adapterji	Od -25 °C do -15 °C	30 minut odmrzujte pri sobni temperaturi.

## Postopek

1. Dodajte 10 µl ST2 v vsako reakcijo tagmentacije. Če uporabljate večkanalno pipeto, pipetirajte ST2 v niz 8 epruвет in nato ustrezne količine prenesite na PCR-ploščo. Za vsak stolpec ali vrstico vzorcev uporabite svežo konico.
2. Z 200-mikrolitrško pipeto, nastavljeno na 50 µl, vsak kanal 10-krat počasi pipetirajte, da se kroglice resuspendirajo.  
Namesto tega lahko tudi zatesnite ploščo in jo 1 minuto stresate pri 1600 vrt./min. Po potrebi ponovite.
3. Zatesnite ploščo z vzorci in jo 10 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
4. Pri sobni temperaturi inkubirajte 5 minut.
5. PCR-ploščo postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (3 minute).

6. [ $\leq$  48 vzorcev] Trikrat operite, kot sledi.
  - a. Z 200-mikrolitrsko multikanalno pipeto, nastavljeno na 60  $\mu$ l, odstranite in zavržite supernatant, pri čemer se ne dotikajte kroglic.
  - b. Ploščo odstranite z magnetnega stojala.
  - c. Takoj zatem počasi dodajte 100  $\mu$ l TWB2 neposredno na kroglice.
  - d. Pipetirajte počasi, da se kroglice v celoti resuspendirajo. Namesto tega lahko tudi zatesnite ploščo in jo 1 minuto stresate pri 1600 vrt./min.
  - e. V primeru brizganja 10 sekund centrifugirajte pri 280  $\times$  g.
  - f. PCR-ploščo postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (3 minute). Ploščo pustite na magnetnem stojalu in TWB2 v kanalih, da preprečite prekomerno sušenje pri tretjem pranju. Po pripravi glavne mešanice PCR Master Mix odstranite in zavržite supernatant.
  - g. Z 200-mikrolitrsko multikanalno pipeto, nastavljeno na 100  $\mu$ l, odstranite in zavržite supernatant.
  - h. Dvakrat ponovite korake c–f za skupno tri pranja.
7. [ $>$  48 vzorcev] Trikrat operite, kot sledi.
  - a. Izvedite koraka b in c v korakih po 1 ali 2 stolpca, dokler ne obdelate vseh stolpcev (s tem preprečite prekomerno sušenje).
  - b. Z 200-mikrolitrsko multikanalno pipeto, nastavljeno na 60  $\mu$ l, odstranite in zavržite supernatant.
  - c. Ploščo odstranite z magnetnega stojala.
  - d. Takoj zatem počasi dodajte 100  $\mu$ l TWB2 neposredno na kroglice.
  - e. Pipetirajte počasi, da se kroglice v celoti resuspendirajo. Namesto tega lahko tudi zatesnite ploščo in jo 1 minuto stresate pri 1600 vrt./min.
  - f. V primeru brizganja 10 sekund centrifugirajte pri 280  $\times$  g.
  - g. PCR-ploščo postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (3 minute). Ploščo pustite na magnetnem stojalu in TWB2 v kanalih, da preprečite prekomerno sušenje pri tretjem pranju. Po pripravi glavne mešanice PCR Master Mix odstranite in zavržite supernatant.
  - h. Z 200-mikrolitrsko multikanalno pipeto, nastavljeno na 100  $\mu$ l, odstranite in zavržite supernatant.
  - i. Odstranite z magnetnega stojala in počasi dodajte 100  $\mu$ l TWB2 neposredno na kroglice.
  - j. Ponovite koraka h in i v korakih po 1 ali 2 stolpca, dokler ne obdelate vseh stolpcev.
  - k. Dvakrat ponovite korake e–h za skupno tri pranja.
8. Držite magnetno stojalo do koraka 4 v razdelku *Postopek* poglavja *Ojačitev tagmentirane DNK*. TWB2 ostane v kanalih, kar prepreči prekomerno sušenje kroglic.

## Ojačitev tagmentacijske DNK

Ta korak ojača tagmentacijsko DNK s pomočjo programa PCR z omejenim ciklom. Korak PCR doda adapterje z indeksom 1 (i7), adapterje z indeksom 2 (i5) in sekvence, potrebne za oblikovanje gruč za sekvenciranje.

## Potrošni material

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Plošča z indeksiranimi adapterji
- 96-kanalna PCR-plošča
- Voda brez nukleaze
- Samolepilna folija
- 1,5-mililitrske mikrocentrifugirke
- Pipetne konice
  - 20-mikrolitrskve večkanalne pipete
  - 200-mikrolitrskve večkanalne pipete

## O reagentih

- Plošče z indeksiranimi adapterji
  - Kanal lahko vsebuje > 10 µl indeksiranih adapterjev.
  - Ploščam z indeksiranimi adapterji ne dodajajte vzorcev.
  - Vsak kanal indeksirane plošče je samo za enkratno uporabo.

## Priprava

1. Pripravite naslednji potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
EPM	Od -25 °C do -15 °C	1 uro odmrzujte pri temperaturi 4 °C ali na ledu. Premešajte z obračanjem ter na kratko centrifugirajte.
Plošča z indeksiranimi adapterji	Od -25 °C do -15 °C	30 minut odmrzujte pri sobni temperaturi.

2. Na ciklični termostat shranite naslednji program eBLTS PCR z ustreznim številom ciklov PCR, navedenih v spodnji preglednici.

- Izberite možnost predgretja pokrova in temperaturo nastavite na 100 °C.
- Volumen reakcije nastavite na 50 µl.
- 72 °C za 3 minute
- 98 °C za 3 minute
- X ciklov:
  - 98 °C za 20 sekund
  - 60 °C za 30 sekund
  - 72 °C za 1 minuto
- 72 °C za 3 minute
- Ohranite na temperaturi 10 °C.

Skupni čas delovanja je ~38 minut za 9 ciklov in ~46 minut za 12 ciklov.

Vrsta vnesenih vzorcev	Število ciklov PCR (X)
10–49 ng gDNK	12
50–1000 ng gDNK	9
50–1000 ng gDNK, ekstrahirane iz FFPE	12
gDNK, ekstrahirana iz krvi	9

## Postopek

1. Združite naslednje reagente za pripravo glavne mešanice PCR Master Mix. Vsak volumen pomnožite s številom obdelanih vzorcev.
  - EPM (23 µl)
  - Voda brez nukleaze (23 µl)
 Presežek reagenta je vključen v volumen.
2. Glavno mešanico PCR Master Mix premešajte tako, da jo 10-krat pipetirate, ter jo na kratko centrifugirajte.
3. Ko ploščo namestite na magnetno stojalo, z 200-mikrolitrsko večkanalno pipeto odstranite in zavrzite TWB2. Pena, ki ostane na stenah kanalov, knjižnicam ne škoduje.
4. Ploščo odstranite z magnetnega stojala.
5. 40 µl glavne mešanice PCR Master Mix takoj dodajte neposredno na kroglice v vsakem kanalu.
6. Takoj premešajte s pipetiranjem, da se kroglice v celoti resuspendirajo. Namesto tega lahko tudi zatesnite ploščo in jo 1 minuto stresate pri 1600 vrt./min.

7. Zatesnite ploščo z vzorci in jo 10 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
8. Ploščo z indeksiranimi adapterji 1 minuto centrifugirajte pri 1000 × g.
9. Pripravite ploščo z indeksiranimi adapterji.
  - [< 96 vzorcev] Folijo na plošči z indeksiranimi adapterji prebodite s svežo pipetno konico za vsak kanal, in sicer samo za število obdelanih vzorcev.
  - [96 vzorcev] Novo PCR-ploščo z delno podlago poravnajte nad ploščo z indeksiranimi adapterji in pritisnite navzdol, da prebodete folijo. Zavržite PCR-ploščo, s katero ste prebodli folijo.
10. Z novo pipetno konico v vsak kanal dodajte 10 µl vnaprej parjenih indeksiranih adapterjev.
11. 10-krat premešajte s 40-mikrolitrsko pipeto. Namesto tega lahko tudi zatesnite ploščo in jo 1 minuto stresate pri 1600 vrt./min.
12. Zatesnite ploščo in jo 10 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
13. Postavite jo na ciklični termostat in zaženite program eBLTS PCR.

#### TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV

Če ustavite potek dela, lahko reagent pri temperaturi od -25 °C do -15 °C hranite največ 30 dni.

## Čiščenje knjižnic

Ta korak uporablja dvostranski postopek čiščenja kroglic za čiščenje ojačanih knjižnic.

#### Potrošni material

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Sveže pripravljen 80-odstotni etanol (EtOH)
- 96-kanalna 0,8-mililitrska globoka polipropilenska plošča (MIDI-plošča)
- 96-kanalna PCR-plošča
- Magnetno stojalo za MIDI-ploščo
- Magnetno stojalo za PCR-ploščo
- 1,5-mililitrske mikrocentrifugirke
- Voda brez nukleaze

#### O reagentih

- Cleanup Beads
  - Vrtinčite pred vsako uporabo.
  - S pogostim vrtinčenjem zagotovite, da se kroglice enakomerno porazdelijo.
  - Reagent počasi porazdelite z aspiracijo, saj je raztopina viskozna.



## Priprava

1. Pripravite naslednji potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
CB	Sobna temperatura	Mešajte z vrtinčenjem in obračanjem, dokler tekočina ne postane homogena barve.
RSB	Od 2 °C do 8 °C	30 minut odmrzujte pri sobni temperaturi. Premešajte z vrtinčenjem.

