

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO
URČENO POUZE NA EXPORT

Účel použití

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit je sada reagensií a spotřebního materiálu, která se používá k přípravě knihoven vzorků z genomické DNA získané z lidských buněk a tkání. K přípravě knihoven zacílených na konkrétní oblasti zájmu genomu jsou zapotřebí panely sond dodané uživatelem. Vygenerované knihovny vzorků jsou určeny k použití v sekvenačních systémech Illumina.

Principy postupu

Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je určena k přípravě knihoven pro sekvenování DNA obohacených pro cílové oblasti genomové DNA odvozené z lidských buněk a tkání.

Pro obohacení cíle jsou požadovány uživatelem poskytnuté biotinované oligonukleotidové panely. Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilní s panely různých velikostí, od malých panelů (méně než 20 000 sond) po velké panely (více než 200 000 sond). Vygenerované obohacené knihovny slouží k sekvenování v sekvenačních systémech Illumina.

Postup se sadou Illumina DNA Prep with Enrichment Dx zahrnuje následující kroky:

- **Tagmentace genomové DNA** – K tagmentaci vstupního materiálu DNA využívá produkt Malé BLT pro obohacení (Enrichment BLT Small, eBLTS). Během tagmentace se gDNA v jednom kroku rozpadne na fragmenty a označí adaptéry. K nasycení eBLTS během tagmentační reakce je potřebné minimální množství vstupního materiálu DNA o hmotnosti 50 ng. Po nasycení eBLTS fragmentuje nastavený počet molekul DNA tak, že vygeneruje normalizované knihovny se stálým rozdělením velikostí fragmentů.
- **Čištění po tagmentaci** – Vyčistí DNA označenou adaptérem v produktu eBLTS tak, aby bylo možno použít amplifikaci.
- **Amplifikace tagmentované DNA** – Amplifikuje tagmentovanou DNA pomocí programu PCR s limitovanými cykly. Na konce fragmentů DNA jsou přidány jedinečné dvojité (UD) indexy, které umožňují označení knihoven DNA dvojitými jedinečnými čárovými kódy a vytváření klastrů během sekvenování.
- **Čištění knihoven** – Využívá postup založený na čištění částicemi, který slouží k purifikaci a výběru velikosti amplifikovaných knihoven DNA.
- **Sdružení knihoven do fondu** – Zkombinuje knihovny DNA s jedinečnými indexy do jednoho fondu tvořeného až 12 knihovnami. Knihovny lze sdružit do fondu podle objemu nebo podle hmotnosti.
- **Hybridizace sond** – Skládá se z hybridizační reakce, během které jsou knihovny DNA se dvěma vlákny denaturovány a panel biotinovaných sond DNA je hybridizován na cílené genomové oblasti.
 - Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilní s více panely. Součástí sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx není panel pro obohacení. Panely sond poskytne uživatel a musí splňovat požadované specifikace. Reagencie sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx jsou kompatibilní

s panely pro obohacení s oligonukleotidy DNA jak od společnosti Illumina, tak od nezávislých dodavatelů, které splňují požadované specifikace. Další informace o požadovaných specifikacích na panely nezávislých dodavatelů naleznete v části [Požadavky na panel sond pro obohacení na straně 9](#).

- **Zachycení hybridizovaných sond** – Využívá streptavidinové magnetické částice (SMB3) k zachycení biotinovaných sond hybridizovaných na cílové oblasti zájmu.
- **Amplifikace obohacených knihoven** – Využívá proces PCR k amplifikaci obohacených knihoven.
- **Čištění amplifikovaných obohacených knihoven** – Využívá postup čištění pomocí částic, který purifikuje obohacené knihovny připravené na sekvenování.
- **Sekvenování** – Sekvenování obohacených knihoven je provedeno na sekvenačních systémech MiSeqDx, NextSeq 550Dx nebo NovaSeq 6000Dx. V systémech MiSeqDx a NextSeq 550Dx slouží integrovaný modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager k nastavení běhu sekvenování, monitorování běhu a primární analýze (generování FASTQ z přiřazení bází). V systému NovaSeq 6000Dx se pro nastavení běhu a sekundární analýzu používá aplikace DRAGEN pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s více dostupnými pracovními postupy.

Omezení postupu

- Určeno k diagnostice *in vitro*.
- Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilní s genomovou DNA odvozenou z lidských buněk a tkání.
- Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilní se vstupním materiálem gDNA se dvěma vlákny o hmotnosti 50–1000 ng. Pokud je množství vstupního materiálu mimo tento rozsah, není účinnost zaručena.
- Součástí sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nejsou reagenty pro extrakci DNA. Výsledky analytického testování včetně testování na ovlivnění, uvedené v části [Charakteristiky účinnosti na straně 56](#), byly získány s použitím plné krve a tkáně FFPE jakožto reprezentativních typů vzorků s reprezentativními sadami pro extrakci DNA. Všechny diagnostické testy vyvinuté pro použití s reagenty sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vyžadují úplné ověření všech stránek účinnosti s použitím zvolené sady pro extrakci DNA.
- Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se nedoporučuje pro nekvalitní vzorky FFPE s $\Delta Cq > 5$. Použití vzorků s $\Delta Cq > 5$ může zvýšit pravděpodobnost selhání přípravy knihovny a snížit účinnost rozboru.
- Reagenty sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx byly nakonfigurovány a otestovány z hlediska vstupního materiálu vzorků, reakcí obohacení a multiplexity (viz následující tabulka).

Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx	Vstupní materiál vzorku	Reakce obohacení	Multiplexita obohacení
Sada o 16 vzorcích	Nízká kvalita (FFPE)	16 reakcí	1plexní

Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx	Vstupní materiál vzorku	Reakce obohacení	Multiplexita obohacení
Sada o 96 vzorcích	Vysoká kvalita (např. celá krev)	8 reakcí	12plexní

- Zpracování vstupního materiálu FFPE bylo otestováno a doporučuje se výlučně pro jednoplexní reakce obohacení s použitím sady pro 16 vzorků.
- V případě sady pro 96 vzorků jsou možné nestandardní multiplexity (2plexní až 11plexní), ale mají následující omezení:
 - Zpracování vzorků v 2plexních až 11plexních reakcích obohacení snižuje výkonnost sady.
 - Optimální výsledky nejsou zaručeny. K zajištění vhodné výtěžnosti obohacení v případě nestandardních multiplexit může být nutná doplňková optimalizace.
 - V případě strategií sdružování do fondu založených na nízkých multiplexitách (2plexní až 8plexní) je požadován výběr adaptérů indexu s různými sekvencemi, aby bylo možné optimalizovat rovnováhu barev a zajistit úspěšné sekvenování a analýzu dat. Modul DNA GenerateFASTQ Dx v přístrojích MiSeqDx a NextSeq 550Dx nabízí možnosti kombinací barevně vyváženého indexu během nastavení běhu. Další informace o strategiích sdružování do fondu naleznete v části [Metody sdružování do fondu na straně 32](#).
- Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je omezena na vytváření obohacených knihoven, které jsou sekvenovány pouze na systémech MiSeqDx, NextSeq 550Dx a NovaSeq 6000Dx. Použití jiných sekvenačních systémů vyžaduje úplné ověření všech stránek účinnosti.
- Panely pro obohacení nejsou dodávány jako součást tohoto produktu. Výsledky analytického testování uvedené v části [Charakteristiky účinnosti na straně 56](#) byly získány s reprezentativními panely pro obohacení a jsou uvedeny jen pro informaci. Výsledky analytického testování slouží jako příklad obecných schopností rozboru a neurčují schopnosti nebo vhodnost týkající se konkrétních tvrzení o rozboru. Všechny diagnostické testy vyvinuté pro použití s těmito reagensy vyžadují plné ověření všech stránek účinnosti.
- Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilní s panely pro obohacení od společnosti Illumina i od nezávislých dodavatelů. Avšak účinnost panelů pro obohacení od nezávislých dodavatelů, které nespĺňují požadavky na panely, není zaručena. Informace o požadavcích na panel naleznete v části [Požadavky na panel sond pro obohacení na straně 9](#).
- Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx využívá hybridizaci v délce 2 hodin. Použití delší hybridizace může mít vliv na metriky účinnosti.
- Moduly DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager pro systém MiSeqDx and NextSeq 550Dx poskytují pouze soubory FASTQ. Pokud tyto moduly používáte, je nutné provést validaci sekundární analýzy.
- Aplikace DRAGEN pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je k dispozici pro systém NovaSeq 6000Dx. Aplikace podporuje více pracovních postupů sekundární analýzy, včetně generování souborů

FASTQ, generování souborů FASTQ a VCF pro detekci germinálních variant a generování souborů FASTQ a VCF pro detekci somatických variant. Pokud aplikaci používáte pro generování souborů VCF, nemusíte provádět validaci sekundární analýzy.

- Omezení pro použití aplikace DRAGEN pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se systémem NovaSeq 6000Dx naleznete v *příbalovém letáku k přístroji NovaSeq 6000Dx (dokument č. 200025276)*.

Složky produktu

Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se skládá z následujících součástí.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s indexy UD, sada A, katalog. č. 20051354 (16 vzorků) nebo č. 20051352 (96 vzorků)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s indexy UD, sada B, katalog. č. 20051355 (16 vzorků) nebo č. 20051353 (96 vzorků)
- Modul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx pro systém NextSeq 550Dx, katalog. č. 20063024
- Modul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx pro systém MiSeqDx, katalog. č. 20063022
- Aplikace DRAGEN pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pro systém NovaSeq 6000Dx, katalogové č. 20074609

Dodané reagensie

Provedení rozboru Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vyžaduje použití sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s indexy UD sady A nebo sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s indexy UD sady B. S použitím sady pro 16 nebo 96 vzorků můžete provést následující počet reakcí přípravy a obohacení knihoven.

Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx	Vstupní materiál vzorku	Reakce obohacení	Multiplexita obohacení
Sada o 16 vzorcích	Nízká kvalita (FFPE)	16 reakcí	1plexní
Sada o 96 vzorcích	Vysoká kvalita (např. celá krev)	8 reakcí	12plexní

Illumina DNA Prep With Enrichment Dx s indexy UD, sada A/B

Reagencie Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, skladování při teplotě 15 °C až 30 °C

Následující reagencie se dodávají při pokojové teplotě. Rychle uskladněte reagencie při požadované skladovací teplotě, abyste zajistili správnou účinnost.

Název reagencie	Počet zkumavek		Barva uzávěru	Objem plnění	Účinné látky
	16 vzorků (č. 20050020)	96 vzorků (č. 20050025)			
Pufr pro zastavení tagmentace 2 (ST2)	1	4	Červená	350 µl	Roztok detergentu ve vodě.
Promývací pufr tagmentace 2 (TWB2)	1	1	Zelená	41 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující detergent a sůl.
Čisticí částice (CB)	1	N/A*	Červená	10 ml	Tuhé paramagnetické částice v pufrovaném vodném roztoku.

*Součástí sady Illumina Prep Dx Cleanup Beads Dx pro 96 vzorků (katalogové č. 20050030) jsou čisticí částice pro 96 vzorků.

Čisticí částice Illumina Prep Dx (96 vzorků), skladování při teplotě 15 °C to 30 °C

V sadách pro 96 vzorků jsou čisticí částice součástí sady Illumina Prep Dx Cleanup Beads (katalogové č. 20050030). Následující reagencie se dodává při pokojové teplotě. Rychle uskladněte reagencie při požadované skladovací teplotě, abyste zajistili správnou účinnost. V sadách pro 16 vzorků jsou čisticí částice součástí sady Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (katalogové č. 20050020).

Název reagencie	Množství	Barva uzávěru	Objem plnění	Účinné látky
Čisticí částice (CB)	4	Červená	10 ml	Tuhé paramagnetické částice v pufrovaném vodném roztoku.

Reagencie Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, skladování při teplotě 2 °C až 8 °C

Následující reagencie se dodávají chlazené. Rychle uskladněte reagencie při požadované skladovací teplotě, abyste zajistili správnou účinnost. Zásobní zkumavku eBLTS uskladněte ve vzpřímené poloze, aby byly částice vždy ponořeny v pufru.

Název reagencie	Počet zkumavek		Barva uzávěru	Objem plnění		Účinné látky
	16 vzorků (č. 20050021)	96 vzorků (č. 20050026)		16 vzorků	96 vzorků	
Malé BLT pro obohacení (eBLTS)	1	4	Žlutá	200 µl	290 µl	Streptavidinové magnetické částice propojené s transpozony v pufrovaném vodném roztoku obsahujícím glycerol, EDTA, dithiothreitol, sůl a detergent.
Resuspenzační pufr (RSB)	1	4	Průhledná	1,8 ml	1,8 ml	Pufrovaný vodný roztok.

Reagencie Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, skladování při teplotě -25 °C až -15 °C

Následující reagencie se dodávají zmrazené. Rychle uskladněte reagencie při požadované skladovací teplotě, abyste zajistili správnou účinnost.

Název reagencie	Počet zkumavek		Barva uzávěru	Objem plnění		Účinné látky
	16 vzorků (č. 20050022)	96 vzorků (č. 20050027)		16 vzorků	96 vzorků	
Tagmentační pufr 1 (TB1)	1	4	Průhledná	290 µl	290 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující magneziovou sůl a dimethylformamid.
Směs Enhanced PCR (EPM)	2	4	Průhledná	200 µl	610 µl	DNA polymeráza a dNTP v pufrovaném vodném roztoku.

