

ЗА ИН ВИТРО ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА
САМО ЗА ИЗНОС

Предназначение

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit е набор от реагенти и консумативи, използван за подготовка на библиотеки с проби от геномна ДНК, получена от човешки клетки и тъкан. Необходими са осигурени от потребителя панели за сонда за подготовката на библиотеки, насочени към специфични геномни региони, които представляват интерес. Генерираните библиотеки с проби са предназначени за използване в системи за секвениране на Illumina.

Принципи на процедурата

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е предназначен за подготовка на библиотеки за секвениране на ДНК, обогатени за целеви региони от геномна ДНК, получена от човешки клетки и тъкани.

За целево обогатяване са необходими осигурени от потребителя биотинилирани олигонуклеотидни панели. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим с набор от размери на панели, включително малки панели (<20 000 сонди) до големи панели (>200 000 сонди). Генерираните обогатени библиотеки са предназначени за секвениране в системите за секвениране на Illumina.

Процедурата с Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit се състои от следните стъпки:

- **Тагментирана геномна ДНК** – Използва Enrichment BLT Small (eBLTS) за тагментиране на входяща ДНК. По време на тагментирането gDNA се фрагментира и маркира с адаптери в една стъпка. Необходима е минимална входяща ДНК от 50 ng за насищане на eBLTS в реакцията на тагментиране. Когато е наситен, eBLTS фрагментира определен брой ДНК молекули, за да генерира нормализирани библиотеки с последователно разпределение на размера на фрагментите.
- **Изчистване след тагментиране** – Почиства маркираната с адаптер ДНК на eBLTS за използване при амплификация.
- **Амплифициране на тагментирана ДНК** – Амплифицира се тагментираната ДНК чрез използване на PCR програма с ограничен цикъл. В краищата на ДНК фрагментите се добавят уникални двойни (UD) индекси, които позволяват двойно уникално баркодиране на ДНК библиотеките и генериране на клъстери по време на секвениране.
- **Изчистване на библиотеки** – Използва процедура за пречистване с микросфери за пречистване и избор на размер на амплифицираните ДНК библиотеки.
- **Обединяване на библиотеки** – Комбинира ДНК библиотеки с уникални индекси в едно обединяване до 12 библиотеки. Можете да обедините библиотеки по обем или маса.
- **Хибридиране на сонди** – Състои се от реакция на хибридизация, по време на която двуверижните ДНК библиотеки се денатурират и панел от биотинилирани ДНК сонди се хибридира към целеви геномни региони.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим с няколко панела. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не включва панел за обогатяване. Панелите на сонда се доставят от потребителя и трябва да отговарят на изискваните спецификации. Реагентите на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit са съвместими както с олигонуклеотидни панели за обогатяване на ДНК на Illumina, така и с такива на трети страни, които отговарят на задължителните спецификации. За информация относно задължителните спецификации за панели на трети страни направете справка с [Изисквания към панелите на сондата за обогатяване на страница 11](#).
- **Улавяне на хибридизирани сонди** – Използват се стрептавидин магнитни микросфери (SMB3) за улавяне на биотинилирани сонди, хибридизирани в целевите области, които са обект на интерес.
- **Аmplифициране на обогатени библиотеки** – Използва се PCR за амплифициране на обогатени библиотеки.
- **Изчистване на амплифицирани обогатени библиотеки** – Използва се процедура за пречистване на микросфери за пречистване на обогатените библиотеки, готови за секвениране.
- **Секвениране** – Секвенирането на обогатените библиотеки се извършва на системи за секвениране MiSeqDx, NextSeq 550Dx или NovaSeq 6000Dx. За MiSeqDx и NextSeq 550Dx интегрираният DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module се използва за настройка на изпълняване на секвениране, мониторинг на изпълняване и първичен анализ (генериране на FASTQ от обозначаване на бази). За NovaSeq 6000Dx се използва DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application за настройка на изпълняване и вторичен анализ с няколко налични работни процеса.

Ограничения на процедурата

- За *инвитро* диагностична употреба.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим с геномна ДНК, получена от човешки клетки и тъкани.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим с двойноверижни входящи gDNA от 50 – 1000 ng. Производителността не е гарантирана с въвежданията извън тези прагове.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не включва реагентите за екстракция на ДНК. Резултатите от аналитичните тестове, включително тестовете за смущение, предоставени в [Характеристики на производителността на страница 63](#), са получени с цяла кръв и FFPE като представителни типове проби с представителни комплекти за екстракция на ДНК. Всички диагностични тестове, разработени за използване с реактиви Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, изискват пълно валидиране за всички аспекти на производителността с избрания комплект за екстракция на ДНК.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не се препоръчва за FFPE проби с лошо качество с $\Delta Cq > 5$. Използването на проби с $\Delta Cq > 5$ може да увеличи шансовете за неуспешна подготовка на библиотеката или да намали ефективността на анализа.
- Реагентите Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit са конфигурирани и тествани за входящата проба, реакциите за обогатяване и плексността, посочени в следващата таблица.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Входяща проба	Реакции за обогатяване	Плексност на обогатяването
Комплект с 16 проби	Нискокачествена (FFPE)	16 реакции	1-плексно
Комплект с 96 проби	Висококачествена (напр. цяла кръв)	8 реакции	12-плексно

- Входящата обработка на FFPE е тествана и се препоръчва изключително за 1-плексни реакции на обогатяване с използване на комплекта с 16 проби.
- За комплекта от 96 проби са възможни нестандартни плексности (2-плексни до 11-плексни), но имат следните ограничения:
 - Обработката на проби в 2-плексни до 11-плексни реакции на обогатяване намалява производителността на комплекта.
 - Оптималните резултати не са гарантирани. Получаването на подходящ добив на обогатяване за нестандартни плексности може да изисква допълнителна оптимизация.
 - За стратегии за обединяване с ниска плексност (2-плексни до 8-плексни) се изисква избор на индексни адаптери с различни секвенции, за да се оптимизира цветовият баланс за успешно секвениране и анализ на данни. Модулът DNA GenerateFASTQ Dx на MiSeqDx и NextSeq 550Dx предоставя опции за цветово балансирани индексни комбинации по време на настройката на изпълняването. За повече информация относно стратегиите за обединяване направете справка с [Методи за обединяване на страница 36](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е ограничен до предоставяне на обогатени библиотеки, които са секвенирани само на MiSeqDx, NextSeq 550Dx и NovaSeq 6000Dx. Използването на други системи за секвениране изисква пълно валидиране за всички аспекти на производителността.
- Панелите за обогатяване не са включени като част от този продукт. Резултатите от аналитичните тестове, предоставени в [Характеристики на производителността на страница 63](#), са получени с представителни панели за обогатяване и се предоставят само за информационни цели. Характеристиките на аналитичната производителност служат като пример за общите възможности на анализа и не установяват възможностите или пригодността по отношение на конкретни претенции за анализ. Всички диагностични тестове, разработени за използване с тези реагенти, изискват пълна проверка за всички аспекти на работата.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим както с панели за обогатяване на Illumina, така и с такива на трети страни. Въпреки това производителността с панели за обогатяване на трети страни, които не отговарят на изискванията за панела, не е гарантирана. За информация относно изискванията към панелите направете справка с [Изисквания към панелите на сондата за обогатяване на страница 11](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit използва 2 часа време за хибридизация. Използването на по-дълго време за хибридизация може да повлияе на показателите за ефективност.

- Модулите DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager за MiSeqDx и NextSeq 550Dx доставят само FASTQ файловете. Ако използвате тези модули, от вас се изисква да извършите валидиране на вторичен анализ.
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application е налично на NovaSeq 6000Dx. Приложението поддържа множество работни процеси за вторичен анализ, включително генериране на FASTQ, генериране на FASTQ и VCF за откриване на вариант на герминативна линия и генериране на FASTQ и VCF за откриване на соматичен вариант. Ако използвате приложението за генериране на VCF, не е необходимо да извършвате валидиране на вторичен анализ.
- За ограниченията на DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application, когато се използва с NovaSeq 6000Dx, направете справка с *NovaSeq 6000Dx Instrument Package Insert (Листовка за инструмента NovaSeq 6000Dx) (документ № 200025276)*.

Компоненти на продукта

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit се състои от следните компоненти.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, каталожен № 20051354 (16 проби) или № 20051352 (96 проби)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, каталожен № 20051355 (16 проби) или 20051353 (96 проби)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module за NextSeq 550Dx, каталожен № 20063024
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module за MiSeqDx, каталожен № 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application за NovaSeq 6000Dx, каталожен № 20074609

Предоставени реагенти

Приключването на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx изисква Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A или Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Можете да извършите следния брой реакции за подготовка и обогатяване на библиотеката, като използвате комплект от 16 проби или 96 проби.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Входяща проба	Реакции за обогатяване	Плексност на обогатяването
Комплект с 16 проби	Нискокачествена (FFPE)	16 реакции	1-плексно
Комплект с 96 проби	Висококачествена (напр. цяла кръв)	8 реакции	12-плексно

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A/B

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, да се съхраняват при 15°C до 30°C

Следните реагенти се доставят при стайна температура. Съхранявайте реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране.

Име на реагент	Количество епруветки		Цвят на капачка	Номинален обем	Активни съставки
	16 проби (№ 20050020)	96 проби (№ 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (Тагментационен буфер за спиране 2) (ST2)	1	4	Червено	350 µl	Разтвор на препарат във вода.
Tagment Wash Buffer 2 (Тагментационен промиващ буфер 2) (TWB2)	1	1	Зелено	41 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ препарат и сол.
Cleanup Beads (Микросфери за изчистване) (CB)	1	Не е приложимо*	Червено	10 ml	Твърдофазни парамагнитни микросфери в буфериран воден разтвор.

* Микросферите за изчистване за 96 проби са включени в Illumina Prep Dx Cleanup Beads, 96 проби (№ 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 проби), да се съхраняват при 15°C до 30°C

За комплекти с 96 проби са включени микросфери за изчистване в Illumina Prep Dx Cleanup Beads (каталожен № 20050030). Следният реагент се доставя при стайна температура. Съхранявайте реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране. За комплекти с 16 проби са включени микросфери за изчистване в Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (каталожен № 20050020).

Име на реагент	Количество	Цвят на капачка	Номинален обем	Активни съставки
Микросфери за изчистване (CB)	4	Червено	10 ml	Твърдофазни парамагнитни микросфери в буфериран воден разтвор

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, да се съхраняват при 2°C до 8°C

Следните реагенти се доставят охладени. Съхранявайте реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране. Съхранявайте епруветката с начална концентрация на eBLTS изправена, така че микросферите винаги да са потопени в буфера.

Име на реагент	Количество епруветки		Цвят на капачка	Номинален обем		Активни съставки
	16 проби (№ 20050021)	96 проби (№ 20050026)		16 проби	96 проби	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Жълто	200 µl	290 µl	Стрептавидинови магнитни микросфери, свързани с транспозоми в буфериран воден разтвор, съдържащ глицерол, EDTA, дитиотреитол, сол и препарат.
Буфер за ресуспензия (RSB)	1	4	Прозрачно	1,8 ml	1,8 ml	Буфериран воден разтвор.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, да се съхраняват при -25°C до -15°C

Следните реагенти се доставят замразени. Съхранявайте реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране.

Име на реагент	Количество епруветки		Цвят на капачка	Номинален обем		Активни съставки
	16 проби (№ 20050022)	96 проби (№ 20050027)		16 проби	96 проби	
Тагментационен буфер 1 (TB1)	1	4	Прозрачно	290 µl	290 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ магнезиева сол и диметил-формаимид.
Подобрена PCR смес (EPM)	2	4	Прозрачно	200 µl	610 µl	ДНК полимераза и dNTPs в буфериран воден разтвор.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 проби), да се съхраняват при 2°C до 8°C

За комплекти с 16 проби следните реагенти са включени в Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (каталожен № 20050023). За комплекти с 96 проби реагентите са включени в Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (каталожен № 20050028).

Следните реагенти се доставят охладени. Съхранявайте реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране.

Име на реагент	Количество епруветки	Цвят на капачка	Номинален обем	Активни съставки
Streptavidin Magnetic Beads (Стрептавидин магнитни микросфери) (SMB3)	4	Прозрачно	1,2 ml	Стрептавидин магнитни микросфери в буфериран воден разтвор, съдържащ формаимид, препарат и сол.
Resuspension Buffer (Буфер за ресуспензия) (RSB)	1	Прозрачно	1,8 ml	Буфериран воден разтвор.

Име на реагент	Количество епруветки	Цвят на капачка	Номинален обем	Активни съставки
Enrichment Hyb Buffer 2 (Буфер за обогатяване на хибридизация 2) (ЕНВ2)	1	Прозрачно	200 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ препарат и сол.
Elute Target Buffer 2 (Целеви буфер за елуиране 2) (ЕТ2)	1	Прозрачно	200 µl	Буфериран воден разтвор.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 проби), да се съхраняват при 2°C до 8°C

За комплекти с 96 проби следните реагенти са включени в Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (каталожен № 20050028). За комплекти с 16 проби реагентите са включени в IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (каталожен № 20050023).

Следните реагенти се доставят охладени. Съхранявайте реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране.

Име на реагент	Количество епруветки	Цвят на капачка	Номинален обем	Активни съставки
Стрептавидин магнитни микросфери (SMB3)	2	Прозрачно	1,2 ml	Стрептавидин магнитни микросфери в буфериран воден разтвор, съдържащ формамид, препарат и сол.
Буфер за ресуспензия (RSB)	4	Прозрачно	1,8 ml	Буфериран воден разтвор.
Буфер за обогатяване на хибридизация 2 (ЕНВ2)	1	Прозрачно	200 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ препарат и сол.
Целеви буфер за елуиране 2 (ЕТ2)	1	Прозрачно	200 µl	Буфериран воден разтвор.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, да се съхраняват при -25°C до -15°C

Следните реагенти се доставят замразени. Съхранявайте реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране.

Име на реагент	Количество епруветки		Цвят на капачка	Номинален обем	Активни съставки
	16 проби (№ 20050024)	96 проби (№ 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (Буфер за обогатяване на елуиране 1) (EE1)	1	1	Прозрачно	580 µl	Разтвор на препарат във вода.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (Подобрен промиващ буфер за обогатяване) (EEW)	4	4	Кехлибарено	4,1 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли и препарат.
PCR Primer Cocktail (PCR праймер коктейл) (PPC)	1	1	Прозрачно	320 µl	Смес от PCR праймери (олигонуклеотиди).
2N NaOH (HP3)	1	1	Прозрачно	200 µl	Разтвор на натриев хидроксид (NaOH) от 2N.
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (Буфер за хибридизация 2 + IDT NXT блокери) (NHB2)	2	1	Синьо	480 µl	Буфериран воден разтвор с Cot-1 ДНК, агент за струпване и формаמיד.