## Postopek

1. 96-kanalno PCR-ploščo 1 minuto stresajte pri 1800 vrt./min in jo na kratko centrifugirajte.
2. PCR-ploščo postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (1 minuto).
3. CB 3-krat vrtinčite po 10 sekund, nato pa reagent večkrat obrnite, da se resuspendira.
4. Za visokokakovostno gDNK sledite naslednjim korakom.
  - a. 77 µl vode brez nukleaze dodajte v vsak kanal nove MIDI-plošče.
  - b. Dodajte 88 µl CB v vsak kanal MIDI-plošče.
  - c. 45 µl supernatanta iz vsakega kanala PCR-plošče prenesite v ustrezni kanal MIDI-plošče.
  - d. Zavrzite PCR-ploščo.
  - e. Vsak kanal 10-krat temeljito premešajte s pipeto. Namesto tega lahko tudi zatesnite ploščo in jo 1 minuto stresate pri 1800 vrt./min.
  - f. Ploščo zatesnite in jo 5 minut inkubirajte pri sobni temperaturi.
  - g. Prepričajte se, da v njej ni zračnih mehurčkov. Če opazite mehurčke, obrnite ploščo.
  - h. MIDI-ploščo postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (5 minut).
  - i. Med inkubacijo temeljito vrtinčite CB, nato pa v vsak kanal *nove* MIDI-plošče dodajte 20 µl reagenta.
  - j. 200 µl supernatanta iz vsakega kanala prve MIDI-plošče prenesite v ustrezni kanal nove MIDI-plošče (z 20 µl CB).
  - k. Zavrzite prvo MIDI-ploščo.
  - l. S pipeto 10-krat premešajte reagent v vsakem kanalu nove MIDI-plošče. Namesto tega lahko tudi zatesnite ploščo in jo 1 minuto stresate pri 1800 vrt./min.
5. Za ekstrahirano FFPE sledite naslednjim korakom.
  - a. Dodajte 81 µl CB v vsak kanal nove MIDI-plošče.
  - b. 45 µl supernatanta iz vsakega kanala PCR-plošče prenesite v ustrezni kanal MIDI-plošče.
  - c. Zavrzite PCR-ploščo.
  - d. Vsak kanal 10-krat temeljito premešajte s pipeto. Namesto tega lahko tudi zatesnite ploščo in jo 1 minuto stresate pri 1800 vrt./min.
6. Pri sobni temperaturi inkubirajte 5 minut.
7. Prepričajte se, da v njej ni zračnih mehurčkov. Če opazite mehurčke, obrnite ploščo.

8. MIDI-ploščo postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (5 minut).
9. Odstranite in zavržite supernatant, pri čemer se ne dotikajte kroglic.
10. Kroglice operite na naslednji način.
  - a. Ko je plošča na magnetnem stojalu, brez mešanja dodajte 200 µl svežega 80-odstotnega EtOH.
  - b. Inkubirajte 30 sekund.
  - c. Odstranite in zavržite supernatant, pri čemer se ne dotikajte kroglic.
11. **Ponovno** operite kroglice (drugič).
12. Na magnetnem stojalu na zraku sušite 5 minut.
13. Med sušenjem na zraku z 20-mikrolitrsko pipeto odstranite in zavržite odvečni EtOH.
14. Ploščo odstranite z magnetnega stojala.
15. Kroglicam dodajte 17 µl RSB.
16. Zatesnite ploščo in jo 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
17. Pri sobni temperaturi inkubirajte 2 minuti.
18. Prepričajte se, da v njej ni zračnih mehurčkov. Če opazite mehurčke, obrnite ploščo.
19. Ploščo postavite na magnetno stojalo za MIDI-ploščo in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).
20. 15 µl supernatanta prenesite na novo 96-kanalno PCR-ploščo.

#### **TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV**

Če ustavite potek dela, zatesnite ploščo in jo pri temperaturi od -25 °C do -15 °C hranite največ 30 dni.

## **Združevanje predhodno obogatenih knjižnic**

Ta korak omogoča združitev knjižnic DNK z enoličnimi indeksi v eno zbirko, ki vsebuje do 12 knjižnic.

## Metode združevanja

Knjižnice lahko združite glede na volumen ali maso. S spodnjo preglednico določite ustrezno metodo za vnos.

Preglednica 2 Priporočene metode združevanja

Vnos vzorca	Metoda združevanja
10–49 ng gDNK	Masa
50–1000 ng gDNK	Volumen
gDNAK, ekstrahirana iz FFPE	Masa
gDNK, ekstrahirana iz krvi	Volumen

- Enopleksna obogatitev ne zahteva združevanja vnaprej obogatenih knjižnic, vendar pa boste morda morali dodati RSB.
- Po kvantifikaciji predhodno obogatenih knjižnic lahko vse tipe vhodnih vzorcev združite glede na maso, da dosežete optimalno ravnovesje indeksov.
- Končni donos predhodno obogatenih knjižnic, ustvarjenih v ločenih eksperimentalnih pripravah, se lahko razlikuje. Zato priporočamo združevanje glede na maso, saj lahko tako dosežete optimalno ravnovesje indeksov.
- Enopleksno obogatitev izberite za naslednje situacije.
  - 10–49 ng gDNK
  - 50–1000 ng gDNK, ekstrahirane iz FFPE
  - Nizka frekvenca zaznavanja manjših alelov za izpis somatske variante

## Združevanje glede na maso

V naslednjih primerih knjižnice kvantificirajte za uporabo mase DNK na knjižnico za obogatitev, kot je navedeno v razdelku [Predhodno obogatene knjižnice pri enaki koncentraciji na strani 36](#).

- Vnos vzorca z 10–49 ng gDNK
- Vnos vzorca s 50–1000 ng gDNK, ekstrahirane iz FFPE
- Nizka frekvenca zaznavanja manjših alelov za izpis somatske variante
- gDNK, ekstrahirana iz krvi za optimalno ravnovesje indeksov

## Kvantifikacija predhodno obogatenih knjižnic

- Izvedite tek 1 µl predhodno obogatenih knjižnic z izbrano kvantifikacijsko metodo na podlagi fluorescence, ki uporablja interkalacijsko barvilo dsDNK.
  - Za 50–1000 ng visokokakovostne gDNK pričakujte  $\geq 500$  ng donos predhodno obogatenih knjižnic.
  - Za 50–1000 ng gDNK, ekstrahirane iz FFPE, pričakujte 500–6000 ng donos predhodno obogatenih knjižnic, odvisno od kakovosti začetnega vzorca.

**OPOMBA** Za kvantifikacijske metode z različnimi odstopenji kvalificirajte kvantifikacijsko metodo za ta potek dela. Rezultati koncentracije se lahko razlikujejo glede na uporabljeno metodo.

## Predhodno obogatene knjižnice pri enaki koncentraciji

Z naslednjo preglednico določite maso DNK na knjižnico, potrebno za obogatitev, glede na vrsto vzorca in pleksnost obogatitve. Optimalni donos obogatitve in učinkovitost testa ob uporabi nižjih donosov predhodno obogatenih knjižnic, kot je priporočeno, nista zagotovljena.

Skupna masa DNK v reakciji obogatitve ne sme presegati 6000 ng.

Vnos vzorca	Pleksnost obogatitve	Masa DNK na knjižnico (ng)	Skupna masa DNK v knjižnicah (ng)
Visokokakovostna gDNK	12	250–500	3000–6000
gDNAK, ekstrahirana iz FFPE	1	200	200

- Zabeležite indekse za knjižnice, ki jih nameravate združiti v tem koraku.
- Na podlagi koncentracije vsake knjižnice izračunajte volumen, ki ga morate dodati reakciji obogatitve, da dosežete zahtevano maso DNK.
  - Visokokakovostna gDNK: Izračunajte količino knjižnic, ki je potrebna za vnos 250–500 ng.
  - gDNAK, ekstrahirana iz FFPE: Izračunajte količino knjižnic, ki je potrebna za vnos 200 ng.
- Izračunani volumen za vsako knjižnico dodajte v isti kanal PCR-plošče.
- Če uporabljate visokokakovostno gDNK, na podlagi skupnega volumna združenih predhodno obogatenih knjižnic izvedite enega od naslednjih korakov:
  - Če je volumen predhodno obogatenih knjižnic = 30 µl, nadaljujte s [Hibridizacija sond na strani 38](#).
  - Če je volumen predhodno obogatenih knjižnic < 30 µl, dodajte RSB, da dosežete skupni volumen 30 µl.
  - Če je volumen predhodno obogatenih knjižnic > 30 µl, uporabite metodo na osnovi kroglic ali vakuumskega koncentratore za koncentracijo združenega vzorca. V koncentrirani združeni vzorec dodajte RSB, da dosežete skupni volumen 30 µl.
- Če uporabljate gDNK, ekstrahirano iz FFPE, na podlagi skupnega volumna združenih predhodno obogatenih knjižnic izvedite enega od naslednjih korakov:
  - Če je volumen predhodno obogatenih knjižnic = 7,5 µl, nadaljujte s [Hibridizacija sond na strani 38](#).

- Če je volumen predhodno obogatenih knjižnic < 7,5 µl, dodajte RSB, da dosežete skupni volumen 7,5 µl.

#### TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV

Če ustavite potek dela, zatesnite ploščo in jo pri temperaturi od -25 °C do -15 °C hranite največ 30 dni.

#### Združevanje glede na volumen

Ob vnosu 50–1000 ng gDNK kvantifikacija in normalizacija posameznih knjižnic, ustvarjenih v istem eksperimentu, nista potrebni.

Za optimalno delovanje združite samo predhodno obogatene vzorce knjižnic z istim uporabnikom, serijo reagenta in ploščo z indeksiranimi adapterji.

1. Zabeležite indekse za knjižnice, ki jih nameravate združiti v tem koraku.
2. Naslednjo predhodno obogateno knjižnico in volumne RSB za pleksnost vaše obogatitve združite v istem kanalu nove PCR-plošče.

Nastali volumen je 30 µl.