Reagencie Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 vzorků), skladování při teplotě 2 °C až 8 °C

V sadách pro 16 vzorků jsou v sadě Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalogové č. 20050023) následující reagencie. V sadách pro 96 vzorků jsou reagencie součástí sady Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalogové č. 20050028).

Následující reagencie se dodávají chlazené. Rychle uskladněte reagencie při požadované skladovací teplotě, abyste zajistili správnou účinnost.

Název reagencie	Počet zkumavek	Barva uzávěru	Objem plnění	Účinné látky
Streptavidinové magnetické částice (SMB3)	4	Průhledná	1,2 ml	Streptavidinové magnetické částice v pufrovaném vodném roztoku obsahujícím formamid, detergent a sůl.
Resuspenzační pufr (RSB)	1	Průhledná	1,8 ml	Pufrovaný vodný roztok.
Hybridizační pufr pro obohacení 2 (EHB2)	1	Průhledná	200 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující detergent a sůl.
Eluční cílový pufr 2 (ET2)	1	Průhledná	200 µl	Pufrovaný vodný roztok.

Reagencie Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 vzorků), skladování při teplotě 2 °C až 8 °C

V sadách pro 96 vzorků jsou součástí sady Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalogové č. 20050028) následující reagencie. V sadách pro 16 vzorků jsou reagencie součástí sady Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalogové č. 20050023).

Následující reagencie se dodávají chlazené. Rychle uskladněte reagencie při požadované skladovací teplotě, abyste zajistili správnou účinnost.

Název reagencie	Počet zkumavek	Barva uzávěru	Objem plnění	Účinné látky
Streptavidinové magnetické částice (SMB3)	2	Průhledná	1,2 ml	Streptavidinové magnetické částice v pufrovaném vodném roztoku obsahujícím formamid, detergent a sůl.
Resuspenzační pufr (RSB)	4	Průhledná	1,8 ml	Pufrovaný vodný roztok.
Hybridizační pufr pro obohacení 2 (EHB2)	1	Průhledná	200 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující detergent a sůl.
Eluční cílový pufr 2 (ET2)	1	Průhledná	200 µl	Pufrovaný vodný roztok.

Reagencie Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, skladování při teplotě -25 °C až -15 °C

Následující reagencie se dodávají zmrazené. Rychle uskladněte reagencie při požadované skladovací teplotě, abyste zajistili správnou účinnost.

Název reagencie	Počet zkumavek		Barva uzávěru	Objem plnění	Účinné látky
	16 vzorků (č. 20050024)	96 vzorků (č. 20050029)			
Eluční pufr pro obohacení 1 (EE1)	1	1	Průhledná	580 µl	Roztok detergentu ve vodě.
Vylepšený promývací pufr pro obohacení (EEW)	4	4	Žlutohnědá	4,1 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli a detergent.
Primerový koktejl PCR (PPC)	1	1	Průhledná	320 µl	Směs primerů PCR (oligonukleotidů).
2N NaOH (HP3)	1	1	Průhledná	200 µl	Roztok hydroxidu sodného (NaOH) s koncentrací 2 N.
Pufr HYB 2 s blokery IDT NXT (NHB2)	2	1	Modrá	480 µl	Pufrovaný vodný roztok s DNA Cot-1, shlukovacím činidlem a formamidem.
Směs Enhanced PCR (EPM)	2	1	Průhledná	200 µl	DNA polymeráza a dNTP v pufrovaném vodném roztoku.

Illumina Unique Dual Index Dx, sada A/B, skladování při teplotě -25 až -15°C

Následující reagencie se dodávají zmrazené. Rychle uskladněte reagencie při požadované skladovací teplotě, abyste zajistili správnou účinnost. Informace o sekvencích adaptéru indexů viz [Příloha: Sekvence adaptéru indexů UD Illumina na straně 60](#).

Komponenta	Množství
Illumina Unique Dual Index Dx, sada A (96 indexů), č. 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx, sada B (96 indexů), č. 20050039	1

Nedodané reagensie

Požadované reagensie, nedodané

- Reagensie pro extrakci a purifikaci DNA
- Reagensie pro kvantifikaci DNA
- Ethanol (100% pro molekulární biologii)
- Voda prostá nukleáz
- 1M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- Roztok NaOH s koncentrací 1 N v kvalitě pro molekulární biologii
- Pokud je použit sekvenační systém NextSeq 550Dx:
 - Sada reagensií NextSeq 550DxHigh Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) (katalogové č. 20028871)
- Pokud je použit sekvenační systém MiSeqDx:
 - Sada reagensií MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalogové č. 20037124)
- Pokud je použit sekvenační systém NovaSeq 6000Dx:
 - Sada reagensií NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cyklů) (katalogové č. 20046931)
 - Sada reagensií NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cyklů) (katalogové č. 20046933)
 - Kazeta s pufrem NovaSeq 6000Dx S2 (katalogové č. 20062292)
 - Kazeta s pufrem NovaSeq 6000Dx S4 (katalogové č. 20062293)
 - Zkumavka pro knihovnu NovaSeq 6000Dx (katalogové č. 20062290)
 - Zkumavka pro knihovnu NovaSeq 6000Dx, balení 24 kusů (katalogové č. 20062291)

Požadavky na panel sond pro obohacení

Reagensie sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx jsou kompatibilní s panely pro obohacení s oligonukleotidy DNA jak od společnosti Illumina, tak od nezávislých dodavatelů. Pokud používáte biotinované sondy DNA (fixní nebo vlastní panely), ujistěte se, že splňují požadované specifikace.

Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx byla optimalizována a ověřena pomocí následujících specifikací pro panely od nezávislých dodavatelů. Pokud použijete panely od nezávislých dodavatelů, které nespĺňují specifikace, není zaručena srovnatelná účinnost.

- Délka sondy 80 bp nebo 120 bp
- Mezi 500 až 675 000 sondami
- DNA s jedním nebo dvěma vlákny
- Celkové množství vstupního materiálu sondy ≥ 3 pmol pro obohacení při multiplexitách od 1 do 12

Skladování a manipulace

- Pokojová teplota je definována jako 15 °C až 30 °C.
- Reagencie jsou stabilní, pokud jsou skladovány v souladu s pokyny až do data použitelnosti uvedeného na štítcích sady. Informace o teplotách skladování naleznete v části [Dodané reagencie na straně 4](#).
- Zmrazené reagencie jsou stabilní po dobu nejvíce čtyřech cyklů zmrazování a rozmrazování, které proběhnou před udaným datem použitelnosti.
- Postup pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx zahrnuje následující body bezpečného přerušení:
 - Po postupu [Amplifikace tagmentované DNA na straně 27](#) jsou amplifikované knihovny stabilní až 30 dní, pokud jsou skladovány při teplotě -25 °C až -15 °C.
 - Po postupu [Čištění knihoven na straně 30](#) jsou vyčištěné amplifikované knihovny stabilní až 30 dní, pokud jsou skladovány při teplotě -25 °C až -15 °C.
 - Po postupu [Sdružování předem obohacených knihoven do fondu na straně 32](#) jsou knihovny sdružené do fondu stabilní až 30 dní, pokud jsou skladovány při teplotě -25 °C až -15 °C.
 - Po postupu [Amplifikace obohacené knihovny na straně 43](#) může deska s obohacenými amplifikovanými knihovnami zůstat v termocykléru až 24 hodin. Desku lze případně skladovat při teplotě 2 °C až 8 °C až 48 hodin.
 - Konečné vyčištěné obohacené knihovny jsou stabilní až 7 dní, pokud jsou skladovány při teplotě -25 °C až -15 °C.
- Dojde-li k poškození nebo porušení obalu nebo obsahu kterékoliv součásti sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, obraťte se na zákaznický servis společnosti Illumina.
- Pufr pro zastavení tagmentace 2 (ST2) může tvořit viditelné sraženiny nebo krystalky. Pokud je pozorován výskyt sraženin, ohřívejte při teplotě 37 °C po dobu 10 minut. Poté promíchejte ve vortexové třepačce, dokud se sraženina nerozpustí.
- Oligo pro hybridizaci (HYB) a Vylepšený promývací pufr pro obohacení (EEW) je třeba předeheat na stejnou teplotu, jako je teplota udržování hybridizace platná pro typ vzorku a panel sond. Další informace o nakládání s NHB2 a EEW naleznete v části [Poznámky k postupu na straně 15](#).
- V hybridizačním pufru pro obohacení 2 (EHB2) a pufru HYB s blokery IDT NXT (NHB2) se mohou tvořit krystalky a zákal. Pokud jsou přítomny krystalky nebo zákal, rozmíchejte je ve vortexové třepačce, nebo pohybujte pipetou nahoru a dolů, dokud není roztok čirý. Pufr NHB2 před pipetováním předeheat.
- Při manipulaci s čistícími částicemi (CB) používejte následující osvědčené postupy:
 - Částice nikdy nezmrazujte.
 - Bezprostředně před použitím míchejte částice ve vortexové třepačce, dokud nejsou resuspendovány a nemají homogenní barvu.
- Při manipulaci s produktem Malé BLT pro obohacení (eBLTS) používejte následující osvědčené postupy:
 - Zkumavku eBLTS uskladněte ve vzpřímené poloze, aby byly částice vždy ponořeny v pufru.

- Důkladně eBLTS promíchejte ve vortexové třepačce, dokud se částice neresuspendují. Aby se zabránilo opětovnému usazení částic, nedoporučuje se odstředování před pipetováním.
- Pokud částice přilnou k boku nebo vrchu desky s 96 jamkami, odstředujte při 280 g po dobu 3 sekund a potom resuspendujte pipetou.
- Při manipulaci s deskami s adaptéry indexu se řiďte následujícími zásadami dobré praxe:
 - Nepřidávejte vzorky na desku adaptéru indexu.
 - Každá jamka na desce adaptéru je určena pro jedno použití.

Požadované vybavení a materiály, nedodané

Před zahájením protokolu zkontrolujte, že máte kromě sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx k dispozici požadované vybavení a materiály.

Vybavení

Před zahájením protokolu zkontrolujte, zda máte k dispozici požadované vybavení.

Protokol byl optimalizován a ověřen s použitím položek s uvedenými specifikacemi. Pokud je použito vybavení s odlišnými specifikacemi, není zaručena srovnatelná účinnost.

Některé položky jsou potřebné pouze v určitých pracovních postupech. Tyto položky jsou uvedeny v samostatných tabulkách.

- Termocyklér s následujícími specifikacemi:
 - Vyhřívané víko
 - Minimální rozsah kontroly teploty 10 až 98 °C
 - Minimální přesnost teploty $\pm 0,25$ °C
 - Maximální reakční objem 100 μ l
 - Kompatibilní s deskami PCR s plným lemem a 96 jamkami
- Inkubátor mikrovzorků s následujícími specifikacemi:
 - Rozsah teploty okolí +5,0 °C až 99,0 °C
 - Kompatibilní s deskami MIDI s 96 jamkami
- Vložky do inkubátoru mikrovzorků kompatibilní s deskami MIDI s 96 jamkami
- Vysokorychlostní třepačka pro mikrodесky s rozsahem rychlosti míchání 200–3000 ot./min.
- Magnetický stojan kompatibilní s deskami PCR s 96 jamkami
- Magnetický stojan kompatibilní s deskami MIDI s 96 jamkami
- Fluorometr kompatibilní s použitou metodou kvantifikace
- Analyzátor fragmentů DNA

- Přesné pipety:
 - Jednokanálové a vícekanálové pipety, 10 µl
 - Jednokanálové a vícekanálové pipety, 20 µl
 - Jednokanálové a vícekanálové pipety, 200 µl
 - Jednokanálové a vícekanálové pipety, 1 000 µl
 - Přesné pipety zajišťují přesnou aplikaci reagensů a vzorků. Jednokanálové nebo vícekanálové pipety lze použít, pokud jsou pravidelně kalibrovány a mají přesnost do 5 % uvedeného objemu.
- Odstředivka pro mikroskopy
- Mikroodstředivka
- Jeden z následujících sekvenačních systémů Illumina:
 - Přístroj MiSeqDx, katalogové č. DX-410-1001
 - Přístroj NextSeq 550Dx, katalogové č. 20005715
 - Přístroj NovaSeq 6000Dx, katalogové č. 20068232
- [Volitelně] Vakuový koncentrátor
- [FFPE] Systém detekce PCR v reálném čase

Materiály

Před zahájením protokolu zkontrolujte, zda máte k dispozici požadovaný materiál.

Některé položky jsou potřebné pouze v určitých pracovních postupech. Tyto položky jsou uvedeny v samostatných tabulkách.

Protokol byl optimalizován a ověřen pomocí uvedených položek. Při použití alternativních materiálů není zaručena srovnatelná účinnost.