Име на реагент	Количество епруветки		Цвят на капачка	Номинален обем	Активни съставки
	16 проби (№ 20050024)	96 проби (№ 20050029)			
Enhanced PCR Mix (Подобрена PCR смес) (EPM)	2	1	Прозрачно	200 µl	ДНК полимераза и dNTPs в буфериран воден разтвор.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, да се съхранява при -25°C до -15°C

Следните реагенти се доставят замразени. Съхранявайте реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране. За секвенции на индексни адаптери направете справка с [Допълнение: индексни адаптерни секвенции на Illumina UD на страница 67.](#)

Компонент	Количество
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 индекса), № 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 индекса), № 20050039	1

Реагенти, които не са предоставени

Необходими реагенти, не са предоставени

- Реагенти за извличане и пречистване на ДНК
- Реагент за количествено определяне на ДНК
- Етанол (200 proof, за молекулярна биология)
- Вода без нуклеаза
- Tris-HCl от 1M, pH 7,0
- Tris-HCl от 10 mM, pH 7,5 – 8,5
- Разтвор на NaOH от 1N, чистота за молекулярна биология
- Ако използвате системата за секвениране NextSeq 550Dx:
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла) (каталожен № 20028871)
- Ако използвате системата за секвениране MiSeqDx:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (каталожен № 20037124)

- Ако използвате системата за секвениране NovaSeq 6000Dx:
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 цикъла) (каталожен № 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 цикъла) (каталожен № 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (каталожен № 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (каталожен № 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (каталожен № 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, опаковка от 24 броя (каталожен № 20062291)

Изисквания към панелите на сондата за обогатяване

Реагентите на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit са съвместими както с олигонуклеотидни панели за обогатяване на ДНК на Illumina, така и с такива на трети страни. Ако използвате сонди за биотинилирана ДНК на трети страни (фиксираны или персонализирани панели), уверете се, че отговарят на необходимите спецификации.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е оптимизиран и валидиран с помощта на следните спецификации на панелите на трети страни. Сравнима производителност не е гарантирана при използване на панели на трети страни, които не отговарят на спецификациите.

- Дължина на сондата от 80 bp или 120 bp
- Между 500 до 675 000 сонди
- Едно- или двуверижна ДНК
- Общо въвеждане на сондата от ≥ 3 pmol за обогатяване при плексности от 1-плексно до 12-плексно

Съхранение и обработка

- Стайната температура се определя като температура между 15°C и 30°C.
- Реагентите са стабилни, когато се съхраняват, както е посочено, до посочения срок на годност върху етикетите на комплектите. За температури на съхранение направете справка с [Предоставени реагенти на страница 4](#).
- Замразените реагентите запазват стабилността си за максимум четири цикъла на замразяване/размразяване, които настъпват преди указания срок на годност.
- Процедурата на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit съдържа следните точки за безопасно спиране:
 - След [Аmplифициране на тагментирана ДНК на страница 31](#) амплифицираните библиотеки са стабилни до 30 дни, когато се съхраняват при -25°C до -15°C.
 - След [Изчистване на библиотеки на страница 33](#) изчистените амплифицирани библиотеки са стабилни до 30 дни, когато се съхраняват при -25°C до -15°C.

- След [Обединяване на предварително обогатени библиотеки на страница 36](#) обединените библиотеки са стабилни до 30 дни, когато се съхраняват при -25°C до -15°C .
- След [Аmplифициране на обогатена библиотека на страница 48](#) плаката на обогатените амплифицирани библиотеки може да остане върху термоциклера до 24 часа. Като алтернатива плаката може да се съхранява при 2°C до 8°C до 48 часа.
- Окончателно почистените обогатени библиотеки са стабилни до 7 дни, когато се съхраняват при -25°C до -15°C .
- Ако някоя от опаковките или съдържанието на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit са повредени или компрометирани, се свържете с отдела за обслужване на клиенти на Illumina.
- Тагментационен буфер за спиране 2 (ST2) може да формира видими преципитати или кристали. Ако се наблюдават преципитати, загрейте при 37°C за 10 минути и след това разбъркайте на вортекс, докато преципитатите се разтворят.
- Хибридизационните олигонуклеотиди (НУВ) и подобреният промиващ буфер за обогатяване (EEW) трябва да бъдат предварително загреети до същата температура като температурата на задържане при хибридизация, приложима за тип проба и панел на сондата. За информация относно боравене с NHB2 and EEW направете справка с [Процедурни бележки на страница 17](#).
- Буфер за обогатяване на хибридизация 2 (ENB2) и НУВ буфер + IDT NXT блокери (NHB2) може да образуват кристали и мътност. Ако се наблюдават кристали и мътност, вортексирайте или пипетирайте нагоре и надолу, докато разтворът стане бистър. Уверете се, че сте загрели предварително NHB2 преди пипетиране.
- Когато боравите с микросфери за изчистване (CB), използвайте следните най-добри практики:
 - Никога не замразявайте микросферите.
 - Непосредствено преди употреба вортексирайте микросферите, докато се ресуспендират добре и цветът стане хомогенен.
- Когато боравите с Enrichment BLT Small (eBLTS), използвайте следните най-добри практики:
 - Съхранявайте епруветката eBLTS изправена, така че микросферите винаги да са потопени в буфера.
 - Вортексирайте eBLTS внимателно, докато микросферите се ресуспендират. За да избегнете повторно утаяване на микросферите, не се препоръчва центрофугиране преди пипетиране.
 - Ако микросферите са полепнали от страни или отгоре на 96-ямкова плака, центрофугирайте при $280 \times g$ за 3 секунди и след това пипетирайте, за да ресуспендирате.
- Когато боравите с индексни адаптерни плаки, използвайте следните най-добри практики:
 - Не добавяйте проби към индексните адаптерни плаки.
 - Всяка ямка на индексна плака е за еднократна употреба.

Необходимо оборудване и материали, които не са предоставени

В допълнение към Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit се уверете, че имате задължителното оборудване и материали, преди да започнете протокола.

Оборудване

Уверете се, че разполагате с необходимото оборудване, преди да стартирате протокола.

Протоколът е оптимизиран и валидиран с помощта на елементи с изброените спецификации. Сравнима производителност не е гарантирана при използване на оборудване извън спецификациите.

Някои елементи са необходими само за конкретни работни процеси. Тези елементи са посочени в отделни таблици.

- Термоциклер със следните спецификации:
 - Затоплящ се капак
 - Минимален диапазон на регулиране на температурата от 10°C до 98°C
 - Минимална температурна точност от $\pm 0,25^\circ\text{C}$
 - Максимален реакционен обем от 100 μl
 - Съвместим с напълно закрити 96-ямкови PCR плаки
- Инкубатор за микропроби със следните спецификации:
 - Температурен диапазон на околната температура от +5,0°C до 99,0°C
 - Съвместим с 96-ямкови MIDI плаки
- Вложки за инкубатор за микропроби, съвместими с 96-ямкови MIDI плаки
- Високоскоростен шейкър за микроплаки с диапазон на скоростта на смесване 200 – 3000 об./мин
- Магнитна стойка, съвместима с 96-ямкови PCR плаки
- Магнитна стойка, съвместима с 96-ямкови MIDI плаки
- Флуорометър, съвместим с вашия метод за количествено определяне
- Анализатор на ДНК фрагмент
- Прецизни пипети:
 - Едноканални и многоканални пипети от 10 μl
 - Едноканални и многоканални пипети от 20 μl
 - Едноканални и многоканални пипети от 200 μl
 - Едноканални пипети от 1000 μl

- Прецизните пипети гарантират точното доставяне на реагенти и проби. Може да се използват едноканални и многоканални пипети, ако са калибрират редовно и са точни в рамките на 5% от указания обем.
- Центрофуга за микроплаки
- Микроцентрофуга
- Една от следните системи за секвениране Illumina:
 - Инструмент MiSeqDx, каталожен № DX-410-1001
 - Инструмент NextSeq 550Dx, каталожен № 20005715
 - Инструмент NovaSeq 6000Dx, каталожен № 20068232
- [Незадължително] Вакуумен концентратор
- [FFPE] Система за откриване за PCR в реално време

Материали

Уверете се, че разполагате с необходимите материали, преди да стартирате протокола.

Някои елементи са необходими само за конкретни работни процеси. Тези елементи са посочени в отделни таблици.

Протоколът е оптимизиран и валидиран с помощта на изброените елементи. Сравнима производителност не е гарантирана при използване на алтернативни материали.

- Филтрирани накрайници за пипети
- Конични епруветки за центрофугиране, 15 ml или 50 ml
- Епруветки за микроцентрофугиране от 1,5 ml
- Многоканални резервоари за реагенти без RNase/DNase, за еднократна употреба
- Стрипове и капачки за 8 епруветки без RNase/DNase
- Серологични пипети
- 96-ямкова полипропиленова дълбокоямкова плака за съхранение, 0,8 ml (MIDI плака)
- 96-ямкови полузакрити PCR плаки с твърда основа
- [FFPE] qPCR плаки, съвместими с инструмента qPCR
- Залепващи уплътнения за 96-ямкови плаки със следните спецификации:
 - Отлепващ се, оптически прозрачен полиестер
 - Подходящо за закрити PCR плаки
 - Силно лепило, което издържа многократни температурни промени от -40°C до 110°C
 - Без DNase/RNase
- Пластмасови консумативи, съвместими с избран метод за количествено определяне

- Флуорометричен комплект за количествено определяне на dsDNA, съвместим с избрана система за количествено определяне:
 - За количествено определяне на предварително обогатени амплифицирани библиотеки може да се използва комплект за количествено определяне с широк обхват.
 - За количествено определяне на обогатени библиотеки обхватът на комплекта за количествено определяне зависи от използвания панел на сондата.
- Комплект за анализ на фрагменти за качествено определяне на библиотека с избрана система за качествено определяне:
 - За качествено определяне на предварително обогатени амплифицирани библиотеки може да се използва комплект с широк обхват.
 - За качествено определяне на обогатени библиотеки обхватът на комплекта за качествено определяне зависи от използвания панел на сондата.
- [Незадължително] Комплект за екстракция на ДНК от човешки клетки и тъкани. Можете да използвате всеки валидиран метод за екстракция.

Събиране, транспортиране и съхранение на проби



ВНИМАНИЕ

Работете с всички проби така, сякаш са потенциално инфекциозни агенти.

- Този анализ е съвместим с геномна ДНК, получена от човешки клетки и тъкани.
- За наличната в търговската мрежа пречистена gDNA се уверете, че пробите са транспортирани при правилните условия и съхранени съгласно инструкциите на производителя. Следвайте най-добрите практики за съхранение и цикли на замразяване-размразяване на gDNA.
- За въвеждане на цяла кръв следвайте изискванията за вземане, транспортиране и съхранение на кръв, приложими към избрания метод за екстракция на ДНК. Може да се приложи всеки от валидираните методи за екстракция. Транспортирането на цяла кръв трябва да отговаря на националните, федералните, щатските и местните разпоредби за транспортиране на етиологични агенти.
- За екстракция на ДНК от FFPE тъкан може да се използва всеки валидиран метод за екстракция. Следвайте инструкциите и препоръките, приложими към избрания метод за екстракция, за да определите следните практики:
 - Метод за фиксиране във формалин и вграждане в парафин за тъкани, за да се осигури най-добро качество на екстрахираната ДНК.
 - Съхранение на FFPE проби.

- Изискванията към изходния материал, като броя и дебелината на FFPE срезове. Повечето методи за пречистване препоръчват използването на прясно изрязани срезове.

Предупреждения и предпазни мерки

- Реагентите Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit съдържат потенциално опасни химикали. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Носете предпазно оборудване, включително защита за очи, ръкавици и лабораторна престилка, подходящи за риска от експозиция. Третирайте използваните реагенти като химичен отпадък и ги изхвърляйте съгласно приложимите регионални, национални и местни закони и нормативни разпоредби. За информация относно околната среда, здравето и безопасността направете справка с информационния лист за безопасност (ИЛБ) на адрес support.illumina.com/sds.html.
- Работете с всички кръвни проби така, сякаш е известно, че са заразни за човешкия имунодефицитен вирус (ХИВ), вируса на човешкия хепатит В (ХБВ) и други патогени, пренасяни в кръвта (универсални предпазни мерки).
- Използвайте обичайните лабораторни предпазни мерки. Не пипетирайте с уста. Не яжте, не пийте и не пушете в определените работни зони. Носете ръкавици за еднократна употреба и лабораторни престилки при работа с проби и комплекти с реагенти. Измийте внимателно ръцете си след работа с проби и комплекти с реагенти.
- За да се предотврати разграждането на пробата или реагента, се уверете, че всички изпарения от почистването с натриев хипохлорит са се разсеяли напълно, преди да започнете протокола.
- Замърсяването на пробите с други PCR продукти/ампликони може да причини неточни и ненадеждни резултати. За да избегнете замърсяване, използвайте следните най-добри практики:
 - Използвайте подходящи лабораторни практики и лабораторна хигиена.
 - Изпълнете стъпките на работния процес в определените зони преди и след амплификация.
 - Съхранявайте използваните реактиви, преди да почистите библиотеките в зоната преди амплификация.
 - Отделете предамплификационните реагенти от постаамплификационните реагенти.
 - Уверете се, че зоните преди и след амплификация разполагат със специално оборудване, като пипети, крайници за пипети, вортекс и центрофуга.
- Избягвайте кръстосано замърсяване. Използвайте нови крайници за пипети за отделните проби и дозирания на реагенти. Използването на филтрираните крайници намалява риска от пренасяне на ампликон и кръстосана контаминация от проба към проба.
 - Когато добавяте или прехвърляте проби или основни смеси на реагенти, сменяйте крайниците между всяка проба.
 - Когато добавяте индексни адаптери с многоканална пипета, сменяйте крайниците между всеки ред или всяка колона. Ако използвате едноканална пипета, сменяйте крайниците между всяка проба.

- Отстранете неизползваните индексни адаптерни плаки от работната зона.
- Използвайте следните най-добри практики за стъпките на промиване с етанол:
 - Задължително пригответе пресен 80% етанол. Етанолът може да абсорбира влага от въздуха, което може да повлияе на резултатите.
 - Уверете се, че всичкият етанол е отстранен от дъното на ямките по време на стъпките за измиване. Остатъчният етанол може да повлияе на резултатите.
 - Придържайте се към определеното време за сушене за стъпките на магнитната стойка, за да осигурите пълно изпаряване. Остатъчният етанол може да повлияе на производителността на последващите реакции.
- Винаги пригответе основни смеси преди употреба и никога не съхранявайте комбинираните работни разтвори.
- Производителността на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не е гарантирана, когато процедурите не се следват, както е посочено в листовката.
- Не използвайте компоненти на комплекта след изтичане на срока на годност върху етикета на комплекта.
- Не разменяйте компоненти на комплекта от различни комплекти Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Комплектите са идентифицирани на етикета на комплекта.

Процедурни бележки

Препоръки за входяща ДНК

Протоколът за Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим с висококачествени входящи двойноверижни геномни ДНК (gDNA) от 50 – 1000 ng.

Уверете се, че първоначалната gDNA проба не съдържа >1 mM EDTA и не съдържа органични замърсители, като фенол и етанол. Тези вещества могат да повлияят на реакцията на маркиране и да доведат до неуспех на анализа.

Входяща gDNA ≥ 50 ng

За входяща gDNA между 50 – 1000 ng не се изисква количествено определяне и нормализиране на първоначалната gDNA проба.

Входяща gDNA <50 ng

Могат да се използват входящи ДНК от 10 – 50 ng със следните корекции:

- Ако се използва входяща gDNA от 10 – 49 ng, се препоръчва количествено определяне на първоначалната gDNA проба, за да се определи броят на PCR циклите, необходими след тагментирането. Използвайте метод, основан на флуорометрия, за количествено определяне на входяща двойноверижна gDNA. Избягвайте методи, които измерват общата нуклеинова киселина, като NanoDrop или други методи за UV абсорбция.
- Този протокол не нормализира крайните добиви на предварително обогатена библиотека от gDNA от 10 – 49 ng и следователно е необходимо количествено определяне и нормализиране на библиотеките преди и след обогатяването.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е характеризирани и потвърден за входящи ДНК от 50 – 1000 ng. Еквивалентната производителност на продукта не може да бъде гарантирана за входящи gDNA <50 ng.