Pleksnost obogatitve*	Volumen vsake predhodno obogatene knjižnice (µl)	Volumen RSB (µl)
1-pleksno	14	16
2-pleksno	14	2
3-pleksno	10	0
4-pleksno	7,5	0
5-pleksno	6	0
6-pleksno	5	0
7-pleksno	4,2	0,6
8-pleksno	3,7	0,4
9-pleksno	3,3	0,3
10-pleksno	3	0
11-pleksno	2,7	0,3
12-pleksno	2,5	0

\*Za informacije o nestandardnih pleksnostih (od 2- do 11-pleksno) glejte [Omejitve postopka na strani 2](#).

#### TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV

Če ustavite potek dela, zatesnite ploščo in jo pri temperaturi od -25 °C do -15 °C hranite največ 30 dni.

## [Izbirno] Kvalifikacija predhodno obogatenih knjižnic

Pri združevanju glede na volumen za kvantifikacijo predhodno obogatenih knjižnic uporabite metodo na osnovi fluorometrije, ki uporablja interkalacijsko barvilo dsDNK. Za kvalifikacijo predhodno obogatenih knjižnic uporabite analizator fragmentov DNK z ustreznim kompletom za analizo fragmentov.

Za kvalifikacijo uporabite skupno 1 µl knjižnic. Predhodno obogatene knjižnice so dovolj koncentrirane, da omogočajo majhne razredčitve za kvantifikacijo ali analizo fragmentov.

## Hibridizacija sond

Pri tem koraku se ciljne regije DNK vežejo na sonde za zajem.

Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so združljivi tako z Illumina kot z oligonukleotidnimi ploščami za obogatitev DNK tretjih strank. Za informacije o zahtevanih specifikacijah za panele tretjih strank glejte [Zahteve za plošče s sondami za obogatitev na strani 11](#).

### Potrošni material

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (modri pokrovček)
- Plošča s sondami za obogatitev
- 96-kanalna PCR-plošča
- Samolepilna folija
- Pripravite se na poznejši postopek:
  - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
  - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (rumenorjavi pokrovček)

### O reagentih

- NHB2 se med shranjevanjem obari in loči.
- Plošča s sondami za obogatitev se nanaša na izbrano oligonukleotidno ploščo za obogatitev prodajalca Illumina.

### Priprava

1. Pripravite naslednji potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
EHB2	Od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo. Premešajte z vrtinčenjem. Če opazite kristale in motnost, ponovno premešajte z vrtinčenjem ali pipetiranjem navzgor in navzdol, dokler se raztopina ne zbistri.
Plošča s sondami za obogatitev	Od -25 °C do -15 °C (Illumina)	Tako pri ploščah Illumina kot pri ploščah tretjih strank reagent ogrejte na sobno temperaturo. Premešajte z vrtinčenjem.
NHB2 (modri pokrovček)	Od -25 °C do -15 °C	Odmrznite pri sobni temperaturi. Ko reagent doseže sobno temperaturo, ga v inkubatorju za mikrovzorke ogrejte na temperaturo uporabljene sonde (5 minut). Za 10 sekund 3-krat vrtinčite pri največji hitrosti, da se reagent resuspendira. Na kratko centrifugirajte. Epruveto pipetirajte navzgor in navzdol. Če opazite kristale in motnost, ponovno premešajte z vrtinčenjem ali pipetiranjem navzgor in navzdol, dokler se raztopina ne zbistri. Reagent porabite, ko je še topel, da se izognete oborini zaradi reformiranja.
SMB3*	Od 2 °C do 8 °C	Če z naslednjim postopkom nadaljujete takoj po 90-minutnem zadržanju v programu HYB, reagent vsaj 2 uri pred začetkom programa HYB ogrejte na sobno temperaturo.
EEW* (rumenorjava epruveta)	Od -25 °C do -15 °C	Če z naslednjim postopkom nadaljujete takoj po 90-minutnem zadržanju v programu HYB, reagent vsaj 2 uri pred začetkom programa HYB ogrejte na sobno temperaturo. Ko reagent doseže sobno temperaturo, ga v inkubatorju za mikrovzorke 30 minut pred koncem programa HYB segrejte na ustrezno temperaturo za hibridizacijo in zajem.

\*Če se ustavite pred naslednjim postopkom, s pripravo tega reagenta počakajte.

2. Na cikličnem termostatu shranite naslednji program HYB z ustreznim številom ciklov, ki so navedeni v [Preglednica 3](#).
- Izberite možnost predgretja pokrova in temperaturo nastavite na 100 °C.
  - Nastavitev volumna reakcije
    - [Visokokakovostna gDNK] 100 µl
    - [gDNAK, ekstrahirana iz FFPE] 25 µl
  - 98 °C za 5 minut
  - X ciklov po 1 minuto, začeni pri 98 °C za prvi cikel, čemur sledi zmanjšanje za 2 °C z vsakim nadaljnjim ciklom
  - 90 minut ohranite pri ustrezni temperaturi:
    - [gDNAK, ekstrahirana iz FFPE] 58 °C
    - [80-merne plošče s sondami] 58 °C
    - [izpis somatske variante] 58 °C
    - [vse ostale] 62 °C

Skupni čas delovanja je ~115 minut.

Preglednica 3 Število ciklov na vzorec ali ploščo

Vrsta vzorca in plošče	Število ciklov (X)
gDNK, ekstrahirana iz FFPE (ne glede na vrsto plošče)	20
80-merne plošče s sondami (ne glede na vrsto vzorca)	20
Izpis somatske variante	20
Vsi drugi vzorci in plošče	18

## Postopek

1. [Visokokakovostna gDNK] V vsako združeno knjižnico na PCR-plošči dodajte naslednje reagentne v *navedenem vrstnem redu*.  
Ne ustvarite glavne mešanice. Če ustvarite glavno mešanico NHB2 in EHB2, negativno vplivate na uspešnost obogatitve.
  - NHB2 (modri pokrovček) (50 µl)
  - Plošča s sondami za obogatitev (10 µl)
  - EHB2 (10 µl)
2. [Visokokakovostna gDNK] S pipeto, nastavljeno na 90 µl, 10-krat temeljito premešajte vsak kanal.
3. [gDNK, ekstrahirana iz FFPE] V vsako združeno knjižnico na PCR-plošči dodajte naslednje reagentne v *navedenem vrstnem redu*.  
Ne ustvarite glavne mešanice. Če ustvarite glavno mešanico NHB2 in EHB2, negativno vplivate na uspešnost obogatitve.



- NHB2 (modri pokrovček) (12,5 µl)
  - Plošča s sondami za obogatitev (2,5 µl)
  - EHB2 (2,5 µl)
4. [gDNK, ekstrahirana iz FFPE] S pipeto, nastavljeno na 20 µl, 10-krat temeljito premešajte vsak kanal.
  5. Zatesnite ploščo in jo 10 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
  6. Ploščo z vzorci postavite na predhodno programirani ciklični termostat in zaženite program HYB.
  7. Po poteku časa ohranitve temperature programa HYB takoj nadaljujte z naslednjim postopkom.



### OPOZORILO

Oborina nastane, če temperatura reakcije hibridizacije pade pod sobno temperaturo.

## Zajem hibridiziranih sond

Ta korak uporablja Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) za zajem sond, hibridiziranih v ciljne interesne regije.

### Potrošni material

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (rumenorjavi pokrovček)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5-mililitrska mikrocentrifugirka
- 96-kanalna MIDI-plošča
- 96-kanalna PCR-plošča
- Samolepilna folija
- Magnetno stojalo za MIDI-ploščo
- Pripravite se na poznejši postopek:
  - Enhanced PCR Mix (EPM)
  - PCR Primer Cocktail (PPC)

### O reagentih

- EEW
  - Pred predgrevanjem v inkubatorju za mikrovzorke se prepričajte, da se je EEW vsaj 2 uri tajal pri sobni temperaturi.
  - Pred zaključkom programa HYB se prepričajte, da se je EEW vsaj 30 minut grel v inkubatorju za mikrovzorke.

- Ko ga ne uporabljate, EEW pustite v inkubatorju za mikrovzorke. EEW mora ostati segret tekem celotnega protokola.
- Ko reagent doseže sobno temperaturo, lahko postane moten.
- Reagent je lahko rumene barve.
- SMB3
  - SMB3 mora biti pred uporabo na sobni temperaturi.

## Priprava

1. Pripravite naslednji potrošni material.

Element	Shranjevanje	Navodila
SMB3	Od 2 °C do 8 °C	Pustite stati 2 uri, da reagent doseže sobno temperaturo. Obrnite in vrtinčite do popolne resuspenzije.
EEW (rumenorjava epruveta)	Od -25 °C do -15 °C	Po 2-urni inkubaciji pri sobni temperaturi reagent v inkubatorju za mikrovzorke 30 minut pred koncem programa HYB segrejte na ustrezno temperaturo za hibridizacijo in zajem.
EE1	Od -25 °C do -15 °C	Odmrzujte pri sobni temperaturi in vrtinčite.
HP3	Od -25 °C do -15 °C	Odmrzujte pri sobni temperaturi in vrtinčite.
ET2	Od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo. Premešajte z vrtinčenjem.
EPM	Od -25 °C do -15 °C	1 uro odmrzujte na ledu. Premešajte z obračanjem ter na kratko centrifugirajte. Postavite na led in odstavite.
PPC	Od -25 °C do -15 °C	1 uro odmrzujte na ledu. Premešajte z vrtinčenjem ter na kratko centrifugirajte. Postavite na led in odstavite.