- Filtrové pipetovací špičky
- Kónické zkumavky odstředivky, 15 ml nebo 50 ml
- Zkumavky mikroodstředivky, 1,5 ml
- Vícekanálové nádoby na reagensie prosté RNaz/DNaz, jednorázové
- Proužky s 8 zkumavkami a uzávěry prosté RNaz/DNaz
- Sérologické pipety
- Polypropylénová úložná deska s 96 hlubokými jamkami, 0,8 ml (deska MIDI)
- Desky PCR s tvrdým pouzdem, plným lemem a 96 jamkami
- [FFPE] Desky qPCR kompatibilní s přístrojem qPCR
- Lepicí těsnění na desky s 96 jamkami s následujícími specifikacemi:
 - Odlupovací, opticky čirý polyester
 - Vhodné pro desky PCR s lemem

- Silné lepidlo, které odolává opakovaným změnám teploty v rozsahu –40 °C – 110 °C
- Bez DNaz/RNaz
- Plastový spotřební materiál kompatibilní se zvolenou metodou kvantifikace
- Sada pro fluorometrickou kvantifikaci dvouvláknové DNA kompatibilní se zvoleným systémem kvantifikace
 - Ke kvantifikaci předem obohacených amplifikovaných knihoven lze použít sadu pro kvantifikaci se širokým rozsahem.
 - Pro kvantifikaci obohacených knihoven závisí rozsah sady pro kvantifikaci na použitém panelu sond.
- Sada pro analýzu fragmentů pro kvantifikaci knihoven se zvoleným systémem kvantifikace:
 - Pro kvalifikaci předem obohacených amplifikovaných knihoven lze použít sadu se širokým rozsahem.
 - Pro kvalifikaci obohacených knihoven závisí rozsah sady pro kvalifikaci na použitém panelu sond.
- **[Volitelné]** Sada pro extrakci DNA z lidských buněk a tkání. Můžete použít libovolnou ověřenou metodu extrakce.

Sběr, přeprava a skladování vzorků



UPOZORNĚNÍ

Se všemi vzorky zacházejte tak, jakoby byly potenciálně infekčními činidly.

- Tento rozbor je kompatibilní s genomovou DNA odvozenou z lidských buněk a tkání.
- V případě komerčně dostupné purifikované gDNA se ujistěte, že vzorky byly přepravovány za správných podmínek a skladovány v souladu s pokyny výrobce. Při skladování a cyklech zmrazování a rozmrazování gDNA dodržujte zásady dobré praxe.
- V případě vstupního materiálu z plné krve dodržujte požadavky na odběr, přepravu a skladování krve, které se týkají zvolené metody extrakce DNA. Lze použít libovolnou ověřenou metodu extrakce. Přeprava plné krve musí splňovat státní i místní předpisy pro přepravu patogenů.
- K získání DNA z tkáně FFPE lze použít libovolnou ověřenou metodu extrakce. Při určování následujících postupů se řiďte pokyny a doporučeními týkajícími se zvolené metody extrakce:
 - Metoda fixace formalínem a zalití v parafínu pro tkáně, aby byla zajištěna nejvyšší kvalita získané DNA.
 - Skladování vzorků FFPE.
 - Požadavky na počáteční materiál, jako je počet a tloušťka částí tkání FFPE. Většina metod purifikace doporučuje čerstvě vyříznuté části.

Varování a preventivní opatření

- Reagencie sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx obsahují potenciálně nebezpečné chemikálie. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagenциemi nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi. Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete na bezpečnostních listech (SDS) na stránce support.illumina.com/sds.html.
- Se všemi vzorky krve zacházejte tak, jakoby byly infekční na virus HIV, virus lidské hepatitidy B (HBV) a další krevní patogeny (univerzální preventivní opatření).
- Dodržujte běžná laboratorní preventivní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejzte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a sadami reagenциí používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a sadami reagenциí si důkladně umyjte ruce.
- Aby se zabránilo degradaci vzorku nebo reagenциe, zajistěte, aby byly před zahájením protokolu zcela rozptýleny všechny páry chlornanu sodného vzniklé čištěním.
- Kontaminace vzorků jinými produkty nebo amplikony PCR může vést k nepřesným nebo nespolehlivým výsledkům. Chcete-li zabránit kontaminaci, použijte následující zásady dobré praxe:
 - Řiďte se řádnými laboratorními postupy a laboratorními hygienickými postupy.
 - Kroky pracovního postupu provádějte ve stanovených prostorech pro práci před amplifikací a po amplifikaci.
 - Použité reagenциe skladujte před čištěním knihoven v prostoru pro práci před amplifikací.
 - Reagenциe pro použití před amplifikací oddělte od reagenциí pro použití po amplifikaci.
 - Zajistěte, aby bylo vybavení v prostorech pro práci před amplifikací a po amplifikaci, jako jsou pipety, špičky pipet, vortexová třepačka a odstředivka, vyhrazeno pro daný účel.
- Zabraňte křížové kontaminaci. Mezi vzorky a mezi vypouštěním činidel použijte čerstvé špičky pipet. Použití filtrovaných špiček snižuje riziko přenosu amplikonu a křížové kontaminace mezi vzorky.
 - Při přidávání nebo přenosu vzorků nebo hlavních směsí reagenциí vyměňte špičky po každém vzorku.
 - Při přidávání adaptérů indexu pomocí vícekanálové pipety vyměňte špičky po každém řádku nebo každém sloupci. Pokud používáte jednocanálovou pipetu, vyměňte špičky po každém vzorku.
 - Odeberte nepoužité desky adaptéru indexu z pracovní oblasti.
- Během promývání ethanolem dodržujte zásady dobré praxe:
 - Vždy připravte čerstvý 80% ethanol. Ethanol může pohlcovat vzdušnou vlhkost, což může mít vliv na výsledky.
 - Ujistěte se, že během promývání je veškerý ethanol odstraněn ze dna jamek. Zbytky ethanolu mohou mít vliv na výsledky.
 - Během kroků prováděných na magnetickém stojanu dodržujte stanovený čas schnutí, aby bylo zajištěno úplné odpaření. Zbytkový ethanol může mít vliv na účinnost následných reakcí.

- Před použitím vždy připravte hlavní směsi a nikdy neskladujte kombinované pracovní roztoky.
- Účinnost sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx není zaručena, pokud nejsou dodrženy postupy uvedené v tomto příbalovém letáku.
- Nepoužívejte žádné součásti sady po datu použitelnosti uvedeném na štítku sady.
- Nezaměňujte součásti sady za součásti z jiných sad Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Sady jsou označeny na štítku sady.

Poznámky k postupu

Doporučení ke vstupnímu materiálu DNA

Protokol sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilní se vstupními materiály vysoce kvalitní dvouvláknové genomové DNA (gDNA) v rozsahu hmotností 50–1000 ng.

Ujistěte se, že počáteční vzorek gDNA neobsahuje více než 1 mM EDTA a je prostý organických kontaminantů, jako je fenol a ethanol. Tyto látky mohou ovlivnit tagmentační reakci a způsobit selhání rozboru.

Vstupní materiál gDNA \geq 50 ng

Pokud je hmotnost vstupního materiálu gDNA v rozsahu 50–1000 ng, není požadována kvantifikace a normalizace počátečního vzorku gDNA.

Vstupní materiál gDNA < 50 ng

Vstupní materiál gDNA o hmotnosti 10–50 ng lze použít s následujícími úpravami:

- Pokud je použit vstupní materiál gDNA o hmotnosti 10–49 ng, je doporučena kvantifikace počátečního vzorku gDNA, aby se určil počet cyklů PCR potřebných po tagmentaci. Ke kvantifikaci vstupního materiálu gDNA se dvěma vlákny použijte metodu na bázi fluorescence. Vyhněte se použití metod, které měří celkovou nukleovou kyselinu, jako je NanoDrop nebo další metody založené na pohlcování záření UV.
- Tento protokol nenormalizuje konečnou výtěžnost předem obohacené knihovny ze vstupní gDNA o hmotnosti 10–49 ng a proto je před obohacením a po něm požadována kvantifikace a normalizace knihoven.
- Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx byla charakterizována a ověřena pro vstupní materiály DNA v rozsahu 50–1000 ng. V případě vstupního materiálu gDNA o hmotnosti nižší než 50 ng nelze zaručit rovnocennou účinnost produktu.

Doporučení ke vstupnímu materiálu krve

Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilní s gDNA získanou z periferní plné krve. Lze použít libovolnou ověřenou metodu extrakce. Při získávání gDNA z plné krve není požadována počáteční kvantifikace vstupní DNA a sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx produkuje výtěžnost z normalizované, předem obohacené knihovny.

Množství DNA získané ze vzorků plné krve, a tím i normalizaci knihovny, mohou nepříznivě ovlivnit následující faktory:

- Stáří vzorku krve
- Podmínky skladování
- Předchozí zdravotní stav ovlivňující počet bílých krvinek

Doporučení ke vstupnímu materiálu vzorku tkáně FFPE

K určení patřičného vstupního materiálu pro úspěšnou přípravu knihovny použijte následující kritéria kvality DNA získané z FFPE:

- U vzorků FFPE s hodnotou $\Delta Cq \leq 5$ je doporučené množství vstupního materiálu DNA 50–1000 ng.
- Rozbor Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se nedoporučuje pro nekvalitní vzorky FFPE s $\Delta Cq > 5$. Použití vzorků s $\Delta Cq > 5$ je možné, ale může zvýšit pravděpodobnost selhání přípravy knihovny nebo snížit účinnost rozboru.

Extrakce vzorku FFPE

Použijte metodu izolace nukleové kyseliny, která se vyznačuje vysokou výtěžností regenerace, minimalizuje spotřebu vzorku a zachovává celistvost vzorku. K získání DNA ze vzorků FFPE můžete použít libovolnou ověřenou metodu. V případě gDNA získané z tkáně FFPE je potřebná počáteční kvantifikace vstupního materiálu DNA a sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx neprodukuje normalizovanou výtěžnost z předem obohacených knihoven.

Kvalifikace DNA ze vzorků FFPE

gDNA získaná z tkáně FFPE musí být před použitím kvalifikována. V zájmu zajištění optimální účinnosti vyhodnoťte kvalitu vzorku DNA metodou extrakce, která byla ověřena pro kvalifikaci DNA získané ze vzorků FFPE. Protokol sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilní s DNA ze vzorků FFPE hodnotou $\Delta Cq \leq 5$. Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se nedoporučuje pro nekvalitní vzorky FFPE s $\Delta Cq > 5$. Použití vzorků s $\Delta Cq > 5$ je možné, ale může zvýšit pravděpodobnost selhání přípravy knihovny nebo snížit účinnost rozboru.

[Volitelně] Referenční vzorky FFPE

Při provádění protokolu použijte jako pozitivní kontrolu charakterizované referenční materiály, jako je Horizon HD799 (DNA). Jako referenční vzorky lze použít také kvalifikované materiály FFPE z xenoštěpů odvozených z buněčných linií. Ke kvantifikaci referenčních materiálů před použitím použijte metodu založenou na fluorometrii.

POZNÁMKA Zpracování referenčního vzorku pozitivní kontroly nebo kontroly bez templátu spotřebovává reagentie a snižuje celkový počet neznámých vzorků, které lze zpracovat.

Doporučení ke vstupnímu materiálu vzorku

Doporučení pro vstupní materiál vzorků pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka 1 Doporučení ke vstupnímu materiálu vzorku

Typ vstupního materiálu vzorku	Množství vstupního materiálu vzorku	Kvantifikace požadovaného vstupního materiálu DNA	Požadovaná kvalita vstupního materiálu DNA	Normalizovaná výtěžnost předem obohacené knihovny
gDNA	10–49 ng	Ano	Poměr absorpance 260/280 1,8–2,0	Ne
gDNA	50–1000 ng	Ne	Poměr absorpance 260/280 1,8–2,0	Ano
gDNA z krve	50–1000 ng	Ne	Poměr absorpance 260/280 1,8–2,0	Ano
gDNA z FFPE	50–1000 ng	Ano	Hodnota $\Delta Cq \leq 5$	Ne

Doporučený počet cyklů PCR pro program PCR eBLTS je upraven podle koncentrace a kvality vstupního materiálu vzorku. Další informace naleznete v části [Amplifikace tagmentované DNA na straně 27](#).

Tipy a techniky

Předcházení křížové kontaminaci

- Při přidávání nebo přenosu vzorků vyměňte špičky po *každém vzorku*.
- Při přidávání adaptérů indexu pomocí vícekanálové pipety vyměňte špičky po *každém řádku* nebo *každém sloupci*. Pokud používáte jednokanálovou pipetu, vyměňte špičky po každém vzorku.

Zapečetění desky

- Desku s 96 jamkami před provedením následujících kroků protokolu vždy utěsněte pomocí nového lepicího těsnění.
 - Kroky míchání v třepačce
 - Kroky inkubace. Nesprávné zapečetění desky může vést k odpařování během inkubace.
 - Kroky odstředování
 - Kroky hybridizace
- Zajistěte, aby okraje a jamky byly důkladně utěsněné. Sníží se tím riziko křížové kontaminace a odpařování.
 - Pokud je pozorována na těsnění nebo bočních stěnách jamek desky jakákoliv kapalina nebo kondenzace, před odpečetěním desku odstředte.