Препоръки за входяща кръв

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместима с gDNA, екстрахирана от периферна цяла кръв. Може да се приложи всеки от валидираните методи за екстракция. При извличане на gDNA от цяла кръв не се изисква първоначално количествено определяне на входящата ДНК и Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit произвежда нормализирани добиви от предварително обогатена библиотека.

Следните фактори могат да повлияят неблагоприятно на количеството ДНК, получено от проби от цяла кръв и следователно на нормализирането на библиотеката:

- Възраст на кръвната проба
- Условия на съхранение
- Основни медицински състояния, засягащи броя на белите кръвни клетки

Препоръки за входяща FFPE тъканна проба

Използвайте следните критерии за качество на ДНК от FFPE, за да определите подходящото въвеждане за успешна подготовка на библиотеката:

- За FFPE проби със стойност на ΔCq от ≤ 5 препоръчителната входяща ДНК е 50 – 1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx не се препоръчва за FFPE проби с лошо качество с $\Delta Cq > 5$. Използването на проби с $\Delta Cq > 5$ е възможно, но може да увеличи шансовете за неуспешна подготовка на библиотеката или да намали ефективността на анализа.

FFPE екстракция

Използвайте метод за изолиране на нуклеинови киселини, който дава висок добив на възстановяване, свежда до минимум потреблението на пробата и запазва целостта на пробата. Можете да използвате всеки валидиран метод за екстракция на ДНК от FFPE проби. За gDNA, извлечена от FFPE тъкан, се изисква първоначално количествено определяне на входящата ДНК и Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не произвежда нормализирани добиви от предварително обогатена библиотека.

Качествено определяне на ДНК в FFPE

gDNA, екстрахирана от FFPE тъкан, трябва да бъде качествено определена преди употреба. За оптимална производителност оценете качеството на ДНК пробата, като използвате валидиран метод за екстракция за качествено определяне на ДНК, екстрахирана от FFPE проби. Протоколът Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим с FFPE ДНК проби със стойност на ΔCq от ≤ 5 . Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не се препоръчва за FFPE проби с лошо качество с $\Delta Cq > 5$. Използването на проби с $\Delta Cq > 5$ е възможно, но може да увеличи шансовете за неуспешна подготовка на библиотеката или да намали ефективността на анализа.

[Незадължително] Референтни FFPE проби

Използвайте характеризирани референтни материали, като Horizon HD799 (ДНК), като положителна контрола при изпълнение на протокола. Квалифицирани FFPE материали от ксенотрансплантати, получени от клетъчна линия, също могат да се използват като референтни проби. Използвайте флуорометричен метод за количествено определяне на референтните материали преди употреба.

ЗАБЕЛЕЖКА Изпълнението на референтна проба с положителна контрола или контрола без шаблон изразходва реагенти и намалява общия брой неизвестни проби, които могат да бъдат обработени.

Препоръки за въвеждане на проби

Примерните препоръки за въвеждане на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit са обобщени в следващата таблица.

Таблица 1 Препоръки за въвеждане на проби

Тип входяща проба	Количество входяща проба	Изисква се количествено определяне на входяща ДНК	Изисквано качество на входяща ДНК	Нормализиран добив на предварително обогатена библиотека
gDNA	10 – 49 ng	Да	Отношение 260/280 от 1,8 – 2,0	Не

Тип входяща проба	Количество входяща проба	Изисква се количествено определяне на входяща ДНК	Изисквано качество на входяща ДНК	Нормализиран добив на предварително обогатена библиотека
gDNA	50 – 1000 ng	Не	Отношение 260/280 от 1,8 – 2,0	Да
gDNA от кръв	50 – 1000 ng	Не	Отношение 260/280 от 1,8 – 2,0	Да
gDNA от FFPE	50 – 1000 ng	Да	ΔCq стойност от ≤5	Не

Препоръчителните PCR цикли за eBLTS PCR програмата се коригират въз основа на входната концентрацията и качеството на пробата. За повече информация направете справка с [Амплифициране на тагментирана ДНК на страница 31](#).

Съвети и техники

Избягване на кръстосано замърсяване

- Когато добавяте или прехвърляте проби, сменяйте крайниците между *всяка проба*.
- Когато добавяте индексни адаптери с многоканална пипета, сменяйте крайниците между *всеки ред* или *всяка колона*. Ако използвате едноканална пипета, сменяйте крайниците между всяка проба.

Запечатване на плаката

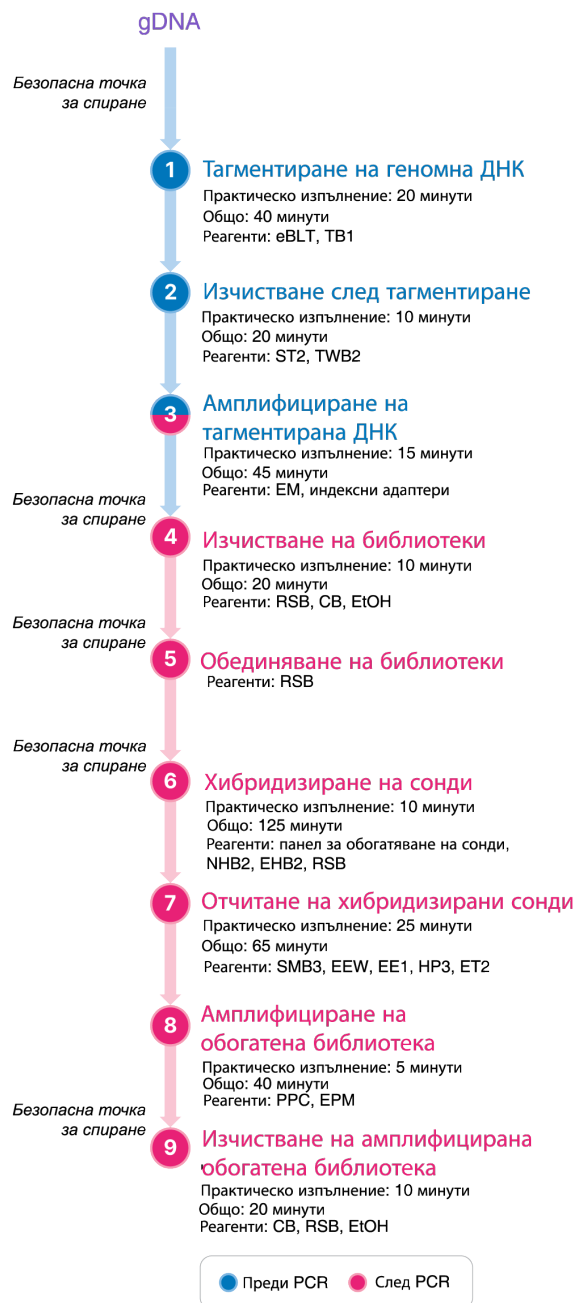
- Винаги запечатвайте 96-ямковата плака с ново залепващо уплътнение чрез използване на гумена ролка за покриване на плаката преди следващите стъпки в протокола:
 - Стъпки за разбъркване
 - Стъпки за инкубиране. Неправилното запечатване на плаката може да доведе до изпаряване по време на инкубацията.
 - Стъпки на центрофугата
 - Стъпки на хибридизация
- Уверете се, че ръбовете и ямките са напълно запечатани, за да намалите риска от кръстосано замърсяване и изпаряване.
 - Ако се наблюдава някаква течност или конденз върху запечатването или страните на ямките на плаката, центрофугирайте, ако е необходимо, преди да разпечатате.
- Поставете плаката върху равна повърхност, преди бавно да отстраните уплътнението.

Боравене с Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Съхранявайте епруветката с начална концентрация на eBLTS изправена в хладилник, така че микросферите винаги да са потопени в буфера.
- Непосредствено преди употреба вортексирайте епруветката с начална концентрация на eBLTS внимателно, докато микросферите се ресуспендират. За да избегнете повторно утаяване на микросферите, не се препоръчва центрофугиране преди пипетиране.
- Ако микросферите са полепнали от страни или отгоре на 96-ямкова плака, центрофугирайте при 280 × g за 3 секунди и след това пипетирайте, за да ресуспендирате.
- Когато промивате eBLTS:
 - Използвайте подходящата магнитна стойка за плаката.
 - Дръжте плаката на магнитната стойка, докато инструкциите не посочат да я премахнете.
 - Ако микросферите биват аспирирани в крайниците на пипетата, разпределете обратно в плаката на магнитната стойка и изчакайте, докато течността стане бистра (2 минути).

Работен процес на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Следната диаграма показва работния процес на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Между стъпките са маркирани точки за безопасно спиране. Прогнозите за време се основават на обработка на 12 проби при 12-плексно обогатяване.



Инструкции за употреба

Тази глава описва протокола за Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Прегледайте планирания пълен работен процес за секвениране, от пробата до анализа, за да осигурите съвместимост на продуктите и експерименталните параметри.
- Преди да продължите, проверете съдържанието на комплекта и се уверете, че имате необходимите компоненти, оборудване и материали.
 - Биотинилираните сонди на трети страни трябва да отговарят на специфични изисквания. Направете справка с [Изисквания към панелите на сондата за обогатяване на страница 11](#), за да се уверите, че вашите сонди на трети страни отговарят на изискванията.
- Следвайте протокола в показания ред, като използвате посочените обеми и параметри за инкубация.
- Освен ако в протокола не бъде посочена точка за безопасно спиране, продължете незабавно със следващата стъпка.
- Когато създавате основна смес, излишъкът е включен в предоставените обеми.
- Уверете се, че използвате подходящата магнитна стойка за вашия тип плака.

Подготовка за обединяване

Тази стъпка е необходима, за да се осигури успешна последователност на обогатени библиотеки. Обединяването на библиотеки може да се случи преди обогатяване и преди секвениране.

Преди обогатяване – Индивидуалните индексирани амплифицирани библиотеки се събират заедно за обогатяване с избрания панел на сондата. Това създава мултиплексното обединяване от обогатени библиотеки. За входящата FFPE проба обработването е тествано и се препоръчва изключително за 1-плексни реакции на обогатяване. За висококачествена gDNA са тествани 12-плексни, но са възможни 2-плексни до 11-плексни.

Преди секвениране – 1-плексни обогатени библиотеки и/или мултиплексни обогатени библиотеки се обединяват заедно преди секвениране. Броят на обогатените библиотеки, които могат да бъдат секвенирани, зависи от целевата дълбочина на разчитане за всяка проба във вашата система за секвениране.

Уникално двойно индексирание

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit използва уникални двойни индекси.

- Двойно индексиранияте библиотеки добавят Index 1 (Индекс 1) (i7) и Index 2 (Индекс 2) (i5) секвенции, за да генерират уникално маркирани библиотеки.
- UD индексите имат различни, несвързани индексни последователности за Index Read (Индексно разчитане) i7 и i5. Индексите са дълги 10 бази.

Избирането на индексни адаптери с разнообразни последователности за обединени библиотеки оптимизира цветовия баланс за успешна последователност и анализ на данни. Плексните обединявания, които са ≥ 10 -плексни, по своята същност са цветово балансирани, така че можете да използвате всяка комбинация от индексни адаптери. По време на вашето изпълняване на секвениране DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module предоставя опции за цветово балансирани индексни комбинации и ви уведомява, ако няма достатъчно разнообразие в избраните индексни комбинации.

За информация относно секвенции на индексни адаптери Illumina UD и оформления на плаки направете справка с [Допълнение: индексни адаптерни секвенции на Illumina UD на страница 67](#).

Поддържани плексности за обогатяване

Реагентите Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit са конфигурирани и тествани при 1-плексно и 12-плексно обогатяване. Въпреки че са възможни други плексности на обогатяване, някои от тях изискват допълнителна подготовка на библиотеката преди обогатяване и реактиви на панела на сондата за обогатяване.

Получаването на подходящ добив на обогатяване за нестандартни плексности за обогатяване може да изисква допълнителна оптимизация. Оптималните резултати не са гарантирани.

- **Плексност на обогатяване** – Броят на предварително обогатените библиотеки (1 – 12), обединени заедно в една реакция на обогатяване за хибридизация с панелите за обогатяване на сондата. Например комбинирането на 12 предварително обогатени библиотеки заедно създава 12-плексно обединяване за обогатяване.
- **Реакция на обогатяване** – Броят на уникалните препарати за реакция на обогатяване, независимо от броя на предварително обогатените библиотеки, обединени за реакция. Например една реакция на обогатяване може да подготви 1-плексно или 12-плексно обединяване за обогатяване.

За да изчислите общия брой на обогатените след това библиотеки, умножете плексността на обогатяване на реакция по броя на реакциите на обогатяване. Например една реакция на обогатяване на 12-плексно обединяване за обогатяване произвежда обединяване от 12 обогатени след това библиотеки.

При обединяване на предварително обогатени библиотеки реактивите на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit поддържат следните реакции на обогатяване и плексност.

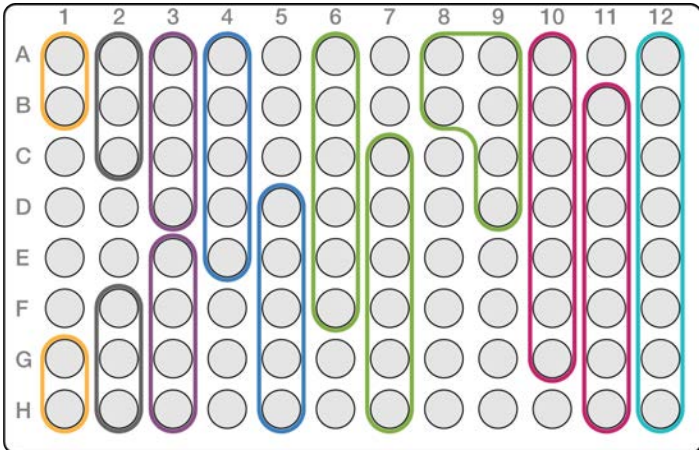
Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Reagents	Реакции за обогатяване	Плексност на обогатяването
Комплект с 16 проби	16 реакции	1-плексно
Комплект с 96 проби	8 реакции	12-плексно

Двуплексни до осемплексни стратегии за обединяване

Следващата таблица показва индексни адаптери (ямки), които могат да се комбинират в 2 – 8-плексни обединявания, докато цветно кодираната фигура илюстрира всяка комбинация.

Обединете всяка плексност ≥ 2 от горната или долната част на колона. Не обединявайте на един ред.