2. En inkubator za mikrovzorke predhodno segrejte z grelnim blokom MIDI za inkubacijo plošče z vzorci na eno od naslednjih temperatur. EEW lahko predhodno segrejete v drugem inkubatorju za mikrovzorke. EEW položite na vrh grelnega bloka MIDI.
  - [FFPE] 58 °C
  - [80-merne plošče s sondami] 58 °C
  - [izpis somatske variante] 58 °C
  - [vse ostale] 62 °C

## Postopek

### Zajem

1. SMB3 dodajte v ustrezen kanal nove MIDI-plošče, kot sledi.
  - [Visokokakovostna gDNK] Dodajte 250 µl SMB3.
  - [gDNK, ekstrahirana iz FFPE] Dodajte 62,5 µl SMB3.
2. S pipeto, nastavljeno na 100 µl za visokokakovostno gDNK ali 25 µl za FFPE, vsako knjižnico iz zbirke prenesite iz 96-kanalne PCR-plošče v ustrezni kanal nove MIDI-plošče.
3. Zatesnite ploščo in 4 minute stresajte pri 1200 vrt./min.
4. V primeru brizganja ploščo na kratko centrifugirajte.
5. Ploščo z zbirko knjižnic položite na grelni blok MIDI v inkubatorju za mikrovzorke (pod epruveto EEW), zaprite pokrov in 15 minut inkubirajte pri ustrezni temperaturi:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80-merna plošča s sondami] 58 °C
  - [izpis somatske variante] 58 °C
  - [vse ostale] 62 °C
6. Odstranite ploščo z zbirko knjižnic in jo 30 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
7. MIDI-ploščo takoj postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).
8. [Visokokakovostna gDNK] S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsakega kanala odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte peleta kroglic.
9. [gDNK, ekstrahirana iz FFPE] S pipeto, nastavljeno na 90 µl, iz vsakega kanala odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte peleta kroglic.
10. Odstranite in zavržite ves preostali supernatant.

### Pranje

1. Ploščo odstranite z magnetnega stojala.
2. [Visokokakovostna gDNK] EEW hitro odstranite iz inkubatorja za mikrovzorke in v vsak kanal dodajte 200 µl reagenta.
3. [gDNK, ekstrahirana iz FFPE] EEW hitro odstranite iz inkubatorja za mikrovzorke in v vsak kanal dodajte 50 µl reagenta.
4. Preostali EEW vrnite v inkubator za mikrovzorke in ga ohranite segretega.
5. Zatesnite in 4 minute stresajte pri 1800 vrt./min.
6. Ploščo z zbirko knjižnic položite na grelni blok MIDI v inkubatorju za mikrovzorke (pod epruveto EEW), zaprite pokrov in 5 minut inkubirajte pri ustrezni temperaturi:
  - [FFPE] 58 °C

- [80-merne plošče s sondami] 58 °C
  - [izpis somatske variante] 58 °C
  - [vse druge plošče] 62 °C
7. MIDI-ploščo takoj postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).
  8. S pipeto, nastavljeno na 200 µl za visokokakovostno gDNK ali 50 µl za FFPE, odstranite in zavržite ves supernatant iz vsakega kanala.
  9. Ponovite korake 1–8 dvakrat za skupno tri pranja.

### Pranje prenesenega reagenta

1. Ploščo odstranite z magnetnega stojala.
2. [ **Visokokakovostna gDNK** ] EEW hitro odstranite iz inkubatorja za mikrovzorke in v vsak kanal dodajte 200 µl reagenta.
3. [gDNK, ekstrahirana iz FFPE] EEW hitro odstranite iz inkubatorja za mikrovzorke in v vsak kanal dodajte 50 µl reagenta.
4. Zatesnite in 4 minute stresajte pri 1800 vrt./min. V primeru brizganja hitrost zmanjšajte na 1600 vrt./min.
5. Raztopino z resuspendiranimi kroglicami prenesite na novo MIDI-ploščo.  
Nekateri vzorci lahko ostanejo v kanalih.



#### OPOZORILO

Prenos reagenta zmanjša prenos rezidualnih reagentov, ki lahko zavirajo reakcijo PCR.

6. Ploščo z vzorci položite na grelni blok MIDI na inkubatorju mikrovzorcev, zaprite pokrov ter 5 minut inkubirajte pri ustrezni temperaturi:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80-merne plošče s sondami] 58 °C
  - [izpis somatske variante] 58 °C
  - [vse ostale] 62 °C
7. MIDI-ploščo takoj postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).
8. S pipeto, nastavljeno na 200 µl za visokokakovostno gDNK ali 50 µl za FFPE, iz vsakega kanala odstranite in zavržite ves supernatant.
9. Ploščo 30 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
10. MIDI-ploščo za 10 sekund postavite na magnetno stojalo.
11. Z 20-mikrolitrsko pipeto iz vsakega kanala odstranite in zavržite odvečno tekočino.
12. Takoj nadaljujte z [Elucija na strani 44](#), da preprečite prekomerno sušenje kroglic in izgubo donosa knjižnic.

### Elucija

1. Za pripravo glavne mešanice za elucijo združite naslednje volumne. Vsak volumen pomnožite s številom združenih knjižnic.
  - EE1 (28,5 µl)
  - HP3 (1,5 µl)Presežek dodatnega reagenta je vključen v volumen.
2. Vrtinčite in nato na kratko centrifugirajte.
3. MIDI-ploščo odstranite z magnetnega stojala.
4. V vsak kanal dodajte 23 µl glavne mešanice za elucijo.
5. Zatesnite ploščo in jo 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
6. Ploščo 2 minuti inkubirajte pri sobni temperaturi.
7. 30 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
8. MIDI-ploščo postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).
9. 21 µl supernatanta iz MIDI-plošče prenesite v ustrezni kanal nove 96-kanalne PCR-plošče.
10. Zavržite MIDI-ploščo.
11. Dodajte 4 µl ET2 v vsak kanal z 21 µl supernatanta.
12. Pipeto nastavite na 20 µl in z njo 10-krat počasi temeljito premešajte vsak kanal.
13. Zatesnite ploščo z vzorci in jo 10 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
14. Ploščo 1 minuto inkubirajte pri sobni temperaturi.

## Ojačitev obogatene knjižnice

Ta korak uporablja PCR za ojačitev obogatene knjižnice.

### Potrošni material

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Samolepilna folija

## Priprava

1. Pripravite naslednji potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
EPM	Od -25 °C do -15 °C	1 uro odmrzujte pri temperaturi 4 °C ali na ledu. Premešajte z obračanjem ter na kratko centrifugirajte. Postavite na led in odstavite.
PPC	Od -25 °C do -15 °C	1 uro odmrzujte na ledu pri temperaturi 4 °C. Premešajte z vrtinčenjem ter na kratko centrifugirajte. Postavite na led in odstavite.

2. Na cikličnem termostatu shranite naslednji program AMP z ustreznim številom ciklov PCR, ki so navedeni v naslednji preglednici.

- Izberite možnost predgretja pokrova in temperaturo nastavite na 100 °C.
- Volumen reakcije nastavite na 50 µl.
- 98 °C za 45 sekund
- (X) ciklov:
  - 98 °C za 30 sekund
  - 60 °C za 30 sekund
  - 72 °C za 30 sekund
- 72 °C za 5 minut
- Ohranite na temperaturi 10 °C.

Skupni čas delovanja je ~35 minut.

Vrsta vzorca in plošče	(X) ciklov
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) za visokokakovostno gDNK	10
Illumina Exome Panel (CEX) za FFPE	12
Vsi drugi vzorci in plošče	12 <sup>1234</sup>

<sup>1</sup> Z nadaljnjo optimizacijo lahko za majhne plošče tretjih strank prilagodite do 15 ciklov. Če uporabljate FFPE, lahko prilagodite do 17 ciklov.

<sup>2</sup> Za plošče tretjih strank z zgolj 500 sondami lahko prilagodite do 17 ciklov. Če uporabljate FFPE, lahko prilagodite do 19 ciklov.

<sup>3</sup> Za vzorce FFPE lahko prilagodite do 14 ciklov.

<sup>4</sup> Povečanje števila ciklov PCR lahko povzroči višjo stopnjo podvojenih vrednosti in manjše velikosti fragmentov za vzorce FFPE.

## Postopek

1. PPCV vsak kanal dodajte 5 µl.
2. EPMV vsak kanal dodajte 20 µl.
3. Zatesnite ploščo in 1 minuto stresajte pri 1200 vrt./min.
4. Ploščo 10 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
5. Postavite jo na predhodno programirani ciklični termostat in zaženite program AMP.

### TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV

Če ustavite potek dela, lahko reagent pri temperaturi od 2 °C do 8 °C hranite največ dva dni. Do 24 ur ga lahko pustite tudi na cikličnem termostatu.

## Čiščenje ojačane in obogatene knjižnice

Ta korak uporablja Cleanup Beads za čiščenje obogatene knjižnice in odstranitev neželenih izdelkov.

### Potrošni material

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Sveže pripravljen 80-odstotni etanol (EtOH)
- Samolepilne folije
- 96-kanalna MIDI-plošča
- 96-kanalna PCR-plošča
- Magnetno stojalo za MIDI-ploščo

### O reagentih

- Cleanup Beads
  - Vrtinčite pred vsako uporabo.
  - S pogostim vrtinčenjem zagotovite, da se kroglice enakomerno porazdelijo.
  - Reagent počasi porazdelite z aspiracijo, saj je raztopina viskozna.

### Priprava

1. Pripravite naslednji potrošni material.

Element	Shranjevanje	Navodila
CB	Sobna temperatura	Mešajte z vrtinčenjem in obračanjem, dokler tekočina ne postane homogena barve.
RSB	Od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo. Premešajte z vrtinčenjem.

- Iz absolutnega etanola pripravite svež 80-odstotni EtOH.