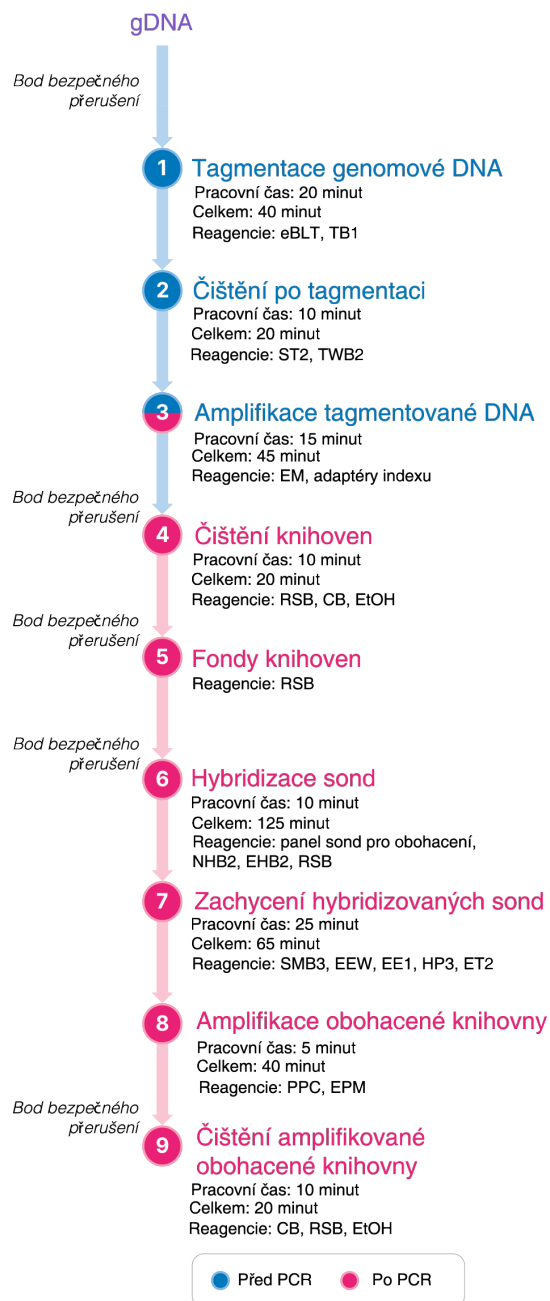
- Položte desku na rovný povrch a poté opatrně sejměte těsnicí fólii.

Zacházení s produktem Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Zásobní zkumavku eBLTS uskladněte v chladničce ve vzpřímené poloze, aby byly částice vždy ponořeny v pufu.
- Bezprostředně před použitím zásobní zkumavku eBLTS důkladně promíchejte ve vortexové třepačce, dokud se částice neresuspendují. Aby se zabránilo opětovnému usazení částic, nedoporučuje se odstředování před pipetováním.
- Pokud částice přilnou k boku nebo vrchu desky s 96 jamkami, odstředujte při 280 g po dobu 3 sekund a potom resuspendujte pipetou.
- Během promývání eBLTS:
 - Pro desku použijte vhodný magnetický stojan.
 - Ponechte desku na magnetickém stojanu, dokud pokyny nebudou vyžadovat její odebrání.
 - Pokud dojde k nasátí částic do pipetových špiček, vypusťte částice zpět na desku na magnetickém stojanu a vyčkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).

Pracovní postup pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Následující diagram znázorňuje pracovní postup pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Mezi jednotlivými kroky jsou označeny body bezpečného přerušení postupu. Odhadované doby vycházejí ze zpracování 12 vzorků s 12plexním obohacením.



Návod k použití

Tato část popisuje protokol sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

- Zkontrolujte celý naplánovaný pracovní postup sekvenování, od vzorku po analýzu, abyste zajistili kompatibilitu produktů a parametrů experimentu.
- Před pokračováním zkontrolujte obsah sady a ujistěte se, že máte požadované součásti, vybavení a materiály.
 - Biotinované sondy od nezávislých dodavatelů musí splňovat konkrétní požadavky. V části [Požadavky na panel sond pro obohacení na straně 9](#) zkontrolujte, zda sondy třetích stran splňují požadavky.
- Dodržujte kroky protokolu v uvedeném pořadí, s použitím stanovených objemů a parametrů inkubace.
- Pokud v protokolu není stanoven bod bezpečného přerušování, přejděte ihned k dalšímu kroku.
- Při vytváření hlavní směsi je v poskytnutých objemech zahrnut přebytek.
- Ujistěte se, že použijete vhodný magnetický stojan pro daný typ desky.

Příprava na sdružování do fondu

Tento krok je potřebný k zajištění úspěšného sekvenování obohacených knihoven. Sdružování knihoven do fondu může nastat před obohacením a před sekvenováním.

Před obohacením – Jednotlivé indexované amplifikované knihovny jsou sdruženy do fondu společně za účelem obohacení s vybraným panelem sond. Vytvoří se multiplexovaný fond obohacených knihoven. Pro vstupní materiál vzorku FFPE bylo testováno zpracování a doporučuje se výlučně pro 1plexní reakce obohacení. Pro vysoce kvalitní gDNA bylo testováno 12plexní obohacení. Je však možné použít 2plexní až 11plexní obohacení.

Před sekvenováním – 1plexní obohacené knihovny nebo multiplexní obohacené knihovny jsou sdruženy společně před sekvenováním. Počet obohacených knihoven, které lze sekvenovat, závisí na hloubce čtení cíle pro každý vzorek na použitém sekvenačním systému.

Jedinečné dvojitě indexování

Sada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx využívá jedinečné dvojitě indexy.

- Knihovny s dvojitými indexy přidávají sekvence indexu 1 (i7) a indexu 2 (i5) za účelem generování jedinečně označených knihoven.
- Indexy UD mají rozlišitelné, vzájemně nesouvisející sekvence indexů pro čtení indexů i7 a i5. Indexy mají délku 10 bází.

Výběr adaptérů indexu s různými sekvencemi pro knihovny sdružené do fondu optimalizuje vyvážení barev a zajišťuje úspěšné sekvenování a analýzu dat. Multiplexní fondy, které jsou více než 10plexní, mají přirozeně vyvážené barvy, takže mohou využívat libovolnou kombinaci adaptérů indexu. Během běhu sekvenování poskytuje modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager možnosti kombinací barevně vyváženého indexu a upozorní vás, pokud ve vybraných kombinacích indexu není dostatečná různorodost.

Další informace o sekvencích adaptéru indexů UD od společnosti Illumina a uspořádání desek viz [Příloha: Sekvence adaptéru indexů UD Illumina na straně 60](#).

Podporované multiplexity obohacení

Reagencie sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jsou konfigurovány a testovány při 1plexním a 12plexním obohacení. Ačkoliv jsou možné i jiné multiplexity obohacení, některé multiplexity vyžadují další reagencie pro přípravu předem obohacených knihoven a panel sond pro obohacení.

Získání vhodné výtěžnosti obohacení v případě nestandardních multiplexit obohacení může vyžadovat další optimalizaci. Optimální výsledky nejsou zaručeny.

- **Multiplexita obohacení** – Počet předem obohacených knihoven (1–12) sdružených společně v jedné reakci obohacení za účelem hybridizace pomocí panelů sond pro obohacení. Například spojením 12 předem obohacených knihoven lze vytvořit fond 12plexního obohacení.
- **Reakce obohacení** – Počet jedinečných příprav reakce obohacení bez ohledu na počet předem obohacených knihoven sdružených do fondu pro jednu reakci. Například jedna reakce obohacení může připravit fond 1plexního nebo 12plexního obohacení.

Chcete-li vypočítat celkový počet následně obohacených knihoven, vynásobte multiplexitu obohacení na jednu reakci počtem reakcí obohacení. Například jedna reakce obohacení fondu 12plexního obohacení vyprodukuje fond 12 následně obohacených knihoven.

Při sdružování předem obohacených knihoven do fondu podporují reagencie sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx následující reakce a multiplexity obohacení.

Reagencie sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx	Reakce obohacení	Multiplexita obohacení
Sada o 16 vzorcích	16 reakcí	1plexní
Sada o 96 vzorcích	8 reakcí	12plexní

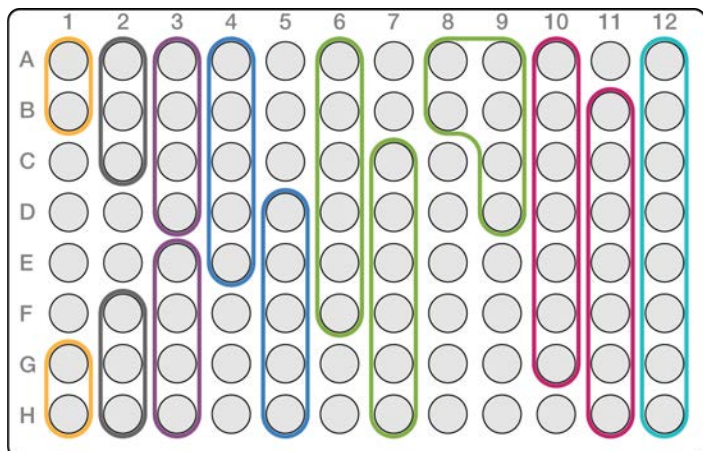
Dvoj až osmiplexní strategie sdružování do fondu

V následující tabulce jsou uvedeny adaptéry indexu (jamky), které lze kombinovat ve 2 až 8plexovém fondu. Barevná označení na obrázku znázorňují jednotlivé kombinace.

Do fondu přidejte libovolný počet vyšší než 2 shora nebo zdola sloupce. Nevkládejte do fondu napříč řádkem.

Multiplexita	Kombinace	Barva na obrázku
2	První dvě nebo poslední dvě jamky ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> • A a B • G a H Řádky C–F nejsou použity.	Oranžová

Multiplexita	Kombinace	Barva na obrázku
3	První tři nebo poslední tři jamky ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> • A–C • F–H Řádky D a E nejsou použity.	Šedá
4	První čtyři nebo poslední čtyři jamky ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> • A–D • E–H 	Purpurová
5	Prvních pět nebo posledních pět jamek ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> • A–E • D–H 	Modrá
6	[Varianta 1] Prvních šest nebo posledních šest jamek ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> • A–F • C–H [Varianta 2] První dvě jamky (A a B) nebo poslední dvě jamky (G a H) v jednom sloupci a libovolné čtyři jamky v sousedním sloupci.	Zelená
7	Prvních sedm nebo posledních sedm jamek ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> • A–G • B–H 	Růžová
8	Celý sloupec.	Modrozelená

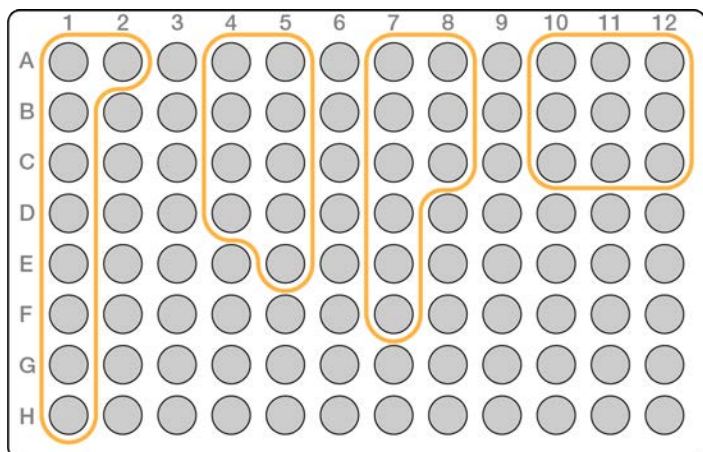


Devítiplexní strategie sdružování do fondu

Použijte adaptéry indexu z libovolných jamek, které optimalizují rovnováhu barev v rámci běhu sekvenování, například:

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

Následující obrázek znázorňuje všechny čtyři příklady.



Tagmentace genomové DNA

Tento krok využívá produkt Enrichment BLT Small (eBLTS) pro tagmentaci DNA, což je proces, který fragmentuje a označuje DNA pomocí sekvencí adaptéru.

Spotřební materiál

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (žlutý uzávěr)
- TB1 (Tagmentační pufr 1)
- Voda prostá nukleáz
- Deska PCR s 96 jamkami
- Samolepicí těsnicí uzávěr
- Zkumavky mikroadstředivky, 1,7 ml
- Proužek s 8 zkumavkami
- Pipetovací špičky
 - Vícekanálové pipety, 200 µl



UPOZORNĚNÍ

Tato sada reagensií obsahuje potenciálně nebezpečné chemické látky. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagensiemi nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi. Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete na bezpečnostních listech (SDS) na stránce support.illumina.com/sds.html.

Reagencie

- eBLTS musí být skladován při teplotách 2 °C až 8 °C. Nepoužívejte eBLTS, který byl skladován při teplotě nižší než 2 °C.
- Produkt eBLTS neodstřed'ujte.

Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
eBLTS (žlutý uzávěr)	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě. Bezprostředně před použitím promíchejte ve vortexové třepačce. Před pipetováním neodstřed'ujte.
TB1	-25 °C až -15 °C	Přiveďte k pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce.