Плексност	Комбинации	Цвят във фигура
2	Първите две или последните две ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • А и В • G и H Редове С – F не се използват.	Оранжево
3	Първите три или последните три ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • А – С • F – H Редове D и E не се използват.	Сиво
4	Първите четири или последните четири ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • А – D • E – H 	Лилаво
5	Първите пет или последните пет ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • А – E • D – H 	Синьо
6	[Опция 1] Първите шест или последните шест ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • А – F • C – H [Опция 2] Първите две ямки (А и В) или последните две ямки (G и H) в една колона и всякакви четири ямки в съседна колона.	Зелено
7	Първите седем или последните седем ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • А – G • В – H 	Розово
8	Цялата колона	Синьо-зелено

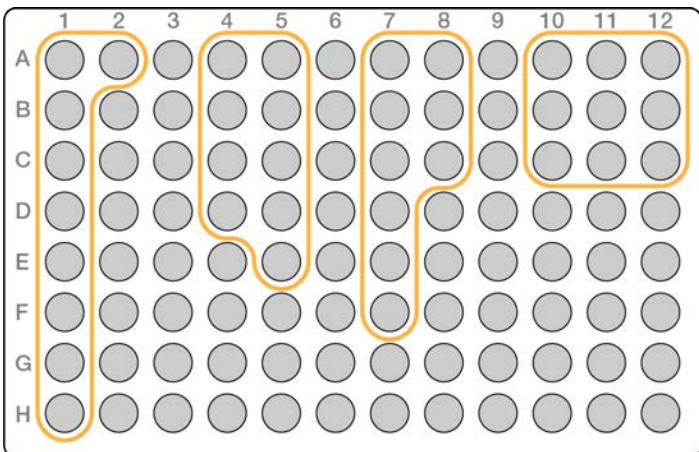


Стратегии за деветплексно обединяване

Използвайте индексните адаптери от които и да е ямки, които оптимизират цветовия баланс в изпълняване на секвениране, например:

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

Следващата фигура изобразява и четирите примера.



Тагментиране на геномна ДНК

Тази стъпка използва Enrichment BLT Small (eBLTS) за тагментиране на ДНК, което е процес, който фрагментира и маркира ДНК с адаптерни секвенции.

Консумативи

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (червена капачка)
- TB1 (тагментационен буфер 1)
- Вода без нуклеаза
- 96-ямкова PCR плака
- Адхезивно запечатване
- Епруветки за микроцентрифугиране от 1,7 ml
- Стрип от 8 епруветки
- Накрайници за пипета
 - Многоканални пипети от 200 µl

**ВНИМАНИЕ**

Този набор от реагенти съдържа потенциално опасни химикали. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Носете предпазно оборудване, включително защита за очи, ръкавици и лабораторна престилка, подходящи за риска от експозиция. Третирайте използваните реагенти като химичен отпадък и ги изхвърляйте съгласно приложимите регионални, национални и местни закони и нормативни разпоредби. За информация относно околната среда, здравето и безопасността направете справка с информационния лист за безопасност (ИЛБ) на адрес support.illumina.com/sds.html.

Относно реагентите

- eBLTS трябва да се съхранява при температури от 2°C до 8°C. Не използвайте eBLTS, който е бил съхраняван под 2°C.
- Не центрофугирайте eBLTS.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи

Артикул	Съхранение	Инструкции
eBLTS (жълта капачка)	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура. Вортексирайте непосредствено преди употреба, за да се смеси. Не центрофугирайте преди пипетиране.
TB1	-25°C до -15°C	Оставете до достигане на стайна температура. Вортексирайте, за да се смесят.

2. Вортексирайте или пипетирайте ДНК и след това центрофугирайте за кратко.
3. Запазете следната TAG програма на термоциклера:
 - Изберете опцията за предварително затоплен капак и я настройте на 100°C
 - Настройте обема на реакцията на 50 µl
 - 55°C за 5 минути
 - Задръжете на 10°C

Процедура

1. Добавете 2 – 30 µl ДНК към всяка ямка на 96-ямкова PCR плака, така че общото въведено количество да е 50 – 1000 ng.
Ако обемът на ДНК <30 µl, добавете вода без нуклеаза към ДНК пробите, за да доведете общия обем до 30 µl.
2. Вортексирайте eBLTS внимателно, докато микросферите се ресуспендират напълно.
3. Комбинирайте следните обеми в епруветка, за да пригответе основната смес за тагментиране. Умножете всеки обем по броя на пробите, които се обработват.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Излишъкът на реагента е включен в обема.
4. Пипетирайте старателно основната смес за тагментиране, за да се смеси.
5. Разделете обема на основната смес за тагментиране по равно в стрип с 8 епруветки.
6. Като използвате многоканална пипета от 200 µl, прехвърлете 20 µl основна смес за тагментиране към всяка ямка на PCR плаката, съдържаща проба. Използвайте пресни крайници за всяка колона или ред с проби.
7. Изхвърлете стрипа с 8 епруветки, след като основната смес за тагментиране бъде дозирана.
8. Като използвате многоканална пипета от 200 µl, настроена на 40 µl, пипетирайте всяка проба 10 пъти за смесване. Използвайте пресни крайници за всяка колона с проби.
Като алтернатива запечатайте PCR плаката и използвайте шейкъра за плаки на 1600 об./мин за 1 минута.
9. Запечатайте плаката, след това поставете върху предварително програмирания термоциклер и изпълнете програмата TAG.
10. Изчакайте, докато TAG програмата достигне температура на задържане от 10°C, и след това премахнете плаката веднага.
11. Оставете 96-ямкова PCR плака на стайна температура за 2 минути и след това продължете към следващата стъпка.

Изчистване след тагментиране

Тази стъпка промива маркираната с адаптер ДНК на eBLTS преди PCR амплификация.

Консумативи

- ST2 (тагментационен буфер за спиране 2)
- TWB2 (тагментационен промиващ буфер 2)
- Магнитна стойка за 96-ямкова PCR плака
- Адхезивно запечатване
- Стрип от 8 епруветки
- Накрайници за пипета
 - Многоканални пипети от 20 µl
 - Многоканални пипети от 200 µl
- Подгответе за по-късна процедура:
 - EPM (подобнена PCR смес)
 - Индексна адаптерна плака

Относно реагентите

- Уверете се, че използвате подходящата магнитна стойка за вашата плака. Използването на магнитна стойка за MIDI плака за PCR плака може да попречи на TWB2 да се прилепи към микросферите.
- Пипетирайте бавно TWB2, за да сведете до минимум образуването на пяна, за да избегнете аспирация на неправилен обем и непълно смесване.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи

Артикул	Съхранение	Инструкции
EPM	-25°C до -15°C	Размразете върху лед за 1 час. Обърнете, за да смесите, след това центрофугирайте за кратко.
ST2	15°C до 30°C	Ако се наблюдават преципитати, загрейте при 37°C за 10 минути и след това разбъркайте на вортекс, докато преципитатите се разтворят. Използвайте на стайна температура.
TWB2	15°C до 30°C	Използвайте на стайна температура.
Индексна адаптерна плака	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура за 30 минути.

Процедура

1. Добавете 10 µl ST2 към всяка реакция на тагментиране. Ако използвате многоканална пипета, пипетирайте ST2 в стрип от 8 епруветки и след това прехвърлете подходящите обеми в PCR плаката. Използвайте пресни крайници за всяка колона или ред с проби.
2. Като използвате пипета от 200 µl, настроена на 50 µl, бавно пипетирайте всяка ямка 10 пъти, за да ресуспендирате микросферите.
Като алтернатива запечатайте плаката и разклатете на 1600 об./мин за 1 минута. Повторете, ако е необходимо.
3. Запечатайте плаката и след това центрофугирайте на 280 × g за 10 секунди.
4. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
5. Поставете на магнитната стойка за PCR плака и изчакайте до избистрянето на течността (3 минути).
6. [≤48 проби] Измийте три пъти, както следва.
 - a. Като използвате многоканална пипета от 200 µl, настроена на 60 µl, отстранете и изхвърлете супернатанта, без да нарушавате гранулата с микросфери.
 - b. Отстранете от магнитната стойка.
 - c. Веднага след това бавно добавете 100 µl TWB2 директно върху микросферите.
 - d. Пипетирайте бавно, докато микросферите се ресуспендират напълно. Като алтернатива запечатайте плаката и разклатете на 1600 об./мин за 1 минута.
 - e. Ако се получи пръскане, центрофугирайте при 280 × g за 10 секунди.
 - f. Поставете на магнитната стойка за PCR плака и изчакайте до избистрянето на течността (3 минути).
Оставете плаката върху магнитната стойка и TWB2 в ямки, за да предотвратите пресушаване при извършване на третото промиване. Отстранете и изхвърлете супернатанта, след като сте подготвили основната смес за PCR.
 - g. Като използвате многоканална пипета от 200 µl, настроена на 100 µl, отстранете и изхвърлете супернатанта.
 - h. Повторете стъпките с – f два пъти за общо три измивания.
7. [>48 проби] Измийте три пъти, както следва.
 - a. Изпълнете стъпки b и c на 1 до 2 колони едновременно, докато всички колони бъдат обработени, за да предотвратите пресушаване.
 - b. Като използвате многоканална пипета от 200 µl, настроена на 60 µl, отстранете и изхвърлете супернатанта.
 - c. Отстранете от магнитната стойка.
 - d. Веднага след това бавно разпределете 100 µl TWB2 директно върху микросферите.
 - e. Пипетирайте бавно, докато микросферите се ресуспендират напълно. Като алтернатива запечатайте плаката и разклатете на 1600 об./мин за 1 минута.
 - f. Ако се получи пръскане, центрофугирайте при 280 × g за 10 секунди.

- g. Поставете на магнитната стойка за PCR плака и изчакайте до избистрянето на течността (3 минути).
Оставете плаката върху магнитната стойка и TWB2 в ямки, за да предотвратите пресушаване при извършване на третото промиване. Отстранете и изхвърлете супернатанта, след като сте подготвили основната смес за PCR.
 - h. Като използвате многоканална пипета от 200 µl, настроена на 100 µl, отстранете и изхвърлете супернатанта.
 - i. Премахнете от магнитната стойка и бавно добавете 100 µl TWB2 директно върху микросферите.
 - j. Повторете стъпки h и i на стъпки от 1 или 2 колони, докато всички колони бъдат обработени.
 - k. Повторете стъпките e – h два пъти за общо три промивания.
8. Задръжте на магнитната стойка до стъпка 4 от раздела *Процедура в Амплифициране на тагментирана ДНК*.
TWB2 остава в ямките, за да се предотврати прекомерното изсушаване на микросферите.

Амплифициране на тагментирана ДНК

Тази стъпка амплифицира тагментираната ДНК чрез използване на PCR програма с ограничен цикъл. PCR стъпката добавя Index 1 (Индекс 1) (i7) адаптери, Index 2 (Индекс 2) (i5) адаптери и секвенции, задължителни за генериране на клъстери за секвениране.

Консумативи

- ЕРМ (Подобрена PCR смес)
- Индексна адаптерна плака
- 96-ямкова PCR плака
- Вода без нуклеаза
- Адхезивно запечатване
- Епруветки за микроцентрифугиране от 1,5 ml
- Накрайници за пипета
 - Многоканални пипети от 20 µl
 - Многоканални пипети от 200 µl

Относно реагентите

- Индексни адаптерна плаки
 - Ямката може да съдържа >10 µl индексни адаптери.
 - Не добавяйте проби към индексните адаптерни плаки.
 - Всяка ямка на индексна плака е за еднократна употреба.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи

Артикул	Съхранение	Инструкции
ERM	-25°C до -15°C	Размразете на 4°C или върху лед за 1 час. Обърнете, за да смесите, след това центрофугирайте за кратко.
Индексна адаптерна плака	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура за 30 минути.

2. Запишете следната eBLTS PCR програма на термоциклер чрез използване на подходящ брой PCR цикли, показани на таблицата по-долу.

- Изберете опцията за предварително затоплен капак и я настройте на 100°C
- Настройте обема на реакцията на 50 µl
- 72°C за 3 минути
- 98°C за 3 минути
- X цикъла от:
 - 98°C за 20 секунди
 - 60°C за 30 секунди
 - 72°C за 1 минута
- 72°C за 3 минути
- Задръжте на 10°C

Общото време за изпълнение е ~38 минути за 9 цикъла и ~46 минути за 12 цикъла.

Тип входяща проба	Брой PCR цикли (X)
10 – 49 ng gDNA	12
50 – 1000 ng gDNA	9
50 – 1000 ng gDNA, екстрахирана от FFPE	12
gDNA, екстрахирана от кръв	9

Процедура

1. Комбинирайте следното, за да пригответе основна смес за PCR. Умножете всеки обем по броя на пробите, които се обработват.

- ERM (23 µl)
- Вода без нуклеаза (23 µl)

Излишъкът на реагента е включен в обема.

2. Пипетирайте главната смес за PCR 10 пъти, за да се смеси, след което центрофугирайте за кратко.
3. С плаката върху магнитната стойка използвайте многоканална пипета от 200 µl, за да премахнете и изхвърлите TWB2.
Пяната, която остава по стените на ямката, не влияе неблагоприятно на библиотеката.
4. Отстранете от магнитната стойка.
5. Незабавно добавете 40 µl от главната смес за PCR директно върху микросферите във всяка ямка.
6. Незабавно пипетирайте, за да смесите, докато микросферите не бъдат напълно ресуспендирани.
Като алтернатива запечатайте плаката и разклатете на 1600 об./мин за 1 минута.
7. Запечатайте плаката с пробата и центрофугирайте за 280 × g за 10 секунди.
8. Центрофугирайте плаката с индексния адаптер при 1000 × g за 1 минута.
9. Пригответе плаката с индексния адаптер.
 - [<96 проби] Продупчете запечатващото фолио върху плаката с индексния адаптер с нов накрайник за пипета за всяка ямка само за броя проби, които се обработват.
 - [96 проби] Подравнете новите полузакрити PCR плаки над плаката с индексния адаптер и натиснете, за да продупчите запечатващото фолио. Изхвърлете PCR плаката, използвана за продупчване на запечатващото фолио.
10. Използвайки нов накрайник за пипети, добавете 10 µl от предварително приготвени индексни адаптери към всяка ямка.
11. Като използвате пипета, настроена на 40 µl, пипетирайте 10 пъти за смесване. Като алтернатива запечатайте плаката и разклатете на 1600 об./мин за 1 минута.
12. Запечатайте плаката и след това центрофугирайте на 280 × g за 10 секунди.
13. Поставете върху термоциклера и стартирайте eBLTS PCR програмата.

ТОЧКА ЗА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ

Ако спирате, съхранявайте при -25°C до -15°C до 30 дни.

Изчистване на библиотеки

Тази стъпка използва двустранна процедура за пречистване на микросферите за пречистване на амплифицираните библиотеки.

Консумативи

- CB (микросфери за изчистване)
- RSB (буфер за ресуспензия)
- Прясно приготвен 80% етанол (EtOH)
- 96-ямкова 0,8 ml полипропиленова дълбокоямкова плака за съхранение (MIDI плака)
- 96-ямкова PCR плака

- Магнитна стойка за MIDI плака
- Магнитна стойка за PCR плака
- Епруветки за микроцентрифугиране от 1,5 ml
- Вода без нуклеаза

Относно реагентите

- Микросфери за изчистване
 - Вортексирайте преди всяка употреба.
 - Вортексирайте често, за да сте сигурни, че микросферите са разпределени равномерно.
 - Аспирирайте и дозирайте бавно поради вискозитета на разтвора.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи

Артикул	Съхранение	Инструкции
CB	Стайна температура	Вортексирайте и обръщайте, за да се смеси, докато цветът на течността стане хомогенен.
RSB	2°C до 8°C	Размразете за 30 минути на стайна температура. Вортексирайте, за да се смесят.