## Postopek

- PCR-ploščo 10 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
- CB 3-krat vrtinčite za 10 sekund in obrnite.
- Dodajte 40,5 µl CBv vsak kanal nove **MIDI**-plošče.
- 45 µl reagenta iz vsakega kanala PCR-plošče prenesite v ustrezn kanal MIDI-plošče.
- Zatesnite ploščo in jo 1 minuto stresajte pri 1800 vrt./min.
- MIDI-ploščo 5 minut inkubirajte pri sobni temperaturi.
- 10 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
- MIDI-ploščo postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (5 minut).
- S pipeto, nastavljeno na 95 µl, odstranite iz vsakega kanala in zavržite ves supernatant.
- Dvakrat operite, kot sledi.
  - Ko je plošča na magnetnem stojalu, brez mešanja dodajte 200 µl svežega 80-odstotnega EtOH.
  - Inkubirajte 30 sekund.
  - Odstranite in zavržite supernatant, pri čemer se ne dotikajte kroglic.
- Na magnetnem stojalu na zraku sušite 5 minut.
- Med sušenjem na zraku z 20-mikrolitrsko pipeto iz vsakega kanala odstranite in zavržite odvečni EtOH.
- Ploščo odstranite z magnetnega stojala in v vsak kanal dodajte 32 µl reagenta RSB.
- Zatesnite ploščo in jo 1 minuto stresajte pri 1800 vrt./min.
- Ploščo 5 minut inkubirajte pri sobni temperaturi.
- 10 sekund centrifugirajte pri 280 × g.
- MIDI-ploščo postavite na magnetno stojalo in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).
- 30 µl supernatanta iz 96-kanalne MIDI-plošče prenesite v ustrezn kanal nove PCR-plošče.
- Zavržite MIDI-ploščo.

## TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV

Če ustavite potek dela, zatesnite ploščo in jo pri temperaturi od -25 °C do -15 °C hranite največ 7 dni.



## Preverba obogatenih knjižnic

Za količinsko opredelitev vnosa dvoverižne gDNK uporabite fluorescentno metodo, pri kateri se uporablja interkalacijsko barvilo. Izogibajte se metodam za merjenje skupne količine nukleinske kisline, kot so NanoDrop ali druge metode absorpcije UV.

1. Z izbrano metodo kvantifikacije izvedite postopek z 1 µl obogatenih knjižnic.

**OPOMBA** Celokupna molarnost sond sorazmerno vpliva na donos knjižnic po obogatitvi.

Pričakujete lahko povprečno velikost vstavljanja 125–235 bp ter velikost fragmentov knjižnic od ~200 bp do ~1000 bp.

## Redčenje knjižnic do začetne koncentracije

S tem korakom knjižnice razredčite do začetne koncentracije v vašem sistemu sekvenciranja, kar predstavlja prvi korak serijske razredčitve. Po razredčenju do začetne koncentracije so knjižnice pripravljene za denaturacijo in razredčenje do končne koncentracije ob vstavljanju.

Za sekvenciranje, ne glede na uporabljeno ploščo s sondami za obogatitev, Illumina priporoča nastavitve teka sekvenciranja v paru s 151 cikli na odčitavanju ( $2 \times 151$ ) in 10 cikli na indeksirano odčitavanje. Če želite manj prekrivajočih se odčitavanj ali manj neobdelane pokritosti, lahko sekvenco zmanjšate na  $2 \times 126$  ali  $2 \times 101$ .

1. Izračunajte vrednost molarnosti knjižnice ali združenih knjižnic s pomočjo naslednje formule.

- Za knjižnice, primerne za analizator fragmentov DNK, uporabite povprečno velikost, pridobljeno za knjižnico.
- Za vse druge kvalifikacijske metode kot povprečno velikost knjižnice uporabite 350 bp.

Na primer: če je vaša koncentracija knjižnice 20 ng/ $\mu$ l in povprečna velikost 350 bp, je vrednost molarnosti posledično 86,58 nM.

2. Z uporabo vrednosti molarnosti izračunajte volumne RSB in knjižnic, ki jih potrebujete za razredčitev knjižnic na začetno koncentracijo za vaš sistem.

Sistem za sekvenciranje	Minimalni zahtevani volumen knjižnic ( $\mu$ l)	Začetna koncentracija (nM)	Končna koncentracija ob vstavljanju (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) ali 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx ] 1,75 nM je začetna koncentracija za končno koncentracijo ob vstavljanju 350 pM. Po potrebi lahko končno koncentracijo ob vstavljanju prilagodite s pomočjo naslednje preglednice.

Končna koncentracija ob vstavljanju (pM)	Koncentracija združenih knjižnic (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2

Končna koncentracija ob vstavljanju (pM)	Koncentracija združenih knjižnic (nM)
450	2,25
500	2,50

### 3. Razredčitev knjižnic z RSB:

- **Knjižnice, kvantificirane kot multipleksna zbirka knjižnic** – Zbirko razredčite na začetno koncentracijo za vaš sistem.
- **Knjižnice, kvantificirane individualno** – Vsako knjižnico razredčite na začetno koncentracijo za vaš sistem. 10 µl vsake razredčene knjižnice dodajte v epruveto, da ustvarite multipleksno zbirko knjižnic.

### 4. Upoštevajte navodila za denaturacijo in razredčitev za vaš sistem, da reagent razredčite do končne koncentracije ob vstavljanju.

- Za NextSeq 550Dx System glejte razdelek [Priprava sekvenciranja z NextSeq 550Dx na strani 51](#).
- Za MiSeqDx System glejte razdelek [Priprava sekvenciranja z MiSeqDx na strani 53](#).
- Za sistem NovaSeq 6000Dx System glejte razdelek [Priprava sekvenciranja z NovaSeq 6000Dx na strani 54](#).

Končne koncentracije ob vstavljanju predstavljajo izhodišče in splošna vodila. Z nadaljnjimi teki sekvenciranja ali s titracijo pretočnih celic optimizirajte koncentracije za vaš potek dela in vašo kvantifikacijsko metodo.

## Priprava sekvenciranja z NextSeq 550Dx

Za sekvenciranje s sistemom za sekvenciranje NextSeq 550Dx Sequencing System sledite naslednjim navodilom za denaturacijo in razredčenje knjižnic.

### Potrošni material

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

### Priprava

Za denaturacijo knjižnic za sekvenciranje pripravite *svežo* raztopino 0,2 N NaOH. V izogib manjšim napakam pri pipetiranju, ki vplivajo na končno koncentracijo NaOH, pripravite večji volumen.

**OPOZORILO**

Sveže razredčeni 0,2N NaOH je bistvenega pomena za postopek denaturacije. Neustrezna denaturacija lahko zmanjša donos.

1. Pripravite naslednji potrošni material.

Element	Shranjevanje	Navodila
HT1	Od -25 °C do -15 °C	Odmrznite pri sobni temperaturi. Shranjujte pri temperaturi od 2 °C do 8 °C, dokler niste pripravljeni na razredčenje denaturiranih knjižnic.

2. Za pripravo sveže razredčenega NaOH v mikrocentrifugirko združite naslednje volumne:

- Laboratorijska voda (800 µl)
- 1 N NaOH (200 µl)

Rezultat je 1 ml 0,2 N NaOH.

3. Večkrat obrnite epruveto, da premešate njeno vsebino.

4. Za pripravo 200 mM Tris-HCl, pH 7,0, v mikrocentrifugirki združite naslednje volumne:

- Laboratorijska voda (800 µl)
- 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

Rezultat je 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

**OPOMBA**

Epruveta mora biti zaprta. Sveže razredčeno raztopino porabite v **12 urah**.

**Denaturacija knjižnic**

1. V mikrocentrifugirki združite naslednje volumne knjižnice in sveže razredčenega 0,2 N NaOH.

- 10 µl knjižnice
- 10 µl 0,2 N NaOH

2. Na kratko vrtinčite ter 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g.

3. Pri sobni temperaturi inkubirajte 5 minut.

4. Dodajte 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

**Redčenje denaturiranih knjižnic na 20 pM**

1. 970 µl predhodno ohlajenega HT1 dodajte v epruveto z denaturiranimi knjižnicami.

Rezultat je 20 pM denaturirana knjižnica.

2. Na kratko vrtinčite ter 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g.

3. 20 pM knjižnice postavite na led, dokler niste pripravljeni na končno redčenje.

## Redčenje knjižnic do koncentracije ob vstavljanju

1. Za razredčitev raztopine denaturirane 20 pM knjižnice na 1,2 pM dodajte naslednje volumne.
  - Raztopina denaturirane knjižnice (78 µl)
  - Predhodno ohlajen HT1 (1222 µl)
 Skupni volumen je 1,3 ml (1,2 pM).
2. Obrnite, da premešate, in pulzno centrifugirajte.
3. Nadaljujte s sekvenciranjem. Za navodila glejte *referenčni priročnik za NextSeq 550Dx Instrument (dokument št. 100000009513)* in *navodila za potek dela s programsko opremo Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx za NextSeq 550Dx (dokument št. 200015671)* ali *navodila za uporabo aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za NextSeq 550Dx (dokument št. 200025238)*.

## Priprava sekvenciranja z MiSeqDx

Za sekvenciranje s sistemom za sekvenciranje MiSeqDx sledite naslednjim navodilom za denaturacijo in razredčenje knjižnic.

### Potrošni material

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1 N NaOH

### Priprava

Za denaturacijo knjižnic za sekvenciranje pripravite *svežo* raztopino 0,2 N NaOH. V izogib manjšim napakam pri pipetiranju, ki vplivajo na končno koncentracijo NaOH, pripravite večji volumen.



### OPOZORILO

Sveže razredčeni 0,2 N NaOH je bistvenega pomena za postopek denaturacije. Neustrezna denaturacija lahko zmanjša donos.

1. Pripravite naslednji potrošni material.

Element	Shranjevanje	Navodila
HT1	Od -25 °C do -15 °C	Odmrznite pri sobni temperaturi. Shranjujte pri temperaturi od 2 °C do 8 °C, dokler niste pripravljeni na razredčenje denaturiranih knjižnic.

2. Za pripravo sveže razredčenega NaOH v mikrocentrifugirko združite naslednje volumne:
  - Laboratorijska voda (800 µl)
  - 1 N NaOH (200 µl)
 Rezultat je 1 ml 0,2 N NaOH.

## OPOMBA

Epruveta mora biti zaprta. Sveže razredčeno raztopino porabite v **12 urah**.