2. DNA míchejte ve vortexové třepačce nebo pipetou a poté krátce odstřed'te.
3. Uložte do termocykléru následující program TAG:
 - Zvolte možnost přehřátého víka a nastavte teplotu 100 °C

- Nastavte reakční objem na 50 µl
- 55 °C po dobu 5 minut
- Udržujte při teplotě 10 °C

Postup

1. Do každé jamky desky PCR s 96 jamkami přidejte 2–30 µl DNA, aby bylo celkové množství vstupního materiálu 50–1000 ng.
Pokud je objem DNA menší než 30 µl, přidejte vodu prostou nukleáz do vzorků DNA, abyste získali celkový objem 30 µl.
2. Důkladně eBLTS promíchejte ve vortexové třepačce, dokud se částice zcela neresuspendují.
3. Nakombinujte následující objemy ve zkumavce, abyste připravili hlavní směs pro tagmentaci. Vynásobte každý objem počtem zpracovávaných vzorků.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Přebytek reagensů je zahrnut v objemu.
4. Pipetováním hlavní směs pro tagmentaci důkladně promíchejte.
5. Rozdělte objem hlavní směsi pro tagmentaci rovnoměrně od proužku pro 8 zkumavek.
6. Vícekanálovou 200µl pipetou přeneste 20 µl tagmentační hlavní směsi do každé jamky desky PCR se vzorkem. Pro každý sloupec nebo řádek vzorků použijte čisté špičky.
7. Po vypuštění hlavní směsi pro tagmentaci proužek pro 8 zkumavek vyhodte.
8. Pomocí 200µl vícekanálové pipety nastavené na objem 40 µl napipetujte každý vzorek 10krát, abyste zajistili promíchání. Pro každý sloupec vzorků použijte čerstvé špičky.
Případně zapečete desku PCR a míchejte 1 minutu v třepačce desek při 1600 ot./min.
9. Zapečete desku, umístěte ji do předem naprogramovaného termocykléru a spusťte program TAG.
10. Počkejte, dokud program TAG nedosáhne teploty udržování 10 °C, a poté desku ihned vyjměte.
11. Nechte desku PCR s 96 jamkami 2 minuty stát při pokojové teplotě a poté přejděte k dalšímu kroku.

Čištění po tagmentaci

Tento krok promyje adaptérem označenou DNA v produktu eBLTS před amplifikací PCR.

Spotřební materiál

- ST2 (Pufr pro zastavení tagmentace 2)
- TWB2 (Promývací pufr tagmentace 2)
- Magnetický stojan desky PCR s 96 jamkami
- Samolepicí těsnicí uzávěr

- Proužek s 8 zkumavkami
- Pipetovací špičky
 - Vícekanálové pipety, 20 µl
 - Vícekanálové pipety, 200 µl
- Připravte pro pozdější postup:
 - EPM (Směs Enhanced PCR)
 - Deska adaptéru indexu

Reagencie

- Ujistěte se, že použijete vhodný magnetický stojan pro danou desku. Použití magnetického stojanu desky MID pro desku PCR může zabránit přilnutí pufu TWB2 na částice.
- Puf TWB2 pipetujte pomalu, aby se minimalizovala tvorba pěny a zabránilo se nasátí nesprávného objemu a neúplnému promíchání.

Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte na ledu po dobu 1 hodiny. Promíchejte v překlopné třepačce a poté krátce odstředte.
ST2	15 °C až 30 °C	Pokud je pozorován výskyt sraženin, ohřívejte při teplotě 37 °C po dobu 10 minut. Poté promíchejte ve vortexové třepačce, dokud se sraženina nerozpustí. Používejte při pokojové teplotě.
TWB2	15 °C až 30 °C	Používejte při pokojové teplotě.
Deska adaptéru indexu	-25 °C až -15 °C	Nechte 30 minut rozmrazit při pokojové teplotě.

Postup

1. Přidejte 10 µl ST2 ke každé tagmentační reakci. Pokud používáte vícekanálovou pipetu, napipetujte ST2 do proužku pro 8 zkumavek a poté přeneste patřičné objemy na desku PCR. Pro každý sloupec nebo řádek vzorků použijte čisté špičky.
2. Pomocí 200µl pipety nastavené na objem 50 µl pomalu napipetujte každou jamku 10krát, aby se resuspendovaly částice.
Případně zapečte desku a míchejte v třepačce při 1600 ot./min po dobu 1 minuty. Podle potřeby opakujte.
3. Zapečte desku a poté odstřed'ujte při 280 g po dobu 10 sekund.
4. Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.

5. Umístěte na magnetický stojan desky PCR a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (3 minuty).
6. [≤ 48 vzorků] Třikrát promyjte, jak je uvedeno dále.
 - a. Pomocí 200µl vícekanálové pipety nastavené na objem 60 µl odeberte a zlikvidujte supernatant, aniž byste narušili shluk částic.
 - b. Vyjměte z magnetického stojanu.
 - c. Ihned poté pomalu přidejte 100 µl pufru TWB2 přímo na částice.
 - d. Pomalu pipetujte, dokud nebudou částice zcela resuspendovány. Případně zapečete desku a míchejte v třepačce při 1600 ot./min po dobu 1 minuty.
 - e. V případě vystříknutí odstřeďte ke dnu při 280 g po dobu 10 sekund.
 - f. Umístěte na magnetický stojan desky PCR a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (3 minuty).
Ponechte desku na magnetickém stojanu a TWB2 v jamkách, aby se zabránilo přeschnutí při třetím promývání. Po přípravě hlavní směsi PCR odeberte a zlikvidujte supernatant.
 - g. Pomocí 200µl vícekanálové pipety nastavené na objem 100 µl odeberte a zlikvidujte supernatant.
 - h. Opakujte kroky c–f dvakrát, abyste docílili tři promytí.
7. [> 48 vzorků] Třikrát promyjte, jak je uvedeno dále.
 - a. Aby se předešlo přeschnutí, proveďte kroky b a c po přírůstcích ve velikosti 1 sloupce až 2 sloupců, dokud nebudou zpracovány všechny sloupce.
 - b. Pomocí 200µl vícekanálové pipety nastavené na objem 60 µl odeberte a zlikvidujte supernatant.
 - c. Vyjměte z magnetického stojanu.
 - d. Ihned poté pomalu vypusťte 100 µl pufru TWB2 přímo na částice.
 - e. Pomalu pipetujte, dokud nebudou částice zcela resuspendovány. Případně zapečete desku a míchejte v třepačce při 1600 ot./min po dobu 1 minuty.
 - f. V případě vystříknutí odstřeďte ke dnu při 280 g po dobu 10 sekund.
 - g. Umístěte na magnetický stojan desky PCR a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (3 minuty).
Ponechte desku na magnetickém stojanu a TWB2 v jamkách, aby se zabránilo přeschnutí při třetím promývání. Po přípravě hlavní směsi PCR odeberte a zlikvidujte supernatant.
 - h. Pomocí 200µl vícekanálové pipety nastavené na objem 100 µl odeberte a zlikvidujte supernatant.
 - i. Sejměte z magnetického stojanu a pomalu přidejte 100 µl pufru TWB2 přímo na částice.
 - j. Proveďte kroky h a i po přírůstcích ve velikosti 1 sloupce až 2 sloupců, dokud nebudou zpracovány všechny sloupce.
 - k. Opakujte kroky e–h dvakrát, abyste docílili tři promytí.
8. Ponechte na magnetickém stojanu až do kroku 4 v části *Postup* v kapitole *Amplifikace tagmentované DNA*.
Pufre TWB2 zůstává v jamkách, aby se zabránilo přeschnutí částic.

Amplifikace tagmentované DNA

Tento krok amplifikuje tagmentovanou DNA pomocí programu PCR s limitovanými cykly. Krok PCR přidá adaptéry indexu 1 (i7), adaptéry indexu 2 (i5) a sekvence potřebné pro vytvoření klastru sekvenování.

Spotřební materiál

- EPM (Směs Enhanced PCR)
- Deska adaptéru indexu
- Deska PCR s 96 jamkami
- Voda prostá nukleáz
- Samolepicí těsnicí uzávěr
- Zkumavky mikroadstředivky, 1,5 ml
- Pipetovací špičky
 - Vícekanálové pipety, 20 µl
 - Vícekanálové pipety, 200 µl

Reagencie

- Desky adaptéru indexu
 - Jamka může obsahovat více než 10 µl adaptérů indexu.
 - Nepřidávejte vzorky na desku adaptéru indexu.
 - Každá jamka na desce adaptéru je určena pro jedno použití.

Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte při teplotě 4 °C na ledu po dobu 1 hodiny. Promíchejte v překlopné třepačce a poté krátce odstředte.
Deska adaptéru indexu	-25 °C až -15 °C	Nechte 30 minut rozmrazit při pokojové teplotě.

2. Uložte následující program PCR eBLTS na termocykléru pomocí patřičného počtu cyklů PCR označeného v následující tabulce.
 - Zvolte možnost předeřhátého víka a nastavte teplotu 100 °C
 - Nastavte reakční objem na 50 µl
 - 72 °C po dobu 3 minut
 - 98 °C po dobu 3 minut
 - X cyklů:
 - 98 °C po dobu 20 sekund
 - 60 °C po dobu 30 sekund
 - 72 °C po dobu 1 minuty

- 72 °C po dobu 3 minut
- Udržujte při teplotě 10 °C

Celková doba běhu je přibližně 38 minut pro 9 cyklů a přibližně 46 minut pro 12 cyklů.

Typ vstupního materiálu vzorku	Počet cyklů PCR (X)
gDNA, 10–49 ng	12
gDNA, 50–1000 ng	9
gDNA získaná z FFPE, 50–1000 ng	12
gDNA získaná z krve	9

Postup

1. Nakombinujte následující součásti k přípravě hlavní směsi PCR. Vynásobte každý objem počtem zpracovávaných vzorků.
 - EPM (23 µl)
 - Voda prostá nukleázy (23 µl)
 Přebytek reagensů je zahrnut v objemu.
2. Napipetujte hlavní směs PCR desetkrát, aby se promíchala. Poté ji krátce odstředte.
3. Když je deska na magnetickém stojanu, pomocí 200µl vícekanálové pipety odeberte a zlikvidujte TWB2. Pěna ulpívající na stěnách jamky nemá nepříznivý vliv na knihovnu.
4. Vyjměte z magnetického stojanu.
5. Ihned přidejte 40 µl hlavní směsi PCR přímo na částice v každé jamce.
6. Ihned napipetujte směs, dokud se částice zcela neresuspendují. Případně zapečete desku a míchejte v třepačce při 1600 ot./min po dobu 1 minuty.
7. Zapečete desku se vzorky a odstředte při 280 g po dobu 10 sekund.
8. Odstředte desku adaptéru indexu při 1000 g po dobu 1 minuty.
9. Připravte desku adaptéru indexu.
 - [Méně než 96 vzorků] Propíchněte těsnicí fólii na desce adaptéru indexu novou pipetovací špičkou pouze u tolika jamek, kolik zpracováváte vzorků.
 - [96 vzorků] Přiložte novou desku PCR s polovičním lemem na desku adaptéru indexu a tlakem na ni propíchněte těsnicí fólii. Vyhodte desku PCR použitou k propíchnutí těsnicí fólie.
10. Pomocí nové pipetovací špičky přidejte 10 µl předem spárovaných adaptérů indexu do každé jamky.
11. Pipetou nastavte objem 40 µl, pipetováním 10krát promíchejte. Případně zapečete desku a míchejte v třepačce při 1600 ot./min po dobu 1 minuty.
12. Zapečete desku a poté odstředte při 280 g po dobu 10 sekund.
13. Umístěte do termocykléru a spusťte program PCR eBLTS.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud zastavíte analýzu, skladujte při teplotě -25 až -15 °C po dobu nejvíce 30 dní.

Čištění knihoven

Tento krok používá k purifikaci amplifikovaných knihoven proces dvojstranné purifikace částic.

Spotřební materiál

- CB (Čisticí částice)
- RSB (Resuspenzační pufr)
- Čerstvě připravený 80% ethanol (EtOH)
- Polypropylénová úložná deska s 96 hlubokými jamkami, 0,8 ml (deska MIDI)
- Deska PCR s 96 jamkami
- Magnetický stojan desky MIDI
- Magnetický stojan desky PCR
- Zkumavky mikroadstředivky, 1,5 ml
- Voda prostá nukleáz

Reagencie

- Čisticí částice
 - Před každým použitím promíchejte ve vortexové třepačce.
 - Míchejte ve vortexové třepačce často, aby byly částice rovnoměrně rozdělené.
 - Nasávejte a vypouštějte pomalu z důvodu viskozity roztoku.

Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
CB	Pokožová teplota	Míchejte ve vortexové a překlopné třepačce, dokud není barva kapaliny homogenní.
RSB	2 °C až 8 °C	Rozmrazujte 30 minut při pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce.

Postup

1. Míchejte v třepačce desku PCR s 96 jamkami při 1800 ot./min po dobu 1 minuty a poté krátce odstřed'te.
2. Umístěte na magnetický stojan desky PCR a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (1 minutu).