Процедура

1. Разклатете 96-ямковата PCR плака при 1800 об./мин за 1 минута и след това центрофугирайте закратко.
2. Поставете на магнитната стойка за PCR плака и изчакайте до избистрянето на течността (1 минута).
3. Вортексирайте CB 3 пъти за 10 секунди и след това обърнете няколко пъти за ресуспендиране.
4. За висококачествена gDNA направете, както следва.
 - a. Добавете 77 µl вода без нуклеаза към всяка ямка на нова MIDI плака.
 - b. Добавете 88 µl CB към всяка ямка на MIDI плаката.
 - c. Прехвърлете 45 µl супернатант от всяка ямка от PCR плаката в съответната ямка на MIDI плаката.
 - d. Изхвърлете PCR плаката.
 - e. Пипетирайте всяка ямка 10 пъти, за да се смеси. Като алтернатива запечатайте плаката и разклатете на 1800 об./мин за 1 минута.
 - f. Запечатайте плаката и я инкубирайте на стайна температура за 5 минути.
 - g. Проверете за въздушни мехурчета. Ако се наблюдават, завъртете надолу.
 - h. Поставете на магнитната стойка за MIDI плака и изчакайте до избистрянето на течността (5 минути).

- i. По време на инкубиране вортексирайте старателно СВ и след това добавете 20 µl към всяка ямка на *нова* MIDI плака.
 - j. Прехвърлете 200 µl супернатант от всяка ямка на първата MIDI плака в съответната ямка на нова MIDI плака (съдържаща 20 µl СВ).
 - k. Изхвърлете първата MIDI плака.
 - l. Пипетирайте всяка ямка на новата MIDI плака 10 пъти, за да се смеси. Като алтернатива запечатайте плаката и разклатете на 1800 об./мин за 1 минута.
5. За екстрахирана FFPE направете, както следва.
- a. Добавете 81 µl СВ към всяка ямка на нова MIDI плака.
 - b. Прехвърлете 45 µl супернатант от всяка ямка от PCR плаката в съответната ямка на MIDI плаката.
 - c. Изхвърлете PCR плаката.
 - d. Пипетирайте всяка ямка 10 пъти, за да се смеси. Като алтернатива запечатайте плаката и разклатете на 1800 об./мин за 1 минута.
6. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
7. Проверете за въздушни мехурчета. Ако се наблюдават, завъртете надолу.
8. Поставете на магнитната стойка за MIDI плака и изчакайте до избистрянето на течността (5 минути).
9. Без да се нарушават микросферите, премахнете и изхвърлете супернатанта.
10. Измийте микросферите по описания по-долу начин.
- a. С плаката на магнитната стойка добавете 200 µl прясна 80% EtOH без смесване.
 - b. Инкубирайте за 30 секунди.
 - c. Без да се нарушават микросферите, премахнете и изхвърлете супернатанта.
11. Измийте микросферите **втори** път.
12. Изсушете на въздух на магнитната стойка за 5 минути.
13. Когато сушите на въздух, използвайте пипета от 20 µl, за да премахнете и изхвърлите остатъчния EtOH.
14. Отстранете от магнитната стойка.
15. Добавете 17 µl RSB към микросферите.
16. Запечатайте плаката и разклатете на 1800 об./мин за 2 минути.
17. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 2 минути.
18. Проверете за въздушни мехурчета. Ако се наблюдават, завъртете надолу.
19. Поставете плаката на магнитната стойка за MIDI плака и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
20. Прехвърлете 15 µl от супернатанта към новата 96-ямкова PCR плака.

ТОЧКА ЗА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката и съхранявайте при -25°C до -15°C до 30 дни.

Обединяване на предварително обогатени библиотеки

Тази стъпка комбинира ДНК библиотеки с уникални индекси в едно обединяване до 12 библиотеки.

Методи за обединяване

Можете да обединявате по обем или маса. Използвайте следната таблица, за да определите подходящия метод за вашето въвеждане.

Таблица 2 Препоръчани методи за обединяване

Входяща проба	Метод за обединяване
10 – 49 ng gDNA	Маса
50 – 1000 ng gDNA	Обем
gDNA, екстрахирана от FFPE	Маса
gDNA, екстрахирана от кръв	Обем

- Едноплексното обогатяване не изисква обединяване на предварително обогатени библиотеки. Въпреки това може да се наложи добавянето на RSB.
- След количествено определяне на предварително обогатената библиотека всички входящи типове проби могат да бъдат обединени по маса, за да се постигне оптимален индексен баланс.
- Крайният добив на предварително обогатени библиотеки, генерирани в отделни експериментални препарати, може да варира. Следователно се препоръчва обединяване по маса, за да се постигне оптимален индексен баланс.
- Използвайте 1-плексно обогатяване за следните ситуации.
 - 10 – 49 ng gDNA
 - 50 – 1000 ng gDNA, екстрахирана от FFPE
 - Откриване на честота на ниски второстепенни алели за обозначаване на соматичен вариант.

Обединяване по маса

За следните ситуации определете количествено вашите библиотеки, за да използвате ДНК маса на библиотека за обогатяване, посочена в [Обединяване на предварително обогатени библиотеки при еднаква концентрация на страница 37](#).

- Входяща проба с gDNA от 10 – 49 ng
- Входяща проба с gDNA, екстрахирана от FFPE, от 50 – 1000 ng
- Откриване на честота на ниски второстепенни алели за обозначаване на соматичен вариант.
- gDNA, екстрахирана от кръв, за оптимален индексен баланс

Квалифициране на предварително обогатени библиотеки

- Изпълнете 1 µl от предварително обогатените библиотеки, като използвате предпочитания от вас метод за количествено определяне, базиран на флуоресценция, който използва интеркалиращо багрило за dsDNA.
 - За 50 – 1000 ng висококачествена gDNA очаквайте добив от ≥500 ng предварително обогатена библиотека.
 - За 50 – 1000 ng gDNA, извлечена от FFPE, очаквайте добив от 500 – 6000 ng предварително обогатена библиотека, в зависимост от качеството на първоначалната проба.

ЗАБЕЛЕЖКА За методи за количествено определяне с различни отклонения квалифицирайте метода за количествено определяне за този работен процес. Резултатите от концентрацията може да се различават в зависимост от използвания метод.

Обединяване на предварително обогатени библиотеки при еднаква концентрация

Използвайте следната таблица, за да определите ДНК масата на библиотека, необходима за обогатяване, според типа проба и плексността на обогатяване. Оптималните добиви на обогатяване и производителността на анализа не са гарантирани, когато се използват по-ниски добиви на предварително обогатена библиотека от препоръчаните.

Общата маса на ДНК в реакцията на обогатяване не трябва да надвишава 6000 ng.

Входяща проба	Плексност на обогатяването	ДНК маса на библиотека (ng)	Обща маса на ДНК библиотека (ng)
Висококачествена gDNA	12	250 – 500	3000 – 6000
gDNA, екстрахирана от FFPE	1	200	200

- Запишете индексите за библиотеките, които планирате да обедините в тази стъпка.
- Въз основа на концентрацията на всяка библиотека изчислете обема, който трябва да се добави към реакцията на обогатяване, за да се постигне необходимата маса на ДНК.
 - Висококачествена gDNA: Изчислете обема на библиотеката, необходим за въвеждане на 250 – 500 ng.
 - gDNA, извлечена от FFPE: Изчислете обема на библиотеката, необходим за въвеждане на 200 ng.
- Добавете изчисления обем за всяка библиотека в същата ямка на PCR плаката.

4. Ако използвате висококачествена gDNA, изпълнете едно от следните въз основа на общия обем на обединените предварително обогатени библиотеки:
- Ако обемът на предварително обогатената библиотека = 30 µl, преминете към [Хибридиране на сонди на страница 39](#).
 - Ако обемът на предварително обогатената библиотека е <30 µl, добавете RSB, за да достигнете 30 µl общ обем.
 - Ако обемът на предварително обогатената библиотека е >30 µl, използвайте метод на основата на микросферите или вакуумен концентратор, за да концентрирате обединената проба. Добавете RSB към концентрираната обединена проба, за да достигнете 30 µl общ обем.
5. Ако използвате gDNA, екстрахирана от FFPE, изпълнете едно от следните въз основа на общия обем на обединените предварително обогатени библиотеки:
- Ако обемът на предварително обогатената библиотека = 7,5 µl, преминете към [Хибридиране на сонди на страница 39](#).
 - Ако обемът на предварително обогатената библиотека е <7,5 µl, добавете RSB, за да достигнете 7,5 µl общ обем.

ТОЧКА ЗА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката и съхранявайте при -25°C до -15°C до 30 дни.

Обедняване по обем

Когато въвеждането е gDNA от 50 – 1000 ng, не се изисква количествено определяне и нормализиране на отделни библиотеки, генерирани в същото изследване.

За да постигнете оптимална производителност, обединявайте само предварително обогатени библиотечни проби, приготвени от същия потребител, партида реагент и индексна адаптерна плака.

- Запишете индексите за библиотеките, които планирате да обедините в тази стъпка.
- Комбинируйте следните предварително обогатени библиотечни и RSB обеми за вашата плексност на обогатяване в една и съща ямка на нова PCR плака.
Полученият обем е 30 µl.

Плексност на обогатяването*	Всеки обем на предварително обогатената библиотека (µl)	Обем на RSB (µl)
1-плексно	14	16
2-плексно	14	2
3-плексно	10	0
4-плексно	7,5	0
5-плексно	6	0

Плексност на обогатяването*	Всеки обем на предварително обогатената библиотека (µl)	Обем на RSB (µl)
6-плексно	5	0
7-плексно	4,2	0,6
8-плексно	3,7	0,4
9-плексно	3,3	0,3
10-плексно	3	0
11-плексно	2,7	0,3
12-плексно	2,5	0

* За информация относно нестандартни плексности (2-плексност до 11-плексност) вижте [Ограничения на процедурата на страница 2](#).

ТОЧКА ЗА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката и съхранявайте при -25°C до -15°C до 30 дни.

[Незадължително] Квалифициране на предварително обогатени библиотеки

Ако обединявате по обем, за количествено определяне на предварително обогатените библиотеки използвайте флуорометричен метод, който използва интеркалиращо багрило за dsDNA. За да квалифицирате предварително обогатените библиотеки, използвайте анализатор на ДНК фрагменти с подходящия комплект за анализ на фрагменти.

Използвайте общо 1 µl за качествено определяне на библиотеката. Предварително обогатените библиотеки са достатъчно концентрирани, за да позволят малки разреждания за количествено определяне или анализ на фрагменти.

Хибридизиране на сонди

Тази стъпка свързва целевите региони на ДНК със сонди за улавяне.

Реагентите на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit са съвместими както с олигонуклеотидни панели за обогатяване на ДНК на Illumina, така и с такива на трети страни. За информация относно задължителните спецификации за панели на трети страни направете справка с [Изисквания към панелите на сондата за обогатяване на страница 11](#).

Консумативи

- ЕНВ2 (буфер за обогатяване на хибридизация 2)

- NHB2 (буфер за хибридизация 2 + IDT NXT блокери) (синя капачка)
- Панел на сондата за обогатяване
- 96-ямкова PCR плака
- Адхезивно запечатване
- Подгответе за по-късна процедура:
 - SMB3 (стрептавидин магнитни микросфери)
 - EEW (подобрен промиващ буфер за обогатяване) (кехлибарена капачка)

Относно реагентите

- NHB2 преципитира и се отделя по време на съхранение.
- Панелът на сондата за обогатяване се отнася до избрания панел от олигонуклеотиди за обогатяване от доставчик на Illumina.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи

Артикул	Съхранение	Инструкции
ЕНВ2	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура. Вортексирайте, за да се смесят. Ако се наблюдават кристали и мътност, повторете вортексирането или пипетирайте нагоре и надолу, докато разтворът стане бистър.
Панел на сондата за обогатяване	-25°C до -15°C (Illumina)	И за панелите Illumina, и за панелите на трети страни приведете до стайна температура. Вортексирайте, за да се смесят.

Артикул	Съхранение	Инструкции
NHB2 (синя капачка)	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Когато е на стайна температура, загрейте предварително в инкубатор за микропроби до същата температура като сондата, която използвате, за 5 минути. Вортексирайте на максимална скорост 3 пъти за 10 секунди всеки за ресуспендиране. Центрофугирайте за кратко. Пипетирайте нагоре и надолу от дъното на епруветката. Ако се наблюдават кристали и мътност, повторете вортексирането или пипетирайте нагоре и надолу, докато разтворът стане бистър. Използвайте го, докато е топъл, за да избегнете преципитати от преобразуването.
SMB3*	2°C до 8°C	Ако пристъпвате към следващата процедура веднага след 90-минутното задържане в НУВ програмата, охладете до стайна температура поне 2 часа преди стартиране на НУВ програмата.
EEW* (кехлибарена епруветка)	-25°C до -15°C	Ако пристъпвате към следващата процедура веднага след 90-минутното задържане в НУВ програмата, охладете до стайна температура поне 2 часа преди стартиране на НУВ програмата. Когато е на стайна температура, предварително загрейте в инкубатор за микропроби до приложимата температура на хибридизация и улавяне за 30 минути преди НУВ програмата да приключи.

*Ако спирате преди следващата процедура, отложете приготвянето на този реагент, докато стигнете до тази процедура.

- Запишете следната НУВ програма на термоциклера чрез използване на подходящ брой цикли, които са посочени в [Таблица 3](#).
 - Изберете опцията за предварително затоплен капак и я настройте на 100°C
 - Настройване на обема на реакцията
 - [Висококачествена gDNA] 100 µl

- [gDNA, екстрахирана от FFPE] 25 µl
- 98°C за 5 минути
- X цикъла от по 1 минута всеки, започвайки от 98°C за първия цикъл, след това намалявайки с 2°C на цикъл
- Задръжте 90 минути при подходящата температура:
 - [gDNA, екстрахирана от FFPE] 58 µl
 - [80 мер панели за сонда] 58°C
 - [Обозначаване на соматичен вариант] 58°C
 - [Всички други] 62°C

Общо време за изпълняване ~115 минути.

Таблица 3 Брой цикли за проба или панел

Тип проба и панел	Брой цикли (X)
gDNA, екстрахирана от FFPE (независимо от типа панел)	20
80 мер панели за сонда (независимо от типа на пробата)	20
Обозначаване на соматичен вариант	20
Всички други проби и панели	18

Процедура

1. [Висококачествена gDNA] Добавете следните реагенти *по реда, посочен* във всяка обединена библиотека, в PCR плаката.
Не създавайте основна смес. Създаването на основна смес от NHB2 и ENB2 оказва отрицателно въздействие върху производителността на обогатяването.
 - NHB2 (синя капачка) (50 µl)
 - Панел на сондата за обогатяване (10 µl)
 - ENB2 (10 µl)
2. [Висококачествена gDNA] Като използвате пипета, настроена на 90 µl, пипетирайте всяка ямка 10 пъти за смесване.
3. [gDNA, екстрахирана от FFPE] Добавете следните реагенти *по реда, посочен* във всяка обединена библиотека в PCR плаката.
Не създавайте основна смес. Създаването на основна смес от NHB2 и ENB2 оказва отрицателно въздействие върху производителността на обогатяването.
 - NHB2 (синя капачка) (12,5 µl)
 - Панел на сондата за обогатяване (2,5 µl)
 - ENB2 (2,5 µl)

4. [gDNA, екстрахирана от FFPE] Като използвате пипета, настроена на 20 µl, пипетирайте всяка ямка 10 пъти за смесване.
5. Запечатайте плаката и центрофугирайте за 280 × g за 10 секунди.
6. Поставете плаката на пробата върху предварително програмирания термоциклер и изпълнете HYB програмата.
7. Продължете незабавно към следващата процедура, когато времето за задържане на температурата на програмата HYB приключи.