## Denaturacija 4 nM knjižnice

- V mikrocentrifugirki združite naslednje volumne.
  - 4 nM knjižnica (5 µl)
  - 0,2 N NaOH (5 µl)
- Na kratko vrtinčite ter 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g.
- Pri sobni temperaturi inkubirajte 5 minut.
- 990 µl predhodno ohlajenega HT1 dodajte v epruveto z denaturirano knjižnico.  
Rezultat je 1 ml 20 pM denaturirane knjižnice.

## Redčenje denaturiranih 20 pM knjižnic

- Razredčite na želeno koncentracijo z naslednjimi volumni.

Koncentracija	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM knjižnica	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Predhodno ohlajen HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- Obrnite, da premešate, in pulzno centrifugirajte.
- Nadaljujte s sekvenciranjem. Za navodila glejte *Referenčna navodila za instrument MiSeqDx za MOS v4 (dokument št. 1000000157953)* in *navodila za potek dela s programsko opremo Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx za MiSeqDx (dokument št. 200015661)*.

## Priprava sekvenciranja z NovaSeq 6000Dx

Za sekvenciranje s sistemom za sekvenciranje NovaSeq 6000Dx Sequencing System sledite naslednjim navodilom za denaturacijo in razredčenje knjižnic.

### Potrošni material

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (Resuspension Buffer)
- 1 N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- NovaSeq 6000Dx Library Tube

## Priprava

Za denaturacijo knjižnic za sekvenciranje pripravite *svežo* raztopino 0,2 N NaOH. V izogib manjšim napakam pri pipetiranju, ki vplivajo na končno koncentracijo NaOH, pripravite večji volumen.



### OPOZORILO

Sveže razredčeni 0,2 N NaOH je bistvenega pomena za postopek denaturacije. Neustrezna denaturacija lahko zmanjša donos.

1. V mikrocentrifugirki za razredčitev od 1 N NaOH do 0,2 N NaOH združite naslednje volumne:

Preglednica 4 Način S2

Reagent	Volumen za eno pretočno celico (µl)	Volumen za dve pretočni celici (µl)
Laboratorijska voda	40	80
Matični 1 N NaOH	10	20

S temi volumni dobite 50 µl 0,2 N NaOH za eno pretočno celico ali 100 µl 0,2 N NaOH za dve pretočni celici.

Preglednica 5 Način S4

Reagent	Volumen za eno pretočno celico (µl)	Volumen za dve pretočni celici (µl)
Laboratorijska voda	80	160
Matični 1 N NaOH	20	40

S temi volumni dobite 100 µl 0,2 N NaOH za eno pretočno celico ali 200 µl 0,2 N NaOH za dve pretočni celici.

2. Reagent večkrat obrnite ali temeljito vrtinčite, da ga premešate.
3. Za pripravo 400 mM Tris-HCl, pH 8,0, v mikrocentrifugirki združite naslednje volumne:
  - Laboratorijska voda (600 µl)
  - 1 M Tris-HCl, pH 8,0 (400 µl)
 Rezultat je 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0

### OPOMBA

Epruveta mora biti zaprta. Sveže razredčeno raztopino porabite v **12 urah**.

## Ustvarjanje normalizirane zbirke knjižnic

Koncentracija ob vstavljanju se lahko razlikuje glede na pripravo knjižnice, kvantifikacijo in metode normalizacije.

Sledite naslednjim navodilom za normalizacijo knjižnic, dokler ne dosežete ustrezne koncentracije, in nato knjižnice združite. Knjižnice, sekvencirane na isti pretočni celici, združite v eno normalizirano zbirko.

**OPOMBA** Največje število vzorcev, ki jih je z Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit mogoče izvesti na enem samem pasu, je 192. Ta mejna vrednost je posledica skupnega števila indeksov UD v setih A in B.

## Normalizacija knjižnic za združevanje

- Določite zahtevano koncentracijo združenih knjižnic glede na želeno končno koncentracijo ob vstavljanju.
  - Za končno koncentracijo ob vstavljanju 350 pM je zahtevana koncentracija združenih knjižnic 1,75 nM.
  - Če želite določiti koncentracijo združenih knjižnic za drugačno končno koncentracijo ob vstavljanju, glejte razdelek [Redčenje knjižnic do začetne koncentracije na strani 50](#).
- Knjižnice normalizirajte na želeno koncentracijo združenih knjižnic z uporabo 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Za pomoč pri redčenju knjižnic do ustrezne koncentracije glejte razdelek [Kalkulator združevanja](#) na spletnem mestu Illumina.

### Priporočene koncentracije ob vstavljanju

Optimalna koncentracija ob vstavljanju DNK je odvisna od vrste knjižnice in velikosti vložka. Za knjižnice > 450 bp so lahko potrebne višje koncentracije ob vstavljanju.

## Združitev normaliziranih knjižnic in dodatek izbirne kontrole PhiX

- Ustrezne volumne vseh normaliziranih knjižnic združite v novo mikrocentrifugirko, da ustvarite enega od naslednjih končnih volumnov:

Način	Končni volumen (µl)
S2	150
S4	310

- [Izbirno]** Spajanje 1 % nedenaturirane kontrole PhiX>, kot sledi.
  - Razredčite 10 nM PhiX do 2,5 nM z uporabo 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
  - Ustrezno količino nedenaturirane 2,5 nM PhiX dodajte v epruveto z zbirko nedenaturiranih knjižnic.

Način	Nedenaturirana 2,5 nM PhiX (µl)	Zbirka nedenaturiranih knjižnic (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Pri dodajanju v genomu PhiX, je 1 % priporočena količina za dobro uravnotežene knjižnice. Knjižnice z nizko raznolikostjo lahko zahtevajo več. Če želite kontrolo PhiX uporabiti s knjižnicami z nizko raznolikostjo, se za navodila obrnite na tehnično podporo Illumina.



**Gruča denaturiranih knjižnic in izbirna kontrola PhiX**

1. V epruveto z zbirko denaturiranih knjižnic dodajte 0,2 N NaOH in izbirno kontrolo PhiX, kot sledi.

Pretočna celica	0,2 N NaOH	Zbirka nedenaturiranih knjižnic (µl)	Končni volumen
S2	37	150	187 µl ali 187,9 µl s PhiX
S4	77	310	387 µl ali 388,9 µl s PhiX

2. Pokrijte in na kratko vrtinčite.  
 3. Centrifugirajte pri 280 × g do 1 minuto.  
 4. Pri sobni temperaturi inkubirajte 8 minut do denaturacije.  
 5. Za nevtralizacijo dodajte 400 mM Tris-HCl (pH 8,0), kot sledi.

Način	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Končni volumen
S2	38	225 µl ali 225,9 µl s PhiX
S4	78	465 µl ali 466,9 µl s PhiX

6. Pokrijte in na kratko vrtinčite.  
 7. Centrifugirajte pri 280 × g do 1 minuto.  
 8. Celotni volumen denaturirane knjižnice ali denaturirane knjižnice in PhiX prenesite v epruveto za knjižnice NovaSeq 6000Dx.  
 9. Nadaljujte s sekvenciranjem. Za navodila glejte *dokumentacijo izdelka NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument št. 200010105)* in *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx for NovaSeq 6000Dx (dokument št. 200014776)*.

## Odpravljanje težav

Za odpravljanje težav v poteku dela uporabite naslednjo preglednico. Če je izvedba sekvenciranja ali priprave knjižnic za vzorec dvakrat zapored neuspešna, je lahko potrebno dodatno odpravljanje težav. Obrnite se na tehnično podporo družbe Illumina.

Opomba	Možni vzrok	Priporočeni ukrep
Sekvenciranje ne izpolnjuje meril nadzora kakovosti Specifikacije	Napaka uporabniške ali laboratorijske opreme v poteku dela s testom	<p>Kvalificirajte obogatene knjižnice, da zagotovite ustrezen donos knjižnic in porazdelitev velikosti fragmentov. Ponovite pripravo knjižnic od enega od naslednjih korakov, odvisno od tega, kje je prišlo do domnevne ali dejanske napake opreme. Če je prišlo do neznane ali druge napake, se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina, ki vam bo pomagala odpraviti težavo pri izvedbi postopka.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ponovno sekvencirajte knjižnice. Glejte <a href="#">Priprava sekvenciranja z NextSeq 550Dx na strani 51</a>, <a href="#">Priprava sekvenciranja z MiSeqDx na strani 53</a> ali <a href="#">Priprava sekvenciranja z NovaSeq 6000Dx na strani 54</a>.</li> <li>• Ponovno obogatite knjižnice. Glejte <a href="#">Hibridizacija sond na strani 38</a>.</li> <li>• S pripravo knjižnic začnite od začetka poteka dela. Glejte <a href="#">Navodila za uporabo na strani 22</a>.</li> </ul>
	Težava z instrumentom	Obrnite se na tehnično podporo družbe Illumina.
Napaka pri izdelavi FASTQ ali splošna napaka sistema sekvenciranja (npr. napaka omrežja, napake pri nalaganju/odstranjevanju reagentov itd.).	Težave s programsko opremo ali instrumentom	<p>Za pomoč pri analizi glejte modul ali navodila za uporabo oz. <i>Referenčna navodila za NextSeq 550Dx instrument (dokument št. 100000009513)</i>, <i>Referenčna navodila za instrument MiSeqDx za MOS v4 (dokument št. 1000000157953)</i> ali <i>dokumentacijo NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument št. 200010105)</i>.</p> <p>Za dodatno pomoč se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina.</p>

Opomba	Možni vzrok	Priporočeni ukrep
Knjižnica DNK ne ustvari zadostnega donosa za naložitev sekvenciranja	Zahteve za vnos vzorcev niso bile izpolnjene	Zagotovite ustrezen vnos vzorcev in ponovite pripravo knjižnice. Glejte <a href="#">Priporočila za vnos vzorcev na strani 18</a> .
	Napaka pri uporabi ali napaka laboratorijske opreme v poteku dela s testom	Ponovite pripravo knjižnic od enega od naslednjih korakov, odvisno od tega, kje je prišlo do domnevne ali dejanske napake opreme. Če je prišlo do neznanne ali druge napake, se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina, ki vam bo pomagala odpraviti težavo pri izvedbi postopka. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ponovno sekvencirajte knjižnice. Glejte <a href="#">Priprava sekvenciranja z NextSeq 550Dx na strani 51</a>, <a href="#">Priprava sekvenciranja z MiSeqDx na strani 53</a> ali <a href="#">Priprava sekvenciranja z NovaSeq 6000Dx na strani 54</a>.</li> <li>• Ponovno obogatite knjižnice. Glejte <a href="#">Hibridizacija sond na strani 38</a>.</li> <li>• S pripravo knjižnic začnite od začetka poteka dela. Glejte <a href="#">Navodila za uporabo na strani 22</a>.</li> </ul>
	Zahteve za ploščo s sondo za obogatitev niso bile izpolnjene	Zagotovite ustrezno ploščo s sondo za obogatitev in ponovite pripravo knjižnic. Glejte <a href="#">Zahteve za plošče s sondami za obogatitev na strani 11</a> .