3. Promíchejte čisticí částice třikrát ve vortexové třepačce po dobu 10 sekund a poté několikrát převraťte, aby došlo k resuspendaci.
4. V případě vysoce kvalitní gDNA postupujte následovně.
 - a. Do každé jamky nové desky MIDI přidejte 77 µl vody prosté nukleázy.
 - b. Do každé jamky desky MIDI přidejte 88 µl čisticích částic.
 - c. Přeneste 45 µl supernatantu z každé jamky na desce PCR do příslušné jamky na desce MIDI.
 - d. Vyhod'te desku PCR.
 - e. Pipetováním každé jamky 10krát promíchejte. Případně zapečte desku a míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 1 minuty.
 - f. Zapečte desku a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
 - g. Zkontrolujte na výskyt vzduchových bublin. V případě výskytu je odstřed'te ke dnu.
 - h. Umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (5 minut).
 - i. Během inkubace důkladně míchejte čisticí částice ve vortexové třepačce a poté přidejte 20 µl do každé jamky nové desky MIDI.
 - j. Přeneste 200 µl supernatantu z každé jamky na první desce MIDI do příslušné jamky na nové desce MIDI (obsahující 20 µl čisticích částic).
 - k. Vyhod'te první desku MIDI.
 - l. Pipetováním každé jamky na nové desce MIDI 10krát promíchejte. Případně zapečte desku a míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 1 minuty.
5. V případě získané FFPE postupujte následovně:
 - a. Do každé jamky nové desky MIDI přidejte 81 µl čisticích částic.
 - b. Přeneste 45 µl supernatantu z každé jamky na desce PCR do příslušné jamky na desce MIDI.
 - c. Vyhod'te desku PCR.
 - d. Pipetováním každé jamky 10krát promíchejte. Případně zapečte desku a míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 1 minuty.
6. Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.
7. Zkontrolujte na výskyt vzduchových bublin. V případě výskytu je odstřed'te ke dnu.
8. Umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (5 minut).
9. Aniž byste narušili částice, odeberte a zlikvidujte supernatant.
10. Promyjte částice následujícím způsobem.
 - a. Když je deska na magnetickém stojanu, přidejte 200 µl čerstvého 80% EtOH. Nemíchejte.
 - b. Inkubujte po dobu 30 sekund.
 - c. Aniž byste narušili částice, odeberte a zlikvidujte supernatant.
11. Promyjte částice **podruhé**.
12. Nechte schnout na vzduchu na magnetickém stojanu po dobu 5 minut.
13. Při schnutí na vzduchu odeberte a zlikvidujte pomocí 20µl pipety zbytkový EtOH.

14. Vyjměte z magnetického stojanu.
15. Přidejte 17 µl pufru RSB k částicím.
16. Zapečete desku a míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
17. Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
18. Zkontrolujte na výskyt vzduchových bublin. V případě výskytu je odstřed'te ke dnu.
19. Umístěte desku na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
20. Přeneste 15 µl supernatantu na novou desku PCR s 96 jamkami.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud zastavíte analýzu, zapečete desku a skladujte při teplotě -25 až -15 °C po dobu nejvíce 30 dní.

Sdružování předem obohacených knihoven do fondu

Tento krok kombinuje knihovny DNA s jedinečnými indexy do jednoho fondu tvořeného až 12 knihovnami.

Metody sdružování do fondu

Do fondu lze sdružovat podle objemu nebo hmotnosti. Podle následující tabulky určete vhodnou metodu pro daný vstupní materiál.

Tabulka 2 Doporučené metody sdružování do fondu

Vstupní materiál vzorku	Metoda sdružování do fondu
gDNA, 10–49 ng	Hmotnost
gDNA, 50–1000 ng	Objem
gDNA získaná z FFPE	Hmotnost
gDNA získaná z krve	Objem

- Jednoplexní obohacení nevyžaduje sdružování předem obohacených knihoven do fondu. Může však být nutné přidat pufr RSB.
- Po kvantifikaci předem obohacené knihovny lze sdružit všechny typy vstupního materiálu vzorků podle hmotnosti tak, aby bylo dosaženo optimálního vyvážení indexu.
- Konečná výtěžnost předem obohacených knihoven generovaných během samostatných experimentálních příprav se může měnit. Proto se za účelem dosažení optimálního vyvážení indexu doporučuje sdružování do fondu podle hmotnosti.
- V následujících situacích použijte 1plexní obohacení.
 - gDNA, 10–49 ng
 - gDNA získaná z FFPE, 50–1000 ng
 - Detekce nízké frekvence vedlejší alely pro přiřazení variant v somatickém režimu

Sdružování do fondu podle hmotnosti

V následujících situacích kvantifikujte knihovny, abyste mohli použít hmotnost DNA na knihovnu pro obohacení uvedenou v části [Sdružování předem obohacených knihoven do fondu při stejné koncentraci na straně 33](#).

- Vstupní materiál vzorku gDNA o hmotnosti 10–49 ng
- Vstupní materiál vzorku gDNA získané z FFPE o hmotnosti 50–1000 ng
- Detekce nízké frekvence vedlejší alely pro přiřazení variant v somatickém režimu
- gDNA získaná z krve pro optimální vyvážení indexu

Kvantifikace předem obohacených knihoven

1. Zpracujte 1 µl předem obohacených knihoven pomocí upřednostňované metody kvantifikace založené na fluorometrii, která využívá interkalační barvivo pro dvouvláknovou DNA.
 - Pro množství 50–1000 ng vysoce kvalitní gDNA očekávejte výtěžnost předem obohacených knihoven ≥ 500 ng.
 - Pro množství 50–1000 ng gDNA získané z tkáně FFPE očekávejte výtěžnost předem obohacených knihoven 500–6000 ng, v závislosti na kvalitě počátečního vzorku.

POZNÁMKA V případě použití metod kvantifikace s odlišnými zkresleními pro tento pracovní postup metodu kvantifikace kvalifikujte. Výsledky koncentrace se mohou lišit v závislosti na použité metodě.

Sdružování předem obohacených knihoven do fondu při stejné koncentraci

Podle následující tabulky určete hmotnost DNA na knihovnu potřebnou pro obohacení. Řiďte se typem vzorku a multiplexitou obohacení. Optimální výtěžnost obohacení a účinnost rozboru není zaručena, pokud použijete nižší než doporučené výtěžnosti předem obohacených knihoven.

Celková hmotnost DNA v reakci obohacení nesmí překročit 6000 ng.

Vstupní materiál vzorku	Multiplexita obohacení	Hmotnost DNA na knihovnu (ng)	Celková hmotnost knihovny DNA (ng)
Vysoce kvalitní gDNA	12	250–500	3000–6000
gDNA získaná z FFPE	1	200	200

1. Poznamenejte si indexy knihoven, které chcete vložit do fondu v tomto kroku.
2. Na základě koncentrace každé knihovny vypočtete objem, který je třeba přidat do reakce obohacení, aby byla dosažena požadovaná hmotnost DNA.
 - Vysoce kvalitní gDNA: Vypočtete objem knihovny potřebný pro vstupní materiál o hmotnosti 250–500 ng.

- gDNA získaná z FFPE: Vypočtete objem knihovny potřebný pro vstupní materiál o hmotnosti 200 ng.
3. Přidejte vypočtený objem každé knihovny do stejné jamky na desce PCR.
 4. Pokud je použita vysoce kvalitní gDNA, proveďte jeden z následujících postupů na základě celkového objemu předem obohacených knihoven sdružených do fondu:
 - Pokud objem předem obohacené knihovny = 30 µl, přejděte k postupu [Hybridizace sond na straně 35](#).
 - Pokud objem předem obohacené knihovny < 30 µl, přidejte pufr RSB, abyste dosáhli celkový objem 30 µl.
 - Pokud objem předem obohacené knihovny > 30 µl, použijte metodu založenou na částicích nebo vakuový koncentrátor ke zvýšení koncentrace vzorku sdruženého do fondu. Přidejte pufr RBS do koncentrovaného vzorku sdruženého ve fondu, abyste dosáhli celkový objem 30 µl.
 5. Pokud je použita gDNA získané z tkáně FFPE, proveďte jeden z následujících postupů na základě celkového objemu předem obohacených knihoven sdružených do fondu:
 - Pokud objem předem obohacené knihovny = 7,5 µl, přejděte k postupu [Hybridizace sond na straně 35](#).
 - Pokud objem předem obohacené knihovny < 7,5 µl, přidejte pufr RSB, abyste dosáhli celkový objem 7,5 µl.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud zastavíte analýzu, zapečete desku a skladujte při teplotě -25 °C až -15 °C po dobu nejvíce 30 dní.

Sdružování do fondu podle objemu

Když je množství vstupního materiálu 50–1000 ng gDNA, není požadována kvantifikace a normalizace jednotlivých knihoven generovaných v rámci stejného experimentu.

Chcete-li dosáhnout optimální účinnosti, sdružte do fondu pouze vzorky předem obohacených knihoven připravené stejným uživatelem, se stejnou šarží reagentů a deskou adaptéru indexu.

1. Poznamenejte si indexy knihoven, které chcete vložit do fondu v tomto kroku.
2. Nakombinujte následující objemy předem obohacených knihoven a RSB pro danou multiplexitu obohacení do stejné jamky nové desky PCR.
Výsledný objem je 30 µl.

Multiplexita obohacení*	Objem každé předem obohacené knihovny (µl)	Objem RSB (µl)
1plexní	14	16
2plexní	14	2
3plexní	10	0
4plexní	7,5	0
5plexní	6	0

Multiplexita obohacení*	Objem každé předem obohacené knihovny (μl)	Objem RSB (μl)
6plexní	5	0
7plexní	4,2	0,6
8plexní	3,7	0,4
9plexní	3,3	0,3
10plexní	3	0
11plexní	2,7	0,3
12plexní	2,5	0

*Informace o nestandardních multiplexitách (2plexní až 11plexní) naleznete v části [Omezení postupu na straně 2](#).

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud zastavíte analýzu, zapečetěte desku a skladujte při teplotě -25 °C až -15 °C po dobu nejvíce 30 dní.

[Volitelné] Kvalifikace předem obohacených knihoven

Pokud sdružujete do fondu podle objemu, použijte ke kvantifikaci předem obohacených knihoven metodu založenou na fluorometrii, která využívá interkalační barvivo pro dvouvláknovou DNA. Ke kvalifikaci předem obohacených knihoven použijte analyzátor fragmentů DNA s odpovídající sadou pro analýzu fragmentů.

Pro kvalifikaci knihovny použijte celkový objem 1 μl. Předem obohacené knihovny jsou dostatečně koncentrované, aby umožňovaly malá ředění za účelem kvantifikace nebo analýzy fragmentů.

Hybridizace sond

V tomto kroku probíhá vazba cílových oblastí DNA se zachycovacími sondami.

Reagencie sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx jsou kompatibilní s panely pro obohacení s oligonukleotidy DNA jak od společnosti Illumina, tak od nezávislých dodavatelů. Další informace o požadovaných specifikacích na panely nezávislých dodavatelů naleznete v části [Požadavky na panel sond pro obohacení na straně 9](#).

Spotřební materiál

- EHB2 (Hybridizační pufr pro obohacení 2)
- NHB2 (Pufr HYB 2 + blokery IDT NXT) (modrý uzávěr)
- Panel sond pro obohacení
- Deska PCR s 96 jamkami
- Samolepicí těsnicí uzávěr
- Připravte pro pozdější postup:

- SMB3 (Streptavidinové magnetické částice)
- EEW (Vylepšený promývací pufr pro obohacení) (žlutohnědý uzávěr)

Reagencie

- V NHB2 se během skladování vytvoří sraženiny a jednotlivé složky se oddělí.
- Panel sond pro obohacení označuje zvolený obohacující panel oligonukleotidů od společnosti Illumina.

Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
EHB2	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce. Pokud jsou přítomny krystalky nebo zákal, zopakujte míchání ve vortexové třepačce, nebo je rozmíchejte pohybem pipety nahoru a dolů, dokud není roztok čirý.
Panel sond pro obohacení	-25 °C až -15 °C (Illumina)	Jak v případě panelů Illumina, tak v případě panelů nezávislých dodavatelů přiveďte na pokojovou teplotu. Promíchejte ve vortexové třepačce.
NHB2 (modrý uzávěr)	-25 °C až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Při pokojové teplotě předeřívějte 5 minut v inkubátoru mikrovzorků na stejnou teplotu, jakou má použitá sonda. Promíchejte jednotlivě ve vortexové třepačce na maximální rychlost 3krát po dobu 10 sekund, aby došlo k resuspendaci. Krátkce odstředte. Pohybujte pipetou nahoru a dolů odspodu zkumavky. Pokud jsou přítomny krystalky nebo zákal, zopakujte míchání ve vortexové třepačce, nebo je rozmíchejte pohybem pipety nahoru a dolů, dokud není roztok čirý. Aby se předešlo tvorbě sraženin, používejte v teplém stavu.
SMB3*	2 °C až 8 °C	Pokud po 90minutovém čekání v rámci programu HYB pokračujete ihned dalším postupem, přiveďte na pokojovou teplotu nejméně 2 hodiny před spuštěním programu HYB.

Položka	Skladování	Pokyny
EEW* (žlutohnědá zkumavka)	-25 °C až -15 °C	Pokud po 90minutovém čekání v rámci programu HYB pokračujete ihned dalším postupem, přiveďte na pokojovou teplotu nejméně 2 hodiny před spuštěním programu HYB. Při pokojové teplotě předejte 30 minut v inkubátoru mikrovzorků na příslušnou teplotu hybridizace a zachycení, než je dokončen program HYB.

*Pokud zastavíte před následujícím postupem, zpozdíte přípravu této reagentie, dokud postupu nedosáhnete.