ВНИМАНИЕ

Преципитацията възниква, ако температурата на реакцията на хибридизация падне под стайната температура.

Отчитане на хибридизирани сонди

На този етап се използват стрептавидин магнитни микросфери (SMB3) за улавяне на сонди, хибридизирани в целевите области, които са обект на интерес.

Консумативи

- EEW (подобрен промиващ буфер за обогатяване) (кехлибарена капачка)
- EE1 (буфер за обогатяване и елуиране 1)
- ET2 (целеви буфер за елуиране 2)
- NP3 (2N NaOH)
- SMB3 (стрептавидин магнитни микросфери)
- Епруветка за микроцентрофугиране от 1,5 ml
- 96-ямкова MIDI плака
- 96-ямкова PCR плака
- Адхезивно запечатване
- Магнитна стойка за MIDI плака
- Подгответе за по-късна процедура:
 - Подобрена PCR смес (EPM)
 - PCR праймер коктейл (PPC)

Относно реагентите

- EEW
 - Уверете се, че EEW е бил размразен при стайна температура поне 2 часа преди предварително затопляне в инкубатор за микропроби.

- Уверете се, че EEW е загрят в инкубатор за микропроби в продължение на 30 минути преди НУВ програмата да приключи.
 - Оставете EEW в инкубатор за микропроби, когато не се използва. EEW трябва да остане нагрят през целия протокол.
 - Може да бъде мътен след достигане на стайна температура.
 - Може да изглежда жълт.
- SMB3
 - SMB3 трябва да е на стайна температура преди употреба.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи.

Артикул	Съхранение	Инструкции
SMB3	2°C до 8°C	Оставете ги да престоят 2 часа, за да достигнат стайна температура. Обърнете и след това вортиксийрайте до пълното ресуспендиране.
EEW (кехлибарена епруветка)	-25°C до -15°C	След 2 часа инкубиране при стайна температура предварително загрейте в инкубатор за микропроби до приложимата температура за хибридизация и улавяне за 30 минути, преди НУВ програмата да приключи.
EE1	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура и след това вортиксийрайте.
HP3	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура и след това вортиксийрайте.
ET2	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура. Вортиксийрайте, за да се смесят.
ERM	-25°C до -15°C	Размразете върху лед за един час. Обърнете, за да смесите, след това центрофугируйте за кратко. Оставете настрана върху лед.
RPC	-25°C до -15°C	Размразете върху лед за един час. Вортиксийрайте, за да се смесят, и след това центрофугируйте за кратко. Оставете настрана върху лед.

2. Загрейте предварително един инкубатор за микропроби с вложка за MIDI топлинен блок, за да инкубирате плаката за проби до една от следните температури. Допълнителен втори инкубатор за микропроби може да се използва за предварително загряване на EEW. Поставете EEW върху вложката на MIDI топлинния блок.
 - [FFPE] 58°C

- [80 meg панели за сонда] 58°C
- [Обозначаване на соматичен вариант] 58°C
- [Всички други] 62°C

Процедура

Улавяне

1. Добавете SMB3 към съответната ямка на новата MIDI плака, както следва.
 - [Висококачествена gDNA] Добавете 250 µl SMB3.
 - [gDNA, екстрахирана от FFPE] Добавете 62,5 µl SMB3.
2. Като използвате пипета, настроена на 100 µl за висококачествена gDNA или 25 µl за FFPE, прехвърлете всяка обединена библиотека от 96-ямковата PCR плака в съответната ямка на новата MIDI плака.
3. Запечатайте плаката и разклатете на 1200 об./мин за 4 минути.
4. Ако се получи пръскане, центрофугирайте за кратко плаката.
5. Поставете плаките с обединените библиотеки върху вложката на MIDI термоблока на инкубатора за микропроби под епруветката EEW, затворете капака и след това инкубирайте за 15 минути при приложимата температура:
 - [FFPE] 58°C
 - [80 meg панел за сонда] 58°C
 - [Обозначаване на соматичен вариант] 58°C
 - [Всички други] 62°C
6. Премахнете плаката с обединени библиотеки и центрофугирайте при 280 × g за 30 секунди.
7. Незабавно поставете магнитната стойка на MIDI плаката и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
8. [Висококачествена gDNA] Като използвате пипета, настроена на 200 µl, премахнете и изхвърлете всякакъв супернатант от всяка ямка, без да се нарушава гранулата с микросфери.
9. [gDNA, екстрахирана от FFPE] Като използвате пипета, настроена на 90 µl, премахнете и изхвърлете всякакъв супернатант от всяка ямка, без да се нарушава гранулата с микросфери.
10. Премахнете и изхвърлете целия останал супернатант.

Измиване

1. Отстранете от магнитната стойка.
2. [Висококачествена gDNA] Премахнете бързо EEW от инкубатора за микропроби и добавете 200 µl към всяка ямка.
3. [gDNA, екстрахирана от FFPE] Премахнете бързо EEW от инкубатора за микропроби и добавете 50 µl към всяка ямка.
4. Върнете неизползваната EEW в инкубатора за микропроби и я загрейте.
5. Запечатайте и разклатете на 1800 об./мин за 4 минути.
6. Поставете плаките с проби върху вложката на MIDI термоблока в инкубатора за микропроби под епруветката EEW, затворете капака и след това инкубирайте за 5 минути при приложимата температура:
 - [FFPE] 58°C
 - [80 meg панели за сонда] 58°C
 - [Обозначаване на соматичен вариант] 58°C
 - [Всички други панели] 62°C
7. Незабавно поставете магнитната стойка на MIDI плаката и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
8. Като използвате пипета, настроена на 200 µl за висококачествена gDNA или 50 µl за FFPE, премахнете и изхвърлете целия супернатант от всяка ямка.
9. Повторете стъпките 1 – 8 два пъти за общо три измивания.

Трансферно измиване

1. Отстранете от магнитната стойка.
2. [Висококачествена gDNA] Премахнете бързо EEW от инкубатора за микропроби и добавете 200 µl към всяка ямка.
3. [gDNA, екстрахирана от FFPE] Премахнете бързо EEW от инкубатора за микропроби и добавете 50 µl към всяка ямка.
4. Запечатайте и разклатете на 1800 об./мин за 4 минути. Ако се появи пръскане, намалете скоростта до 1600 об./мин.
5. Прехвърлете ресуспендирания разтвор с микросфери към нова MIDI плака.
Някои проби може да останат в ямките.



ВНИМАНИЕ

Прехвърлянето на реагента минимизира пренасянето на остатъчни реагенти, които могат да инхибират PCR надолу по веригата.

6. Поставете плаките с проби върху вложката на MIDI термоблока в инкубатора за микропроби, затворете капака и след това инкубирайте за 5 минути при приложимата температура:
 - [FFPE] 58°C
 - [80 мег панели за сонда] 58°C
 - [Обозначаване на соматичен вариант] 58°C
 - [Всички други] 62°C
7. Незабавно поставете магнитната стойка на MIDI плаката и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
8. Като използвате пипета, настроена на 200 µl за висококачествена gDNA или 50 µl за FFPE, премахнете и изхвърлете целия супернатант от всяка ямка.
9. Центрофугирайте плаката на 280 × g за 30 секунди.
10. Поставете магнитната стойка на MIDI плаката за 10 минути.
11. Използвайте пипета от 20 µl, за да премахнете и изхвърлите остатъчната течност от всяка ямка.
12. Непосредствено продължете към [Елуиране на страница 47](#) за предотвратяване на прекомерно изсушаване на микросферите и загуба на добив на библиотека.

Елуиране

1. Комбинирайте следните обеми, за да подготвите основна смес за елуиране. Умножете всеки обем по броя на обединените библиотеки, които се обработват.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Излишъкът на допълнителния реагент е включен в обема.
2. Вортексирайте и след това центрофугирайте за кратко.
3. Отстранете MIDI плаката от магнитната стойка.
4. Добавете 23 µl основна смес за елуиране към всяка ямка.
5. Запечатайте плаката и разклатете на 1800 об./мин за 2 минути.
6. Инкубирайте плаката на стайна температура за 2 минути.
7. Центрофугирайте на 280 × g за 30 секунди.
8. Поставете на магнитна стойка за MIDI плака и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
9. Прехвърлете 21 µl супернатант от MIDI плаката към съответната ямка на новата 96-ямкова PCR плака.
10. Изхвърлете MIDI плаката.
11. Добавете 4 µl ET2 към всяка ямка, съдържаща 21 µl от супернатанта.
12. Настройте пипетата на 20 µl и бавно пипетирайте всяка ямка 10 пъти за смесване.
13. Запечатайте плаката и след това центрофугирайте на 280 × g за 10 секунди.
14. Инкубирайте плаката за 1 минута на стайна температура.

Амплифициране на обогатена библиотека

Тази стъпка използва PCR, за да амплифицира обогатената библиотека.

Консумативи

- EPM (подобрана PCR смес)
- PPC (PCR праймер коктейл)
- Адхезивно запечатване

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи:

Артикул	Съхранение	Инструкции
EPM	-25°C до -15°C	Размразете на 4°C или върху лед за един час. Обърнете, за да смесите, след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана върху лед.
PPC	-25°C до -15°C	Размразете на 4°C върху лед за един час. Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана върху лед.

2. Запишете следната AMP програма на термоциклера чрез използване на подходящ брой PCR цикли, които са посочени в следната таблица.

- Изберете опцията за предварително затоплен капак и я настройте на 100°C
- Настройте обема на реакцията на 50 µl
- 98°C за 45 секунди
- (X) цикъла от:
 - 98°C за 30 секунди
 - 60°C за 30 секунди
 - 72°C за 30 секунди
- 72°C за 5 минути
- Задръжете на 10°C

Общо време за изпълнение ~35 минути.

Тип проба и панел	(X) цикъла
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) за висококачествена gDNA	10
Illumina Exome Panel (CEX) за FFPE	12
Всички други проби и панели	12 ¹²³⁴

¹ Може да се коригира до 15 цикъла за малки панели на трети страни чрез последваща оптимизация. Ако използвате FFPE, броят цикли може да бъде коригиран до 17.

² Може да се регулира до 17 цикъла за панели на трети страни, които имат само 500 сонди. Ако използвате FFPE, броят цикли може да бъде коригиран до 19.

³ Може да се регулира до 14 цикъла за FFPE проби.

⁴ Увеличаването на броя на PCR циклите може да доведе до по-висока честота на дубликация и по-малки размери на фрагменти за FFPE проби.

Процедура

1. Добавете 5 µl PPC към всяка ямка.
2. Добавете 20 µl EPM към всяка ямка.
3. Запечатайте плаката и разклатете на 1200 об./мин за 1 минута.
4. Центрофугирайте плаката на 280 × g за 10 секунди.
5. Поставете върху предварително програмирания термоциклер и изпълнете PCR програмата.

ТОЧКА ЗА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ

Ако спирате, съхранявайте при 2°C до 8°C до два дни. Като алтернатива оставете на термоциклера до 24 часа.

Изчистване на усилена обогатена библиотека

Тази стъпка използва микросфери за изчистване с цел пречистване на обогатената библиотека и премахване на нежелани продукти.

Консумативи

- CB (микросфери за изчистване)
- RSB (буфер за ресуспензия)
- Прясно приготвен 80% етанол (EtOH)
- Адхезивни запечатвания
- 96-ямкова MIDI плака
- 96-ямкова PCR плака
- Магнитна стойка за MIDI плака

Относно реагентите

- Микросфери за изчистване
 - Вортиксийрайте преди всяка употреба.
 - Вортиксийрайте често, за да сте сигурни, че микросферите са разпределени равномерно.
 - Аспирирайте и дозирайте бавно поради вискозитета на разтвора.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи.

Артикул	Съхранение	Инструкции
CB	Стайна температура	Вортиксийрайте и обръщайте, за да се смеси, докато цветът на течността стане хомогенен.
RSB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура. Вортиксийрайте, за да се смесят.

2. Пригответе свеж 80% EtOH от абсолютен етанол.

Процедура

1. Центрофугирайте PCR плаката на 280 × g за 10 секунди.
2. Вортиксийрайте CB 3 пъти за 10 секунди и след това обърнете.
3. Добавете 40,5 µl CB към всяка ямка на нова **MIDI** плака.
4. Прехвърлете 45 µl от всяка ямка от PCR плаката в съответната ямка на MIDI плаката.
5. Запечатайте плаката и разклатете на 1800 об./мин за 1 минута.
6. Инкубирайте MIDI плаката на стайна температура за 5 минути.
7. Центрофугирайте на 280 × g за 10 секунди.
8. Поставете на магнитна стойка за MIDI плака и изчакайте до избистрянето на течността (~5 минути).
9. Като използвате пипета, настроена на 95 µl, премахнете и изхвърлете целия супернатант от всяка ямка.
10. Промийте два пъти, както следва.
 - a. С плаката на магнитната стойка добавете 200 µl прясна 80% EtOH без смесване.
 - b. Инкубирайте за 30 секунди.
 - c. Без да се нарушават микросферите, премахнете и изхвърлете супернатанта.
11. Изсушете на въздух на магнитната стойка за 5 минути.
12. Когато сушите на въздух, използвайте пипета от 20 µl, за да премахнете и изхвърлите остатъчния EtOH от всяка ямка.
13. Премахнете магнитната стойка и добавете 32 µl RSB към всяка ямка.
14. Запечатайте плаката и разклатете на 1800 об./мин за 1 минута.

15. Инкубирайте плаката на стайна температура за 5 минути.
16. Центрофугирайте на 280 × g за 10 секунди.
17. Поставете на магнитна стойка за MIDI плака и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
18. Прехвърлете 30 µl супернатант от всяка ямка от 96-ямковата MIDI плака към в съответната ямка на новата PCR плака.
19. Изхвърлете MIDI плаката.

ТОЧКА ЗА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката и съхранявайте при -25°C до -15°C до 7 дни.

Проверка на обогатените библиотеки

За количествено определяне на входящата двойноверижна gDNA използвайте метод, основан на флуоресценция, който използва интеркалиращо багрило. Избягвайте методи, които измерват общата нуклеинова киселина, като NanoDrop или други методи за UV абсорбция.

1. Изпълнете 1 µl от обогатените библиотеки, като използвате вашия метод за количествено определяне на библиотеки.

ЗАБЕЛЕЖКА Общата моларност на сондата влияе пропорционално на добива на библиотеката след обогатяване.

Очаквайте среден размер на фрагмента от 125 – 235 bp и разпределение на ДНК фрагменти с диапазон на размера от ~200 bp до ~1000 bp.

Разреждане на библиотеките до началната концентрация

Тази стъпка разрежда библиотеките до началната концентрация за вашата система за секвениране и е първата стъпка в серийното разреждане. След разреждане до началната концентрация библиотеките са готови за денатуриране и разреждане до крайната концентрация на зареждане.

Независимо от панела на сондата за обогатяване, който използвате, Illumina препоръчва за секвениране да настроите сдвоено изпълняване със 151 цикъла на разчитане (2 × 151) и 10 цикъла на индексно разчитане. Ако искате по-малко припокриващи се разчитания или по-малко необработено покритие, можете да секвенирате до 2 × 126 или 2 × 101.