## Značilnosti delovanja

### Učinkovitost delovanja z vsemi eksomskimi ploščami

Učinkovitost eksomske plošče je bila testirana z uporabo najnižjega (50 ng) in najvišjega (1000 ng) priporočenega vnosa celične linije Coriell gDNK NA12878, z znanim setom resnice, nastavljenim za zaznavanje zarodnih variant (genom Coriell Platinum). Eksomska plošča 1 (45 Mb) in eksomska plošča 2 (36,8 Mb) sta bili uporabljeni kot reprezentativni plošči. 24 tehničnih replikatov je bilo testiranih s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z uporabo eksomske plošče 1 (45 Mb) v dveh reakcijah 12-pleksne obogatitve. 12 tehničnih replikatov je bilo testiranih s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z uporabo eksomske plošče 2 (36,8 Mb) v eni sami reakciji 12-pleksne obogatitve. Obogatene knjižnice so bile sekvencirane na NextSeq 550Dx sequencing system z modulom DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

V spodnji preglednici so prikazane povprečne vrednosti sekundarnega sekvenciranja in metrike učinkovitosti izpisa variante za tehnične replikate, preizkušene z vsako ploščo.

Preglednica 6 Učinkovitost delovanja testa z dvema polnima eksomskima ploščama

Plošča	Obogatitev z enoličnim odčitavanjem	Enakomernost pokritosti	Mediana dolžina fragmenta	Priklic SNV <sup>1</sup>	Natančnost SNV <sup>2</sup>	Priklic indelov <sup>1</sup>	Natančnost indelov <sup>2</sup>
Eksomska plošča 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Eksomska plošča 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

<sup>1</sup>Priklic = pozitivni rezultati/(resnično pozitivni rezultati + lažno negativni rezultati)

<sup>2</sup>Natančnost = resnično pozitivni rezultati/(resnično pozitivni rezultati + lažno pozitivni rezultati)

## Meja zaznavnosti

Za testiranje meje zaznavnosti je bil uporabljen referenčni standard za DNK Horizon HD799. HD799 je sestavljen iz zmerno kompromitirane, s formalinom obdelane DNK z znanimi SNV v alelnih frekvencah od 1 do 24,5 %. Uporabljen je bil najnižji priporočeni vnos DNK (50 ng), ocenjena pa je bila stopnja zaznavanja SNV z  $\geq 5,0$  % variantne frekvence alelov (VAF). S potekom dela FFPE je bilo s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testiranih 16 tehničnih replikatov, obogatenih s ploščo za obogatitev za različne vrste raka (1,94 Mb). Izvedenih je bilo 16 (enopleksnih) obogatitev, nakar so bili replikati sekvencirani na instrumentu NextSeq 550Dx z modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Vsi vzorci so izpolnjevali zahteve glede učinkovitosti vzorcev, specifične za posamezno ploščo, kot je prikazano v naslednji preglednici.

Preglednica 7 Učinkovitost vzorca za mejo zaznave

Plošča	Hitrost zaznavanja variant SNV $\geq 5,0$ % VAF	Povprečje Enakomernost pokritosti
Plošča za obogatitev, različne vrste raka (1,94 Mb, 523 genov)	100 %	99 %

## Moteče snovi

Vpliv morebitnih motečih snovi so ocenili v Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z ovrednotenjem učinkovitosti delovanja testa v prisotnosti motečih snovi.

## Motnje v polni krvi

Acetaminofen (eksogena spojina, zdravilo), kreatinin in trigliceridi (endogeni presnovki) so bili testirani tako, da so jih pred ekstrakcijo DNK s spiking metodo dodali v vzorce polne človeške krvi. Za oceno motenj, ki so posledica odvzema krvi (kratek odzem), so v vzorce polne krvi dodali tudi EDTA. Poleg tega je bil za oceno motenj, ki so nastale zaradi priprave vzorca, DNK, ekstrahirani iz polne krvi, dodan tudi etanol molekulske stopnje.

Naslednja preglednica prikazuje testne koncentracije za posamezne moteče snovi.

Preglednica 8 Potencialno moteče snovi in koncentracije, testirane v polni krvi

Testna snov	Testna koncentracija
Acetaminofen	15,6 mg/dl* Trikrat večja koncentracija, kot se pričakuje po terapevtskem odmerku zdravila.
Kreatinin	15 mg/dl* Najvišja koncentracija v populaciji.
Trigliceridi	1,5 g/dl* Najvišja koncentracija v populaciji.
EDTA	6 mg/ml Trikrat večja koncentracija, kot je bilo pričakovano v krvi, odvzeti v epruveh z EDTA.
Etanol molekulske stopnje	15 % v/v V eluatu po ekstrakciji DNK.

\*V skladu s CLSI EP37-ED1:2018

Na motečo snov je bilo s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testiranih 12 tehničnih replikatov, obogatenih z eksomsko ploščo 1 (45 Mb). Replikati so bili obogateni enkratno (12-pleksno) in sekvencirani na instrumentu NextSeq 550Dx z modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Pri testiranih snoveh je vseh 12 vzorcev izpolnjevalo zahteve glede učinkovitosti vzorca, pri čemer ni bilo zaznanih motenj učinkovitosti testa.

## Motnje v tkivu FFPE

Kolorektalna vzorca FFPE sta bila testirana glede prisotnosti in odsotnosti 0,1 mg hemoglobina v 10 µm rezini FFPE, kar predstavlja najslabši možni scenarij 50-odstotne kontaminacije tkiva FFPE z visoko koncentracijo hemoglobina v krvi. Vzorci so bili testirani s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, in sicer z uporabo plošče za obogatitev 1 pri različnih vrstah raka (1,94 Mb) kot reprezentativne plošče za enopleksne obogatitve. Obogatene knjižnice so bile nato sekvencirane na instrumentu NextSeq 550Dx z modulom DNA GenerateFASTQ Dx. Vsi vzorci so izpolnjevali zahteve glede učinkovitosti, pri čemer je bilo dokazano, da hemoglobin ne ovira učinkovitosti delovanja testa.

Za oceno motenj, ki so nastale zaradi priprave vzorca, sta bili DNK, ekstrahirani iz vzorca tkiva FFPE bolnika z rakom mehurja, dodani eksogeni spojini. Testirani eksogeni snovi sta ekstrakcijski raztopini, ki se običajno uporabljata med postopkom ekstrakcije DNK in ki sta s testiranimi količinami navedeni v naslednji preglednici. Raztopini v testni snovi sta komercialno na voljo v kompletih za izolacijo DNK na osnovi kolone.

Preglednica 9 Potencialno moteče eksogene snovi in koncentracije, testirane v FFPE

Testna snov	Testna koncentracija ( $\mu\text{l}/30 \mu\text{l}$ eluata)
Raztopina za deparafinizacijo	$113 \times 10^{-6}$
Pralni pufer AW2	0,417

Na motečo snov je bilo s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testiranih osem tehničnih replikatov, obogatenih s ploščo za obogatitev za različne vrste raka (1,94 Mb). Replikati so bili obogateni enopleksno in sekvencirani na instrumentu NextSeq 550Dx z modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Pri obeh testiranih snoveh je vseh osem vzorcev izpolnjevalo zahteve glede učinkovitosti vzorca, pri čemer ni bilo zaznanih motenj učinkovitosti testa.

## Navzkrižna kontaminacija

Celična linija Coriell gDNK NA12878 (ženska, 10 vzorcev), celična linija Coriell gDNK NA12877 (moški, 12 vzorcev) in brez kontrolnih predlog (NTC, 2 vzorca): ti vzorci so bili testirani s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na plošči s postavitvijo šahovnice. Pri vseh vzorcih so uporabili najvišji priporočeni vnos gDNK (1000 ng) kot najstrožji pogoj za ocenjevanje navzkrižne kontaminacije vzorca. Testiranje sta izvedla dva ločena operaterja. Eksomska plošča 1 (45 Mb) je bila uporabljena v reakcijah 12-pleksne obogatitve. Obogatene knjižnice so bile sekvencirane z NextSeq 550Dx z DNA GenerateFASTQ Dx. Ocena je bila opravljena z ovrednotenjem pokritosti moškega Y-kromosoma v ženskih vzorcih s primerjavo ravni ozadja polne plošče ženskih vzorcev in prikazom indeksov vzorcev NTC.

Preglednica 10 Rezultati navzkrižne kontaminacije

Ženski vzorci s pokritostjo moškega Y-kromosoma < 3x izhodiščni hrup	Prisotnost indeksov v NTC
100 %	< 0,0005 %

## Delovanje aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Značilnosti delovanja aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za NovaSeq 6000Dx so navedene v *navodilih za NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument št. 200025276)*.