- Uložte následující program HYB na termocyklér pomocí patřičného počtu cyklů, který je uveden [Tabulka 3](#).
 - Zvolte možnost předehtého víka a nastavte teplotu 100 °C
 - Nastavte reakční objem
 - [Vysoce kvalitní gDNA] 100 µl
 - [gDNA získaná z FFPE] 25 µl
 - 98 °C po dobu 5 minut
 - X cyklů po 1 minutě, s počáteční teplotou 98 °C při prvním cyklu, která se sníží o 2 °C při každém cyklu
 - Udržujte 90 minut na příslušné teplotě.
 - [gDNA získaná z FFPE] 58 °C
 - [80-merní panely sond] 58 °C
 - [Přiřazení variant v somatickém režimu] 58 °C
 - [Vše ostatní] 62 °C

Celková doba běhu je přibližně 115 minut.

Tabulka 3 Počet cyklů na vzorek nebo panel

Typ vzorku a panelu	Počet cyklů (X)
gDNA získaná z FFPE (bez ohledu na typ panelu)	20
80-merní panely sond (bez ohledu na typ vzorku)	20
Přiřazení variant v somatickém režimu	20
Všechny ostatní vzorky a panely	18

Postup

1. **[Vysoce kvalitní gDNA]** Přidejte následující reagenty *v uvedeném pořadí* do každé knihovny sdružené do fondu na desce PCR.
Nevytvářejte hlavní směs. Vytvoření hlavní směsi NHB2 a EHB2 má nepříznivý dopad na účinnost obohacení.
 - NHB2 (modrý uzávěr) (50 µl)
 - Panel sond pro obohacení (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. **[Vysoce kvalitní gDNA]** Pipetou nastavenou na objem 90 µl napipetujte každou jamku 10krát, abyste promíchali obsah.
3. **[gDNA získaná z FFPE]** Přidejte následující reagenty *v uvedeném pořadí* do každé knihovny sdružené do fondu na desce PCR.
Nevytvářejte hlavní směs. Vytvoření hlavní směsi NHB2 a EHB2 má nepříznivý dopad na účinnost obohacení.
 - NHB2 (modrý uzávěr) (12,5 µl)
 - Panel sond pro obohacení (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[gDNA získaná z FFPE]** Pipetou nastavenou na objem 20 µl napipetujte každou jamku 10krát, abyste promíchali obsah.
5. Zapečete desku se vzorky a odstřed'ujte při 280 g po dobu 10 sekund.
6. Umístěte desku se vzorky do předem naprogramovaného termocykléru a spusťte program HYB.
7. Když skončí doba udržování teploty programu HYB, pokračujte ihned k dalšímu postupu.



UPOZORNĚNÍ

Pokud teplota hybridizační reakce poklesne pod pokojovou teplotu, dojde k tvorbě sraženin.

Zachycení hybridizovaných sond

Tento krok využívá streptavidinové magnetické částice (SMB3) k zachycení sond hybridizovaných na cílové oblasti zájmu.

Spotřební materiál

- EEW (Vylepšený promývací pufr pro obohacení) (žlutohnědý uzávěr)
- EE1 (Eluční pufr pro obohacení 1)
- ET2 (Eluční cílový pufr 2)
- HP3 (2N NaOH)

- SMB3 (Streptavidinové magnetické částice)
- 1,5ml zkumavka mikroodstředivky
- Deska MIDI s 96 jamkami
- Deska PCR s 96 jamkami
- Samolepicí těsnicí uzávěr
- Magnetický stojan desky MIDI
- Připravte pro pozdější postup:
 - Směs Enhanced PCR (EPM)
 - Primerový koktejl PCR (PPC)

Reagencie

- EEW
 - Než předejde inkubátor mikrovzorků, zajistěte rozmrazování pufru EEW při pokojové teplotě po dobu nejméně 2 hodin.
 - Zajistěte, aby byl pufr EEW zahříván v inkubátoru mikrovzorků 30 minut před ukončením programu HYB.
 - Když se pufr EEW nepoužívá, ponechte jej v inkubátoru mikrovzorků. Pufr EEW musí zůstat během protokolu zahřátý.
 - Po dosažení pokojové teploty může být zakalené.
 - Může se jevit jako žluté.
- SMB3
 - SMB3 musí mít před použitím pokojovou teplotu.

Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál.

Položka	Skladování	Pokyny
SMB3	2 °C až 8 °C	Nechte stát 2 hodiny, než dosáhne pokojovou teplotu. Míchejte v překlopné a poté vortexové třepačce, dokud nedojde k úplné resuspendaci.
EEW (žlutohnědá zkumavka)	-25 °C až -15 °C	Po 2 hodinách inkubace při pokojové teplotě předejdějte 30 minut v inkubátoru mikrovzorků na příslušnou teplotu hybridizace a zachycení, než je dokončen program HYB.
EE1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte při pokojové teplotě a poté promíchejte ve vortexové třepačce.

Položka	Skladování	Pokyny
HP3	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte při pokojové teplotě a poté promíchejte ve vortexové třepačce.
ET2	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce.
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte na ledu po dobu jedné hodiny. Promíchejte v překlopné třepačce a poté krátce odstředte. Uložte na led.
PPC	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte na ledu po dobu jedné hodiny. Míchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte. Uložte na led.

- Předehejte jeden inkubátor mikrovzorků pomocí vyhřívací vložky MIDI a inkubujte desku se vzorky na jednu z následujících teplot. K předeheatu pufru EEW lze použít volitelný druhý inkubátor mikrovzorků. Nechte pufr EEW na vrchu vyhřívací vložky MIDI.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-merní panely sond] 58 °C
 - [Přiřazení variant v somatickém režimu] 58 °C
 - [Vše ostatní] 62 °C

Postup

Zachycení

- Přidejte pufr SMB3 do příslušné jamky nové desky, jak je uvedeno dále.
 - [Vysoce kvalitní gDNA] Přidejte 250 µl pufru SMB3.
 - [gDNA získané z FFPE] Přidejte 62,5 µl pufru SMB3.
- Pipetou nastavenou na objem 100 µl v případě vysoce kvalitní gDNA nebo na 25 µl v případě FFPE přeneste každou knihovnu vloženou do fondu z desky PCR s 96 jamkami do příslušné jamky na nové desce MIDI.
- Zapečete desku a míchejte v třepačce při 1200 ot./min po dobu 4 minut.
- V případě vystříknutí desku krátce odstředte.
- Umístěte desku s knihovnami sdruženými do fondu na vyhřívací vložku MIDI v inkubátoru mikrovzorků, pod zkumavku s pufrem EEW. Zavřete uzávěr a inkubujte po dobu 15 minut při příslušné teplotě:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-merní panel sond] 58 °C
 - [Přiřazení variant v somatickém režimu] 58 °C
 - [Vše ostatní] 62 °C
- Vyjměte desku s knihovnami sdruženými do fondu a odstředte při 280 g po dobu 30 sekund.

7. Ihned umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
8. **[Vysoce kvalitní gDNA]** Pipetou nastavenou na objem 200 µl odeberte a zlikvidujte všechny supernatant z každé jamky, aniž byste narušili shluk částic.
9. **[gDNA získaná z FFPE]** Pipetou nastavenou na objem 90 µl odeberte a zlikvidujte všechny supernatant z každé jamky, aniž byste narušili shluk částic.
10. Odeberte a zlikvidujte všechny zbytkový supernatant.

Mytí

1. Vyjměte z magnetického stojanu.
2. **[Vysoce kvalitní gDNA]** Z inkubátoru mikrovzorků rychle odeberte pufr EEW a přidejte 200 µl do každé jamky.
3. **[gDNA získaná z FFPE]** Z inkubátoru mikrovzorků rychle odeberte pufr EEW a přidejte 50 µl do každé jamky.
4. Vraťte nepoužitý pufr EEW do inkubátoru mikrovzorků a udržujte ho v ohřátém stavu.
5. Zapečete a míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 4 minut.
6. Umístěte desku se vzorkem na vyhřívací vložku MIDI v inkubátoru mikrovzorků, pod zkumavku s pufrem EEW. Zavřete uzávěr a inkubujte po dobu 5 minut při příslušné teplotě:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-merní panely sond] 58 °C
 - [Přiřazení variant v somatickém režimu] 58 °C
 - [Všechny ostatní panely] 62 °C
7. Ihned umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
8. Pipetou nastavenou na objem 200 µl v případě vysoce kvalitní gDNA nebo na objem 50 µl v případě vzorku FFPE, odeberte a zlikvidujte všechny supernatant z každé jamky.
9. Opakujte kroky 1–8 dvakrát, abyste docílili tři promytí.

Přenos promytého objemu

1. Vyjměte z magnetického stojanu.
2. **[Vysoce kvalitní gDNA]** Z inkubátoru mikrovzorků rychle odeberte pufr EEW a přidejte 200 µl do každé jamky.
3. **[gDNA získaná z FFPE]** Z inkubátoru mikrovzorků rychle odeberte pufr EEW a přidejte 50 µl do každé jamky.
4. Zapečete a míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 4 minut. V případě vystříknutí snižte otáčky na 1600 ot./min.

5. Přeneste roztok resuspendovaných částic na novou desku MIDI.

Některé vzorky mohou zůstat v jamkách.



UPOZORNĚNÍ

Přenosem reagentie se minimalizuje přenos zbytkových reagentů, které mohou zablokovat následnou analýzu PCR.

6. Umístěte desku se vzorkem na vyhřívací vložku MIDI v inkubátoru mikrovzorků. Zavřete uzávěr a inkubujte po dobu 5 minut při příslušné teplotě:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-merní panely sond] 58 °C
 - [Přiřazení variant v somatickém režimu] 58 °C
 - [Vše ostatní] 62 °C
7. Ihned umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
8. Pipetou nastavenou na objem 200 µl v případě vysoce kvalitní gDNA nebo na objem 50 µl v případě vzorku FFPE, odeberte a zlikvidujte všechny supernatant z každé jamky.
9. Odstřed'ujte desku při 280 g po dobu 30 sekund.
10. Umístěte na magnetický stojan desky MIDI na 10 sekund.
11. Pomocí 20µl pipety odeberte a zlikvidujte zbytkovou kapalinu z každé jamky.
12. Okamžitě přejděte k postupu [Eluování na straně 42](#), abyste zabránili přílišnému vyschnutí částic a ztrátě výtěžnosti knihovny.

Eluování

1. Nakombinujte následující objemy pro přípravu hlavní eluční směsi. Každý objem vynásobte počtem zpracovávaných knihoven sdružených do fondu.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Součástí objemu je přebytek reagentů.
2. Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
3. Sejměte desku MIDI z magnetického stojanu.
4. Do každé jamky přidejte 23 µl hlavní eluční směsi.
5. Zapečete desku a míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
6. Inkubujte desku při pokojové teplotě po dobu 2 minut.
7. Odstřed'ujte při 280 g po dobu 30 sekund.
8. Umístěte na magnetický stojan a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
9. Přeneste 21 µl supernatantu z desky MIDI do příslušné jamky na nové desce PCR s 96 jamkami.
10. Vyhod'te desku MIDI.

11. Přidejte 4 µl ET2 do každé jamky obsahující 21 µl supernatantu.
12. Nastavte pipetu na 20 µl a pomalu pipetováním každé jamky 10krát promíchejte.
13. Zapečete desku a poté odstředte při 280 g po dobu 10 sekund.
14. Inkubujte desku při pokojové teplotě po dobu 1 minuty.

Amplifikace obohacené knihovny

Tento krok využívá postup PCR k amplifikaci obohacené knihovny.

Spotřební materiál

- EPM (Směs Enhanced PCR)
- PPC (Koktejl primerů PCR)
- Samolepicí těsnicí uzávěr

Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte při teplotě 4 °C na ledu po dobu jedné hodiny. Promíchejte v překlopné třepačce a poté krátce odstředte. Uložte na led.
PPC	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte při teplotě 4 °C na ledu po dobu jedné hodiny. Míchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte. Uložte na led.

2. Uložte následující program AMP na termocyklér pomocí patřičného počtu cyklů PCR, který je uveden v následující tabulce.
 - Zvolte možnost předeřátého víka a nastavte teplotu 100 °C
 - Nastavte reakční objem na 50 µl
 - 98 °C po dobu 45 sekund
 - (X) cyklů:
 - 98 °C po dobu 30 sekund
 - 60 °C po dobu 30 sekund
 - 72 °C po dobu 30 sekund
 - 72 °C po dobu 5 minut
 - Udržujte při teplotě 10 °C

Celková doba běhu je přibližně 35 minut.

Typ vzorku a panelu	(X) cyklů
FPPE	14
Panel pro exom Illumina (CEX) pro vysoce kvalitní gDNA	10
Panel pro exom Illumina (CEX) pro FFPE	12
Všechny ostatní vzorky a panely	12 ¹²³⁴

¹ V případě panelů od nezávislých dodavatelů lze pomocí následné optimalizace uzpůsobit až na 15 cyklů. V případě použití FFPE lze počet cyklů uzpůsobit až na 17.

² V případě panelů od nezávislých dodavatelů, které mají pouze 500 sond, lze uzpůsobit až na 17 cyklů. V případě použití FFPE lze počet cyklů uzpůsobit až na 19.

³ Pro vzorky FFPE lze uzpůsobit až na 14 cyklů.