- Изчислете стойността на моларността на библиотеката или обединените библиотеки, като използвате следната формула.
 - За библиотеки, качествено определени за анализатор на ДНК фрагменти, използвайте средния размер, получен за библиотеката.
 - За всички други методи за качествено определяне използвайте 350 bp като среден размер на библиотеката.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{среден размер на библиотека (bp)}} = \text{Моларност (nM)}$$

Например, ако концентрацията на вашата библиотека е 20 ng/μl и средният размер е 350 bp, получената стойност на моларност е 86,58 nM.

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

- Като използвате стойността на моларността, изчислете обемите на RSB и библиотеката, необходими за разреждане на библиотеките до началната концентрация за вашата система.

Система за секвениране	Минимално необходим обем на библиотеката (μl)	Начална концентрация (nM)	Крайна зареждаща концентрация (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) или 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM е началната концентрация за крайна зареждаща концентрация от 350 pM. Ако е необходимо, коригирайте крайната зареждаща концентрация, като използвате следната таблица.

Крайна зареждаща концентрация (pM)	Концентрация на обединени библиотеки (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Разреждане на библиотеки чрез използване на RSB:
 - **Библиотеки, количествено определени като мултиплексно обединяване от библиотеки** – Разрежете обединяването до началната концентрация за вашата система.
 - **Библиотеки, количествено определени индивидуално** – Разрежете всяка библиотека до началната концентрация за вашата система. Добавете 10 µl от всяка разрежена библиотека към епруветка, за да създадете мултиплексно обединяване на библиотека.
4. Следвайте инструкциите за денатуриране и разреждане за вашата система, за да разреждате до крайната зареждаща концентрация.
 - За NextSeq 550Dx System направете справка с [Подготовка за секвениране на NextSeq 550Dx на страница 53](#).
 - За MiSeqDx System направете справка с [Подготовка за секвениране на MiSeqDx на страница 55](#).
 - За NovaSeq 6000Dx System направете справка с [Подготовка за секвениране на NovaSeq 6000Dx на страница 57](#).

Крайните концентрации на натоварване са отправна точка и обща насока. Оптимизирайте концентрациите за вашия работен процес и метод за количествено определяне при последващи серии на секвениране или чрез титриране на поточна клетка.

Подготовка за секвениране на NextSeq 550Dx

Използвайте следните инструкции за денатуриране и разреждане на библиотеки за секвениране на системата за секвениране NextSeq 550Dx.

Консумативи

- HT1 (хибридизационен буфер)
- 1N NaOH
- Tris-HCl от 200 mM, pH 7,0

Подготовка

Пригответе *прясно* разреждане на 0,2N NaOH за денатуиране на библиотеките за секвениране. За да се предотврати влиянието на малки грешки при пипетиране върху крайната концентрация на NaOH, се приготвя допълнителен обем.



ВНИМАНИЕ

Прясно разрежданият 0,2 N NaOH е от съществено значение за процеса на денатурация. Неправилната денатурация може да намали добива.

1. Комбинирайте следните обеми в епруветка за микроцентрифугиране, за да разредите 1N NaOH до 0,2N NaOH:
1. Подгответе следните консумативи.

Артикул	Съхранение	Инструкции
HT1	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Съхранявайте при 2°C до 8°C, докато бъдете готови да разредите денатуираните библиотеки.

2. Комбинирайте следните обеми в епруветка за микроцентрифугиране, за да пригответе прясно разреждане на NaOH:
 - Лабораторен клас вода (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)Резултатът е 1 ml NaOH от 0,2 N.
3. Обърнете епруветката неколkokратно, за да смесите съдържанието.
4. Комбинирайте следните обеми в епруветка за микроцентрифугиране, за да пригответе Tris-HCl от 200 mM, pH 7,0.
 - Лабораторен клас вода (800 µl)
 - Tris-HCl от 1 M, pH 7,0 (200 µl)Резултатът е 1 ml Tris-HCl от 200 mM, pH 7,0

ЗАБЕЛЕЖКА Дръжте епруветката с капачка. Използвайте пряското разреждане в рамките на **12 часа**.

Денатуриране на библиотеки

1. Комбинирайте следните обеми на библиотеката и прясно разреждания 0,2N NaOH в епруветката за микроцентрифугиране.
 - Библиотека от 10 µl
 - 10 µl 0,2N NaOH
2. Вортексирайте за кратко, след което центрофугирайте при 280 × g за 1 минута.
3. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
4. Добавете 10 µl Tris-HCl от 200 mM, pH 7.

Разреждане на денатурираните библиотеки до 20 pM

1. Добавете 970 µl предварително охладен HT1 към епруветката с денатурирани библиотеки. Резултатът е денатурирана библиотека от 20 pM.
2. Вортексирайте за кратко, след което центрофугирайте при 280 × g за 1 минута.
3. Поставете библиотеките от 20 pM върху лед, докато станете готови да продължите към крайното разреждане.

Разреждане на библиотеките до зареждащата концентрация

1. Добавете следните обеми, за да разредите денатурирания разтвор от библиотека от 20 pM до 1,2 pM.
 - Денатуриран разтвор от библиотека (78 µl)
 - Предварително охладен HT1 (1222 µl)Общият обем е 1,3 ml при 1,2 pM.
2. Обърнете, за да смесите, след което изпълнете пулсово центрофугиране.
3. Пристъпете към секвенирането. За повече информация вижте *Наръчника за справка за инструмента NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)*.

Подготовка за секвениране на MiSeqDx

Използвайте следните инструкции за денатуриране и разреждане на библиотеки за секвениране на системата за секвениране MiSeqDx.

Консумативи

- HT1 (хбридизационен буфер)
- 1N NaOH

Подготовка

Пригответе *прясно* разреждане на 0,2N NaOH за денатуиране на библиотеките за секвениране. За да се предотврати влиянието на малки грешки при пипетиране върху крайната концентрация на NaOH, се приготвя допълнителен обем.



ВНИМАНИЕ

Прясно разреденият 0,2N NaOH е от съществено значение за процеса на денатурация. Неправилната денатурация може да намали добива.

1. Комбинирайте следните обеми в епруетка за микроцентрифугиране, за да разредите 1N NaOH до 0,2N NaOH:
1. Подгответе следните консумативи.

Артикул	Съхранение	Инструкции
HT1	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Съхранявайте при 2°C до 8°C, докато бъдете готови да разредите денатуираните библиотеки.

2. Комбинирайте следните обеми в епруетка за микроцентрифугиране, за да пригответе прясно разреждане на NaOH:
 - Лабораторен клас вода (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)Резултатът е 1 ml 0,2N NaOH.

ЗАБЕЛЕЖКА Дръжте епруетката с капачка. Използвайте пряското разреждане в рамките на **12 часа**.

Денатуиране на библиотека от 4 nM

1. Комбинирайте следните обеми в епруетката за микроцентрифугиране.
 - Библиотека от 4 nM (5 µl)
 - 0,2N NaOH (5 µl)
2. Вортексирайте за кратко, след което центрофугирайте при 280 × g за 1 минута.
3. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
4. Добавете 990 µl предварително охладен HT1 към епруетката, съдържаща денатуирана библиотека.
Резултатът е 1 ml денатуирана библиотека от 20 pM.

Разреждане на денатурирана библиотека от 20 pM

1. Разреждете до желаната концентрация, като използвате следните обеми.

Концентрация	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Библиотека от 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Предварително охладен HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Обърнете, за да смесите, след което изпълнете пулсово центрофугиране.
3. Пристъпете към секвенирането. За инструкции вижте *Наръчника за справка за инструмент MiSeqDx за MOS v4 (документ № 1000000157953)*.

Подготовка за секвениране на NovaSeq 6000Dx

Използвайте следните инструкции за денатуриране и разреждане на библиотеки за секвениране на системата за секвениране NovaSeq 6000Dx.

Консумативи

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (буфер за ресуспензия)
- 1N NaOH
- Tris-HCl от 10 mM, pH 8,5
- Tris-HCl от 400 mM, pH 8,0
- Епруветка за библиотека за NovaSeq 6000Dx

Подготовка

Пригответе *пряко* разреждане на 0,2N NaOH за денатуиране на библиотеките за секвениране. За да се предотврати влиянието на малки грешки при пипетиране върху крайната концентрация на NaOH, се приготвя допълнителен обем.



ВНИМАНИЕ

Пряко разрежданият 0,2N NaOH е от съществено значение за процеса на денатурация. Неправилната денатурация може да намали добива.

1. Комбинирайте следните обеми в епруветка за микроцентрифугиране, за да разредите 1N NaOH до 0,2N NaOH:

Таблица 4 S2 режим

Реагент	Обем за една поточна клетка (µl)	Обем за две поточни клетки (µl)
Лабораторен клас вода	40	80
Начална концентрация на 1N NaOH	10	20

Тези обеми водят до 50 µl 0,2N NaOH за една поточна клетка или 100 µl 0,2N NaOH за две поточни клетки.

Таблица 5 S4 режим

Реагент	Обем за една поточна клетка (µl)	Обем за две поточни клетки (µl)
Лабораторен клас вода	80	160
Начална концентрация на 1N NaOH	20	40

Тези обеми водят до 100 µl 0,2N NaOH за една поточна клетка или 200 µl 0,2N NaOH за две поточни клетки.

2. Обърнете няколко пъти, за да се смесят, или вортексирайте внимателно.

ЗАБЕЛЕЖКА Дръжте епруветката с капачка. Използвайте прясното разреждане в рамките на **12 часа**.

Създаване на обединяване на нормализирана библиотека

Концентрацията на зареждане може да варира в зависимост от подготовката на библиотеката, методите за количествено определяне и нормализиране.

Използвайте следните инструкции, за да нормализирате библиотеките до подходящата концентрация и след това да ги обедините. Библиотеките, секвенирани в една и съща поточна клетка, трябва да бъдат комбинирани в едно нормализирано обединяване.

ЗАБЕЛЕЖКА Максималният брой проби, които могат да бъдат изпълнени на лента с Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, е 192. Тази граница е поради общия брой UD индекси в Set A (Комплект А) и Set B (Комплект Б).

Нормализиране на библиотеки за обединяване

1. Определете необходимата концентрация на обединената библиотека въз основа на желаната крайна концентрация на зареждане.
 - За крайна концентрация на зареждане от 350 pM необходимата концентрация на обединената библиотека е 1,75 nM.
 - За да определите концентрацията на обединената библиотека за различна крайна зареждаща концентрация, направете справка с [Разреждане на библиотеките до началната концентрация на страница 52](#).
2. Нормализирайте библиотеките до желаната концентрация на обединени библиотеки, като използвате 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
За помощ при разреждането на библиотеките до подходящата концентрация вижте [калькулатора за обединяване](#) на уебсайта на Illumina.

Препоръчителни концентрации на зареждане

Оптималната концентрация на зареждане на ДНК зависи от типа на библиотеката и размера на вложката. За библиотеки >450 bp може да са необходими по-високи концентрации на зареждане.

Обединяване на нормализирани библиотеки и добавяне на незадължителна контрола PhiX

1. Комбинирайте подходящия обем от всяка нормализирана библиотека в нова епруветка за микроцентрифугиране, за да получите един от следните крайни обеми:

Режим	Краен обем (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Незадължително]** Добавете 1% неденатуриран PhiX, както следва.
 - a. Разреждете 10 nM PhiX до 2,5 nM чрез използване на 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
 - b. Добавете подходящия обем неденатуриран 2,5 nM PhiX към епруветката с неденатурираното обединяване на библиотеки.

Режим	Неденатуриран 2,5 nM PhiX (µl)	Неденатурирано обединяване на библиотеки (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Когато се добавя във PhiX, 1% е препоръчителната сума за добре балансирани библиотеки. Библиотеките с ниско разнообразие могат да изискват повече. За да използвате контрола PhiX с библиотеки с ниско разнообразие, свържете се с техническата поддръжка на Illumina за насоки.

Денатуриране на обединяване на библиотеки и незадължителна контрола PhiX

1. Добавете 0,2N NaOH към епруветката от неденатурирано обединяване на библиотеки и незадължителен PhiX, както следва.

Поточна клетка	0,2N NaOH	Неденатурирано обединяване на библиотеки (µl)	Получен обем
S2	37	150	187 µl или 187,9 µl с PhiX
S4	77	310	387 µl или 388,9 µl с PhiX

2. Поставете капачката и след това вортексирайте за кратко.
3. Центрофугирайте на 280 × g за 1 минута.
4. Инкубирайте на стайна температура за 8 минути за денатуриране.
5. Добавете 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 за неутрализиране, както следва.

Режим	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Получен обем
S2	38	225 µl или 225,9 µl с PhiX
S4	78	465 µl или 466,9 µl с PhiX

6. Поставете капачката и след това вортексирайте за кратко.
7. Центрофугирайте на 280 × g за 1 минута.
8. Прехвърлете целия обем на денатурираната библиотека или денатурираната библиотека и PhiX към епруветката за библиотеки на NovaSeq 6000Dx.
9. Пристъпете към секвенирането. За инструкции направете справка с *NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation* (Документация за продукта за инструмента NovaSeq 6000Dx) (документ № 200010105).

Отстраняване на неизправности

Използвайте таблицата по-долу, за да отстраните проблема в работния процес. Ако изпълняването на секвениране или подготовката на библиотеката за проба са неуспешни два пъти, може да е необходимо допълнително отстраняване на неизправности. Свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina.

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
Изпълняването на секвениране не преминава спецификациите за контрол на качеството	Грешка на потребителя или лабораторно оборудване в работния процес на анализа	<p>Квалифицирайте обогатените библиотеки, за да осигурите подходящ добив на библиотеката и разпределение на размера на фрагментите. Повторете подготовката на библиотеката от една от следните стъпки в зависимост от това къде е възникнала предполагаема грешка при използване или грешка в оборудването. Ако са неизвестни или възникнат други грешки, свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да отстраните неизправностите при изпълняване.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Секвенирайте библиотеките повторно. Направете справка с Подготовка за секвениране на NextSeq 550Dx на страница 53, Подготовка за секвениране на MiSeqDx на страница 55 или Подготовка за секвениране на NovaSeq 6000Dx на страница 57. • Обогадете библиотеките повторно. Направете справка с Хибридизиране на сонди на страница 39. • Започнете подготовката на библиотеката от началото на работния процес. Направете справка с Инструкции за употреба на страница 23.
	Проблем с инструмента	Свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina.

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
Грешка при генериране на FASTQ или обща грешка в системата за секвениране (напр. мрежова грешка, грешки при зареждане/разтоварване на реагенти и т.н.)	Проблем със софтуера или инструмента	Направете справка с <i>Local Run Manager Software Guide (Ръководство за софтуера Local Run Manager)</i> (документ № 100000002702) за помощ с генериране на FASTQ или направете справка с <i>Наръчник за справка за инструмента NextSeq 550Dx</i> (документ № 1000000009513), <i>Наръчник за справка за инструмент MiSeqDx за MOS v4</i> (документ № 1000000157953) или <i>NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation</i> (Документация за продукта за инструмента NovaSeq 6000Dx (документ № 200010105)). Свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina за допълнителна помощ.