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na instrumentu NextSeq 550Dx zagotavlja enake poteke dela sekundarne analize kot aplikacija na NovaSeq 6000Dx, vključno z naslednjimi tremi poteki dela: ustvarjanje FASTQ, ustvarjanje FASTQ in VCF za zaznavanje variant zarodne linije ter ustvarjanje FASTQ in VCF za zaznavanje somatskih variant.

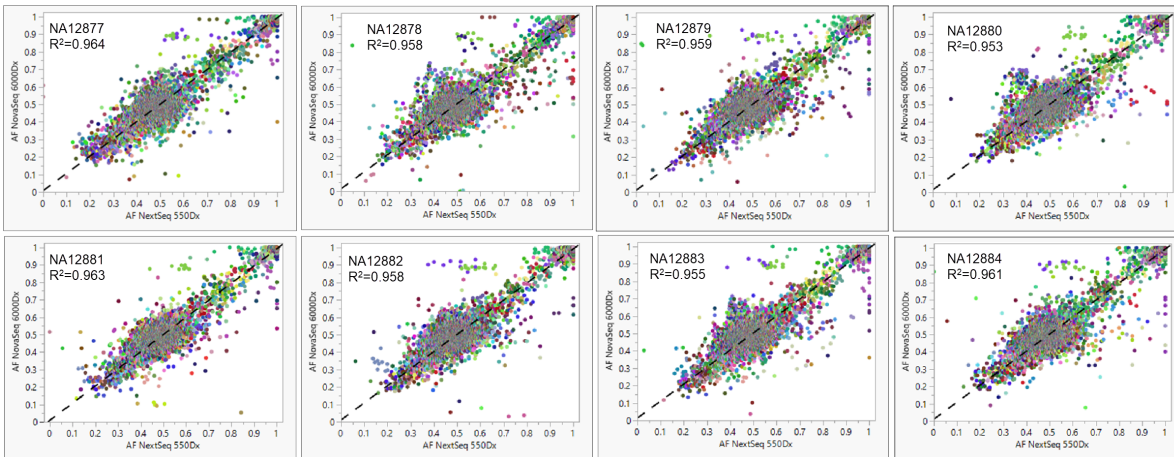
Primerljiva sekundarna analiza je bila pridobljena iz iste priprave knjižnic, ki je bila sekvencirana na obeh platformah. Hitrost odkrivanja variant ([Preglednica 11](#)) in ujemanje frekvenc ([Slika 1](#)) za vzorce celične linije Coriell gDNK so ocenili z reprezentativnim testom, zasnovanim za testiranje različnih genov, ki pokrivajo 1.970.505 baz (9232 tarč) na vseh 23 človeških kromosomih. Testiranih je bilo osem vzorcev genomske DNK Platinum, sedem v replikatih po šest (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) in eden (NA12881) v replikatih po pet (glejte [Slika 1](#)). Knjižnice so bile sekvencirane s tremi teki na instrumentih NovaSeq 6000Dx in NextSeq 550Dx, izpisi variant pa so bili izvedeni z uporabo ustvarjanja FASTQ in VCF za potek dela analize zaznavanja zarodnih variant aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Na podlagi močne korelacije med učinkovitostjo delovanja aplikacije na instrumentih NovaSeq 6000Dx in NextSeq 550Dx je bilo ugotovljeno tudi, da lastnosti učinkovitosti, povezane s sekundarno analizo, navedene v *navodilih za NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument št. 200025276)*, veljajo tudi za DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx v aplikaciji NextSeq 550Dx.

Preglednica 11 Učinkovitost aplikacije – Stopnja zaznavanja variant za SNV, vstavljanja in izbrise.

Plošča	Hitrost zaznavanja variant na NovaSeq 6000Dx	Hitrost zaznavanja variant na NextSeq 550Dx
Plošča za vse genome (1,97 Mb, 9232 tarč, 23 ur)	99,9 %	99,9 %

Slika 1 Primerjava frekvence variant pri tekih na NovaSeq 6000Dx in NextSeq 550Dx z analizo z aplikacijo DRAGEN for IDPE Dx



## Dodatek: Sekvence indeksiranih adapterjev UD družbe Illumina

Ti enolični dvojni (UD) indeksirani adapterji so razporejeni na plošči za ojačitev priporočene strategije povezovanja v pare. Indeksirani adapterji so namesto običajnih 8 baz dolgi 10 baz.

Adapterji z indeksom 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [ i 7 ] GTCTCGTGGGCTCGG

Adapterji z indeksom 2 (i5)

AATGATACGGCGACGACCCGAGATCTACAC [ i 5 ] TCGTCGGCAGGCCTC

Naslednja sekvenca se uporablja za obrezovanje adapterja pri odčitavanju 1 in odčitavanju 2.

CTGTCTTATACATCT

## Indeksirani adapterji plošče A/set 1

Ime indeksa	Baze i7 v adapterju	Baze i5 v adapterju
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT



Ime indeksa	Baze i7 v adapterju	Baze i5 v adapterju
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
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

Ime indeksa	Baze i7 v adapterju	Baze i5 v adapterju
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
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	ACAGTTCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTGCGGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA

Ime indeksa	Baze i7 v adapterju	Baze i5 v adapterju
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
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

## Indeksirani adapterji plošče B/set 2

Ime indeksa	Baze i7 v adapterju	Baze i5 v adapterju
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	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTTTTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGGGGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Ime indeksa	Baze i7 v adapterju	Baze i5 v adapterju
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGGGGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	AKAAGAGAGKACIJA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATTCGAG
UDP0138	AATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	KAGTAGTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGATT	KATAGTAGAGOR
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCC
UDP0151	CCTGATACAA	AKAAGAGAGKACIJA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTCTGA

Ime indeksa	Baze i7 v adapterju	Baze i5 v adapterju
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATTGC	GGCGCCCAATT
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	TTGCTTGTAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGGGGGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCT
UDP0177	TATTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGATT	AATTGGGGGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC

Ime indeksa	Baze i7 v adapterju	Baze i5 v adapterju
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGGGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGGTTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGACT

## Zgodovina revizij

Dokument	Datum	Opis spremembe
Dokument št. 200038118 v00	Julij 2023	<p>Prva izdaja.</p> <p>Ta dokument nadomešča prejšnji dokument 200019584. Spremembe dokumenta 200019584 v2, prisotne v novem dokumentu:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dodana vsebina za podporo sekvenciranja na NextSeq 550Dx instrument z uporabo aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za NextSeq 550Dx.</li> <li>• Pojasnilo seznama reagentov, ki niso priloženi.</li> <li>• Dodane informacije o poročanju o pojavnosti (v razdelku Opozorila in previdnostni ukrepi).</li> <li>• Pojasnilo pričakovanj glede knjižnic za obogatitev.</li> <li>• Dodana navodila za pripravo 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.</li> <li>• Odstranjena tipkarska napaka pri koraku Priprava na sekvenciranje.</li> </ul> <p>Predhodne spremembe dokumenta 200019584:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dodana vsebina za podporo sekvenciranja na instrumentu NovaSeq 6000Dx Instrument.</li> <li>• Dodana imena in kataloške številke sistemov sekvenciranja.</li> <li>• Odstranjene enolične informacije o dvojnem indeksiranju za knjižnice z enim indeksom.</li> </ul>

## Patenti in blagovne znamke

Ta dokument in vsebina v njem sta last družbe Illumina, Inc. in njenih podružnic («Illumina») ter sta namenjena le pogodbeno določeni uporabi njenih strank v povezavi z uporabo izdelkov, ki so opisani v tem dokumentu, in za noben drug namen. Tega dokumenta in vsebine v njem ne smete uporabljati ali distribuirati za kateri koli drug namen in/ali ju kakor koli drugače posredovati, razkriti ali razmnoževati brez predhodnega pisnega soglasja družbe Illumina. Illumina vam s tem dokumentom ne podeljuje nobene licence v okviru svojega patenta, blagovne znamke, avtorskih pravic ali pravic iz običajnega prava in nobenih podobnih pravic tretjih oseb.

Ustrezno kvalificirano in usposobljeno osebje mora natančno in dosledno upoštevati navodila v tem dokumentu, da zagotovi pravilno in varno uporabo izdelkov, opisanih v njem. Pred uporabo teh izdelkov morate v celoti prebrati vsebino tega dokumenta in se seznaniti z njo.

ČE NE PREBERETE VSEH NAVODIL V TEM DOKUMENTU IN JIH NE UPOŠTEVATE DOSLEDNO, LAHKO POVZROČITE OKVARO IZDELKOV, TELESNE POŠKODBE OSEB, VKLJUČNO Z UPORABNIKI IN DRUGIMI OSEBAMI, TER POŠKODBE DRUGE LASTNINE IN RAZVELJAVITE KAKRŠNO KOLI JAMSTVO, KI VELJA ZA IZDELKE.

ILLUMINA NE PREVZEMA NOBENE ODGOVORNOSTI ZA NEPRAVILNO UPORABO IZDELKOV, OPISANIH V TEM DOKUMENTU (VKLJUČNO Z NJIHOVIMI DELI IN PROGRAMSKO OPREMO).

© 2023 Illumina, Inc. Vse pravice so pridržane.

Vse blagovne znamke so last družbe Illumina, Inc. ali njihovih ustreznih lastnikov. Za informacije o določenih blagovnih znamkah glejte spletno mesto [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktne podatki



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 ZDA  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (zunaj Severne Amerike)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



**Sponsor za Avstralijo**  
Illumina Australia Pty Ltd  
Nursing Association Building  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Avstralija

## Označevanje izdelkov

Za popolno referenco simbolov, ki so prikazani na embalaži in označevanju izdelka, glejte razlago simbolov na spletnem mestu [support.illumina.com](http://support.illumina.com) na zavihku *Documentation (Dokumentacija)* za vaš komplet.