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
ДНК библиотеката не генерира достатъчен добив за секвениране на зареждане	Изискванията за въвеждане на проба не бяха изпълнени	Осигурете подходящо въвеждане на пробата и повторете подготовката на библиотеката. Направете справка с Препоръки за въвеждане на проби на страница 19 .
	Грешка при използване или оборудване в работния процес на анализа	Повторете подготовката на библиотеката от една от следните стъпки в зависимост от това къде е възникнала предполагаема грешка при използване или грешка в оборудването. Ако са неизвестни или възникнат други грешки, свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да отстраните неизправностите при изпълняване. <ul style="list-style-type: none"> Секвенирайте библиотеките повторно. Направете справка с Подготовка за секвениране на NextSeq 550Dx на страница 53, Подготовка за секвениране на MiSeqDx на страница 55 или Подготовка за секвениране на NovaSeq 6000Dx на страница 57. Обогатете библиотеките повторно. Направете справка с Хибридизиране на сонди на страница 39. Започнете подготовката на библиотеката от началото на работния процес. Направете справка с Инструкции за употреба на страница 23.
	Изискванията за панела на сондата за обогатяване не са изпълнени	Осигурете подходящ панел за сонда за обогатяване и повторете подготовката на библиотеката. Направете справка с Изисквания към панелите на сондата за обогатяване на страница 11 .

Характеристики на производителността

Характеристики на производителността на DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application за NovaSeq 6000Dx са предоставени в *NovaSeq 6000Dx Instrument Package Insert (Листовка за инструмента NovaSeq 6000Dx) (документ № 200025276)*.

Производителност с цели екзомни панели

Производителността на екзомния панел беше тествана чрез използване на най-ниското (50 ng) и най-високото (1000 ng) препоръчително въвеждане на Coriell Cell Line gDNA NA12878, с известен истинен комплект за откриване на вариант на герминативна линия (платинен геном Coriell). Екзомен панел 1 (45 Mb) и екзомен панел 2 (36,8 Mb) бяха използвани като представителни панели. 24 технически репликацията бяха тествани чрез анализа Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, като се използва екзомен панел 1 (45 Mb) в две 12-плексни реакции на обогатяване. 12 технически репликацията бяха тествани чрез анализа Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, като се използва екзомен панел 2 (36,8 Mb) в една 12-плексна реакция на обогатяване. Обогадените библиотеки бяха секвенирани на системата за секвениране NextSeq 550Dx с модула DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

Следващата таблица показва средните стойности на вторичната последователност и показателите за производителност на обозначаване на вариант за техническите репликати, тествани с всеки панел.

Таблица 6 Производителност на анализа с два цели екзомни панела

Панел	Подплатено уникално обогатяване на разчитане	Едно-родност на покритието	Медиана на дължина на фрагмент	Повторно обозначаване на SNV ¹	Прецизност на SNV ²	Прецизност на индел ¹	Прецизност на индел ²
Екзомен панел 1 (45 Mb)	80%	96%	186 bp	96%	99%	90%	89%
Екзомен панел 2 (36,8 Mb)	93%	98%	188 bp	96%	99%	92%	93%

¹Повторно обозначаване = Положителни/(истинско положителни + фалшиво отрицателни)

²Прецизност = Истинско положителни/(истинско положителни + фалшиво положителни)

Граница на откриване

Референтният стандарт Horizon HD799 DNA се използва за тестване на границата на откриване. HD799 се състои от умерено компрометирана третирана с формалин ДНК с известни SNV в алелни честоти, вариращи от 1 – 24,5%. Използван е най-ниската препоръчителна входяща ДНК (50 ng) и е оценена степента на откриване на SNV с $\geq 5,0\%$ вариантна алелна честота (VAF). 16 технически репликацията бяха тествани чрез анализа Illumina DNA Prep with Enrichment Dx чрез използване на работен процес за FFPE, обогатен с панел за обогатяване на пан-рак (1,94 Mb) в 16 (1-плексни) обогатявания и след това секвенирани на инструмент NextSeq 550Dx с модул DNA GenerateFASTQ Dx.

Всички проби преминаха специфичните за панела изисквания за производителност на пробите, както е показано на следващата таблица.

Таблица 7 Примерна производителност за граница на откриване

Панел	Степен на откриване на вариант на SNV от $\geq 5,0\%$ VAF	Средна еднородност на покритието
Панел за обогатяване на пан-рак (1,94 Mb, 523 гена)	100%	99%

Смущаващи вещества

Въздействието на потенциални смущаващи вещества е оценено при Illumina DNA Prep with Enrichment Dx чрез оценка на производителността на анализа в присъствието на смущаващи вещества.

Смущение в цяла кръв

Ацетаминофенът (екзогенно съединение, лекарство), креатининът и триглицеридите (ендогенни метаболити) бяха тествани чрез добавянето им в проби от цяла човешка кръв преди екстракцията на ДНК. За да се оцени смущението в резултат на вземане на кръв (кратко вземане), EDTA също беше добавена в проби от цяла кръв. Освен това, за да се оцени смущението, произтичащо от подготовката на пробата, в ДНК, извлечена от цяла кръв, се добавя етанол с молекулярно качество.

Следващата таблица показва тестовите концентрации за интерферент.

Таблица 8 Потенциално смущаващи вещества и концентрации, тествани в цяла кръв

Тестови субстанции	Тестова концентрация
Ацетаминофен	15,6 mg/dl* Три пъти над най-високата концентрация, очаквана след лекарствена терапевтична доза.
Креатинин	15 mg/dl* Най-висока наблюдавана концентрация в населението.
Триглицериди	1,5 g/dl* Най-висока наблюдавана концентрация в населението.
EDTA	6 mg/ml Три пъти повече от очакваната концентрация в кръвта, събрана в епруветки с EDTA.
Етанол с молекулярен клас	15% v/v В елуата след екстракция на ДНК.

*Според CLSI EP37-ED1:2018

За всяко смущаващо вещество 12 технически репликата бяха тествани чрез анализа Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, обогатен с екзомен панел 1 (45 Mb) в единично (12-плексно) обогатяване и след това секвенирани на инструмент NextSeq 550Dx с модул DNA GenerateFASTQ Dx.

И за двете тествани вещества всичките 12 проби отговарят на изискванията за ефективност на пробата и не се наблюдава намеса в работата на анализа.

Смущение в FFPE тъкан

Две колоректални FFPE проби бяха тествани в присъствието и отсъствието на хемоглобин при 0,1 mg на 10 µm FFPE срез, за да представят най-лошия сценарий на 50 % замърсяване на FFPE тъканна проба с кръв с високо ниво на хемоглобин. Пробите бяха тествани чрез анализа Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, като се използва панел за обогатяване на пан-рак 1 (1,94 Mb) като представителен панел при едноплексни обогатявания. Обогатените библиотеки след това бяха секвенирани на инструмента NextSeq 550Dx с модула DNA GenerateFASTQ Dx. Всички проби отговарят на изискванията за производителност на пробата и беше доказано, че хемоглобинът не пречи на производителността на анализа.

За да се оцени смущението, произтичащо от подготвянето на пробата, две екзогенни съединения бяха добавени в ДНК, екстрахирана от FFPE тъканна проба от рак на пикочния мехур. Тестваните екзогенни вещества са екстракционни разтвори, които обикновено се използват по време на процеса на екстракция на ДНК и са изброени с тестваните количества в следващата таблица.

Разтворите на тестваното вещество се предлагат в търговската мрежа в комплекти за изолиране на ДНК на основата на колони.

Таблица 9 Потенциално смущаващи екзогенни вещества и концентрации, тествани в FFPE

Тестови субстанции	Тестова концентрация (µl/30 µl елуат)
Депарафинизиращ разтвор	113 x 10 ⁻⁶
Промиващ буфер AW2	0,417

За всяко смущаващо вещество осем технически репликата бяха тествани чрез анализа Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, обогатен с панел за обогатяване на пан-рак (1,94 Mb) в едноплексни обогатявания и след това секвенирани на инструмент NextSeq 550Dx с модул DNA GenerateFASTQ Dx.

И за двете тествани вещества всичките проби отговарят на изискванията за производителност на пробата и не се наблюдава намеса в работата на анализа.

Кръстосано замърсяване

Клетъчна линия Coriell gDNA NA12878 (женска, 10 проби), клетъчна линия Coriell gDNA NA12877 (мъжка, 12 проби) и контроли без шаблон (NTC, 2 проби) бяха тествани чрез анализа Illumina DNA Prep with Enrichment Dx в шахматно оформление на плаката. Всички проби използват най-високата (1000 ng) препоръка за входяща gDNA като най-строгост условие за оценка на кръстосаното замърсяване на пробите. Тестването е извършено два пъти от двама отделни оператори. Екзомен панел 1 (45 Mb) беше

използван в 12-плексни реакции на обогатяване. Обогатените библиотеки бяха секвенирани на NextSeq 550Dx с DNA GenerateFASTQ Dx. Оценката беше направена чрез оценка на покритието на мъжката специфична Y-хромозома в женските проби чрез сравняване с фоновите нива на пълна плака с женски проби, както и индексното представяне на NTC пробите.

Таблица 10 Резултати от кръстосано замърсяване

Женски проби с покритие на мъжка Y-хромозома при <3x базов шум	Представяне на индекса в NTC
100%	<0,0005%

Допълнение: индексни адаптерни секвенции на Illumina UD

Тези уникални двойни (UD) индексни адаптери са подредени в плаката, за да наложат препоръчителната стратегия за сдвояване. Индексните адаптери са дълги 10 бази, вместо типичните осем бази.

Index 1 (Индекс 1) (i7) адаптери

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (Индекс 2) (i5) адаптери

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Следната последователност се използва за изрязване на адаптера за Read 1 (Разчитане 1) и Read 2 (Разчитане 2).

CTGTCTCTTATACACATCT

Индексни адаптери за плака A/комплект 1

Име на индекс	i7 бази в адаптер	i5 бази в адаптер
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT

Име на индекс	i7 бази в адаптер	i5 бази в адаптер
UDP0009	СТАСТСАГТС	ГТТГАТАГТГ
UDP0010	ТСГТСТГАСТ	АССАГСАГАСА
UDP0011	ГААСАТАСГГ	САТАСАСТГТ
UDP0012	ССТАТГАСТС	ГТГТГГСАГТ
UDP0013	ТААТГСААГ	АТСАСАААГ
UDP0014	ГТСАСАСТТС	САСАСТСАСТ
UDP0015	САСААТГАА	ГААТСАСАСА
UDP0016	САСАТААСА	ААГАСТАТАГ
UDP0017	ААСАТТСТС	ТСАСАСАСА
UDP0018	САТТСАСТСТ	СААТГАТАГ
UDP0019	СААТГАТАГ	САТТСАСТСТ
UDP0020	ТСАСАСТАТС	САСАСАТАСА
UDP0021	АГАСААСАТ	САСАСТСАСТ
UDP0022	САСАСААТА	САТТГАТААГ
UDP0023	ААСААСАСА	ТААГААСА
UDP0024	ГАТАГАТАА	СААСТГАТА
UDP0025	ТТСАТАСАТТ	САСАСАТАГ
UDP0026	САТСАСААСА	ААТАГАСА
UDP0027	ТАГАТАСАТТ	ТААТСАСАТ
UDP0028	АТГАСАТАСА	ТСГАТАСАСА
UDP0029	АГАТАСАСА	ТСАСАСАСА
UDP0030	ТАСАСТАСА	САТАТАСА
UDP0031	ТАСАТАСАСА	САТАСАСА
UDP0032	САТАСАСТГТ	ГААСАТАСГГ
UDP0033	САТАТААТСА	ГАСАТАТАСА
UDP0034	ТАСАСАСАСА	АСТАСАСАСА
UDP0035	САСАГАТАСА	ААГАТАСАТА
UDP0036	ТАСАСАСАСА	ТАСАСАТАТА
UDP0037	ГАСАТАТАСА	ГАТАСАСАСА
UDP0038	САТТСТСАСА	ТАСАТАСАСА

Име на индекс	i7 бази в адаптер	i5 бази в адаптер
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	TATTCCTCAG	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	GTTCGCGCCA	AAC TGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC

Име на индекс	i7 бази в адаптер	i5 бази в адаптер
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACSTTATGAA	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	GGTGGAAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Индексни адаптери за плака В/комплект 2

Име на индекс	i7 бази в адаптер	i5 бази в адаптер
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	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Име на индекс	i7 бази в адаптер	i5 бази в адаптер
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCCTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GТАТТСТСТА	TATAGATTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA

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

Име на индекс	i7 бази в адаптер	i5 бази в адаптер
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	СТААТГТСТТ
UDP0188	GGCAGTAGCA	СААССГГАГГ
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	ТТАГГАТАГА
UDP0191	СААСАТТСАА	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGТАСТ

Хронология на редакциите

Документ	Дата	Описание на промяната
Документ № 200019584 v02	Септември 2022 г.	Добавено съдържание в подкрепа на секвенирането на инструмент NovaSeq 6000Dx.
Документ № 200019584 v01	Май 2022 г.	Добавени имена на системи за секвениране и каталожни номера. Премахната е уникална информация за двойно индексирани за едноиндексирани библиотеки.
Документ № 200019584 v00	Май 2022 г.	Първоначална версия.

Патенти и търговски марки

Настоящият документ и съдържанието му са собственост на Illumina, Inc. и нейните филиали („Illumina“) и са предназначени само за употреба по силата на договор от страна на клиента и във връзка с използването на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ, и с никаква друга цел. Този документ и съдържанието му не трябва да се използват или разпространяват за никаква друга цел и/или по друг начин да бъдат съобщавани, разкривани или възпроизвеждани по какъвто и да е начин без предварителното писмено съгласие от страна на Illumina. Illumina не предоставя посредством този документ никакъв лиценз за свой патент, търговска марка, авторско право или права по силата на общото право, нито подобни права на която и да е трета страна.

Инструкциите в този документ трябва да се следват строго и изрично от страна на квалифициран и правилно обучен персонал, за да се гарантират правилната и безопасната употреба на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ. Цялото съдържание на този документ трябва да бъде прочетено и разбрано напълно, преди да се използва(т) такъв(такива) продукт(и).

АКО ВСИЧКИ ИНСТРУКЦИИ, СЪДЪРЖАЩИ СЕ В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ, НЕ БЪДАТ НАПЪЛНО ПРОЧЕТИ И ИЗРИЧНО СПАЗВАНИ, ТОВА МОЖЕ ДА ДОВЕДЕ ДО ПОВРЕДА НА ПРОДУКТ(ИТЕ), НАРАНЯВАНЕ НА ЛИЦАТА, ВКЛЮЧИТЕЛНО НА ПОТРЕБИТЕЛИТЕ ИЛИ ДРУГИ ЛИЦА, И УВРЕЖДАНЕ НА ДРУГО ИМУЩЕСТВО, И ЩЕ ОТМЕНИ ВСЯКАКВА ГАРАНЦИЯ, ПРИЛОЖИМА ЗА ПРОДУКТ(ИТЕ).

ILLUMINA НЕ ПОЕМА НИКАКВА ОТГОВОРНОСТ В РЕЗУЛТАТ НА НЕПРАВИЛНАТА УПОТРЕБА НА ПРОДУКТА(ИТЕ), ОПИСАН(И) В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ (ВКЛЮЧИТЕЛНО ТЕХНИ ЧАСТИ ИЛИ СОФТУЕР).

© 2022 Illumina, Inc. Всички права запазени.

Всички търговски марки са собственост на Illumina, Inc. или съответните им притежатели. За специфична информация относно търговските марки посетете www.illumina.com/company/legal.html.

Информация за контакт



Illumina

5200 Illumina Way

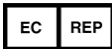
San Diego, California 92122, САЩ

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (извън Северна Америка)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Нидерландия

Спонсор в Австралия

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Австралия

Етикетиране на продукта

За пълна справка за символите, които може да се появяват на опаковката и етикетите на продукта, вижте легендата на символите за вашия комплект на support.illumina.com в раздела *Документация*.