⁴ Zvýšení počtu cyklů PCR může mít za následek vyšší výskyt duplikátů a menší velikosti fragmentů v případě vzorků FFPE.

Postup

1. Do každé jamky přidejte 5 µl PPC.
2. Do každé jamky přidejte 20 µl EPM.
3. Zapečete desku a míchejte v třepačce při 1200 ot./min po dobu 1 minuty.
4. Odstřed'ujte desku při 280 g po dobu 10 sekund.
5. Umístěte do předem naprogramovaného termocykléru a spusťte program AMP.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud zastavíte analýzu, skladujte při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu nejvíce dvou dní. Můžete případně ponechat v termocykléru až 24 hodin.

Čištění amplifikované obohacené knihovny

Tento krok využívá čisticí částice k purifikaci obohacené knihovny a odstranění nechtěných produktů.

Spotřební materiál

- CB (Čisticí částice)
- RSB (Resuspenzační pufr)
- Čerstvě připravený 80% ethanol (EtOH)
- Samolepicí těsnicí uzávěry
- Deska MIDI s 96 jamkami
- Deska PCR s 96 jamkami
- Magnetický stojan desky MIDI

Reagencie

- Čisticí částice
 - Před každým použitím promíchejte ve vortexové třepačce.
 - Míchejte ve vortexové třepačce často, aby byly částice rovnoměrně rozdělené.
 - Nasávejte a vypouštějte pomalu z důvodu viskozity roztoku.

Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál.

Položka	Skladování	Pokyny
CB	Pokožová teplota	Míchejte ve vortexové a překlopné třepačce, dokud není barva kapaliny homogenní.
RSB	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce.

2. Připravte čerstvý roztok 80% EtOH z čistého ethanolu.

Postup

1. Odstřed'ujte desku PCR při 280 g po dobu 10 sekund.
2. Promíchejte čisticí částice třikrát ve vortexové třepačce po dobu 10 sekund a poté promíchejte v překlopné třepačce.
3. Do každé jamky nové desky **MIDI** přidejte 40,5 µl čisticích částic.
4. Přeneste 45 µl z každé jamky na desce PCR do příslušné jamky na desce MIDI.
5. Zapečete desku a míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 1 minuty.
6. Inkubujte desku MIDI při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
7. Odstřed'ujte při 280 g po dobu 10 sekund.
8. Umístete na magnetický stojan desku MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (5 minut).
9. Pipetou nastavenou na objem 95 µl odeberte z každé jamky všechnu supernatant a zlikvidujte jej.
10. Dvakrát promyjte, jak je uvedeno dále.
 - a. Když je deska na magnetickém stojanu, přidejte 200 µl čerstvého 80% EtOH. Nemíchejte.
 - b. Inkubujte po dobu 30 sekund.
 - c. Aniž byste narušili částice, odeberte a zlikvidujte supernatant.
11. Nechte schnout na vzduchu na magnetickém stojanu po dobu 5 minut.
12. Při schnutí na vzduchu odeberte a zlikvidujte pomocí 20 µl pipety zbytkový EtOH z každé jamky.
13. Vyjměte magnetický stojan a do každé jamky přidejte 32 µl RSB.
14. Zapečete desku a míchejte v třepačce při 1800 ot./min po dobu 1 minuty.
15. Inkubujte desku při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
16. Odstřed'ujte při 280 g po dobu 10 sekund.

- Umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
- Přeneste 30 µl supernatantu z desky MIDI s 96 jamkami do příslušné jamky na nové desce PCR.
- Vyhodte desku MIDI.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud zastavíte analýzu, zapečete desku a skladujte při teplotě -25 až -15 °C po dobu nejvíce 7 dní.

Kontrola obohacených knihoven

Ke kvantifikaci vstupního materiálu gDNA se dvěma vlákny použijte metodu na bázi fluorescence, která využívá interkalační barvivo. Vyhněte se použití metod, které měří celkovou nukleovou kyselinu, jako je NanoDrop nebo další metody založené na pohlcování záření UV.

- Spusťte běh s 1 µl obohacených knihoven s použitím metody kvantifikace.

POZNÁMKA Celková molarita sondy přímou úměrou ovlivňuje výtěžnost knihovny po obohacení.

Očekávejte střední velikost fragmentu v rozmezí 125–235 bp a rozdělení fragmentů DNA s rozsahem velikostí ~200 bp až ~1000 bp.

Ředění knihoven na počáteční koncentraci

Tento krok rozředí knihovny na počáteční koncentraci pro použitý sekvenační systém. Jde o první krok sériového ředění. Po zředění na počáteční koncentraci jsou knihovny připraveny na denuraci a zředění na konečné koncentrace pro vložení.

Bez ohledu na použitý panel sond pro obohacení doporučuje společnost Illumina pro sekvenování nastavit párový-koncový běh se 151 cykly na čtení (2 × 151) a 10 cykly na čtení indexu. Pokud chcete menší počet překrývajících se čtení nebo menší čisté pokrytí, můžete sekvenovat na 2 × 126 nebo 2 × 101.

1. Vypočtete hodnotu molarity knihovny nebo knihoven sdružených do fondu pomocí následujícího vzorce.

- Pro knihovny kvalifikované na analyzátoru fragmentů DNA použijte průměrnou velikost získanou pro knihovnu.
- Pro všechny ostatní způsoby kvalifikace použijte průměrnou velikost knihovny 350 bp.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{průměrná velikost knihovny (bp)}} = \text{Molarita (nM)}$$

Příklad: Pokud je koncentrace knihovny 20 ng/μl a průměrná velikost je 350 bp, je výsledná hodnota molarity 86,58 nM.

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

2. S použitím hodnoty molarity vypočtete objemy pufru RSB a knihovny potřebné k ředění knihoven na počáteční koncentraci pro váš systém.

Sekvenační systém	Minimální požadovaný objem knihovny (μl)	Počáteční koncentrace (nM)	Konečná koncentrace pro vložení (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) nebo 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM je počáteční koncentrace pro konečnou koncentraci pro vložení 350 pM. V případě potřeby upravte konečnou koncentraci pro vložení podle následující tabulky.

Konečná koncentrace pro vložení (pM)	Koncentrace knihovny sdružené do fondu (nM)
100	0,50
150	0,75

Konečná koncentrace pro vložení (pM)	Koncentrace knihovny sdružené do fondu (nM)
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

- Nařed'te knihovny pomocí pufru RSB:
 - Knihovny kvantifikované jako multiplexovaný fond knihoven** – Nařed'te fond na počáteční koncentraci pro váš systém.
 - Knihovny kvantifikované jednotlivě** – Nařed'te každou knihovnu na počáteční koncentraci pro váš systém. Přidejte 10 µl každé naředěné knihovny do zkumavky, abyste vytvořili multiplexovaný fond knihoven.
- Podle pokynů pro denaturaci a ředění pro váš systém nařed'te na konečnou koncentraci pro vložení.
 - Pro systém NextSeq 550Dx viz [Příprava na sekvenování systémem NextSeq 550Dx na straně 48](#).
 - Pro systém MiSeqDx System viz [Příprava sekvenování MiSeqDx na straně 50](#).
 - Pro systém NovaSeq 6000Dx viz [Příprava na sekvenování systémem NovaSeq 6000Dx na straně 51](#).

Konečné koncentrace pro vložení jsou počátečním bodem a obecným pokynem. Optimalizujte koncentrace pro použitý pracovní postup a metodu kvantifikace během následujících běhů sekvenování nebo titrací s průtokovou kyvetou.

Příprava na sekvenování systémem NextSeq 550Dx

Při denaturaci a ředění knihoven za účelem sekvenování na sekvenačním systému NextSeq 550Dx postupujte podle následujících pokynů.

Spotřební materiál

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

Příprava

Připravte čerstvé ředění 0,2N roztoku NaOH pro denuraci knihoven pro sekvenování. Chcete-li zabránit tomu, aby drobné chyby při pipetování ovlivnily konečnou koncentraci NaOH, připravte ještě další objem.



UPOZORNĚNÍ

Čerstvě zředěný 0,2N roztok NaOH je pro proces denaturace nezbytný. Nesprávná denaturace může snížit výtěžnost.

1. Zkombinujte následující objemy ve zkumavce mikroadstředivky, a zředte 1N roztok NaOH na 0,2N roztok NaOH:
1. Připravte následující spotřební materiál.

Položka	Skladování	Pokyny
HT1	-25 °C až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Uchovejte při teplotě 2 °C až 8 °C, dokud nejste připraveni zředit denaturované knihovny.

2. Nakombinujte následující objemy ve zkumavce mikroadstředivky, abyste připravili čerstvé ředění NaOH:
 - Voda laboratorní jakosti (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)Výsledkem je 1 ml NaOH s koncentrací 0,2 N.
3. Několikrát zkumavku obraťte, aby se promíchal její obsah.
4. Nakombinujte následující objemy ve zkumavce mikroadstředivky, abyste si připravili roztok Tris-HCl s koncentrací 200 mM a pH 7,0.
 - Voda laboratorní jakosti (800 µl)
 - 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)Výsledkem je 1 ml roztoku Tris-HCl s koncentrací 200 mM a pH 7,0

POZNÁMKA Nechte zkumavku uzavřenou. Použijte čerstvé ředění, od jehož přípravy neuběhlo více než **12 hodin**.

Denaturace knihoven

1. Nakombinujte následující objemy knihovny a čerstvě zředěného 0,2N roztoku NaOH ve zkumavce mikroadstředivky.
 - 10 µl knihovny
 - 10 µl 0,2N NaOH
2. Krátce promíchejte ve vortexové třepačce a pak odstřed'ujte při 280 g po dobu 1 minuty.
3. Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.
4. Přidejte 10 µl roztoku Tris-HCl s koncentrací 200 mM a pH 7.

Ředění denaturovaných knihoven na 20 pM

1. Přidejte 970 μ l předchlazeného pufru HT1 do zkumavky s denaturovanými knihovnami. Výsledkem je denaturovaná knihovna s koncentrací 20 pM.
2. Krátce promíchejte ve vortexové třepačce a pak odstřed'ujte při 280 g po dobu 1 minuty.
3. Umístěte 20pM knihovny na led, dokud nejste připraveni přejít ke konečnému ředění.

Ředění knihoven na počáteční koncentraci

1. Přidejte následující objemy k naředění 20pM roztoku denaturované knihovny na koncentraci 1,2 pM.
 - Roztok denaturované knihovny (78 μ l)
 - Předchlazený pufr HT1 (1222 μ l)Celkový objem je 1,3 ml při koncentraci 1,2 pM.
2. Promíchejte v překlopné třepačce a poté pulzně odstřed'ujte.
3. Přejděte k sekvenaci. Pokyny naleznete v *referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.

Příprava sekvenování MiSeqDx

Při denaturaci a ředění knihoven za účelem sekvenování na sekvenačním systému MiSeqDx postupujte podle následujících pokynů.

Spotřební materiál

- HT1 (Hybridizační pufr)
- 1N NaOH

Příprava

Připravte *čerstvé* ředění 0,2N roztoku NaOH pro denaturaci knihoven pro sekvenování. Chcete-li zabránit tomu, aby drobné chyby při pipetování ovlivnily konečnou koncentraci NaOH, připravte ještě další objem.



UPOZORNĚNÍ

Čerstvě zředěný 0,2N roztok NaOH je pro proces denaturace nezbytný. Nesprávná denaturace může snížit výtěžnost.

1. Zkombinujte následující objemy ve zkumavce mikroadstředivky, a zřed'te 1N roztok NaOH na 0,2N roztok NaOH:
1. Připravte následující spotřební materiál.

Položka	Skladování	Pokyny
HT1	-25 °C až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Uchovejte při teplotě 2 °C až 8 °C, dokud nejste připraveni zředit denaturované knihovny.

- Nakombinujte následující objemy ve zkumavce mikroodstředivky, abyste připravili čerstvé ředění NaOH:
 - Voda laboratorní jakosti (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)
 Výsledkem je 1 ml NaOH s koncentrací 0,2 N.

POZNÁMKA Nechte zkumavku uzavřenou. Použijte čerstvé ředění, od jehož přípravy neuběhlo více než **12 hodin**.

Denaturizace 4nM knihovny

- Nakombinujte následující objemy ve zkumavce mikroodstředivky.
 - 4 nM knihovna (5 µl)
 - 0,2N NaOH (5 µl)
- Krátce promíchejte ve vortexové třepačce a pak odstřed'ujte při 280 g po dobu 1 minuty.
- Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.
- Přidejte 990 µl předchlazeného pufru HT1 do zkumavky s denaturovanou knihovnou. Výsledkem je 1 ml denaturované knihovny s koncentrací 20 pM.

Ředění denaturované 20pM knihovny

- Nařed'te na požadovanou koncentraci s použitím následujících objemů.

Koncentrace	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Knihovna 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Předchlazený pufr HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- Promíchejte v překlopné třepačce a poté pulzně odstřed'ujte.
- Přejděte k sekvenaci. Pokyny naleznete v *referenční příručce přístroje MiSeqDx pro systém MOS v4* (dokument č. 1000000157953).

Příprava na sekvenování systémem NovaSeq 6000Dx

Při denaturaci a ředění knihoven za účelem sekvenování na sekvenačním systému NovaSeq 6000Dx postupujte podle následujících pokynů.

Spotřební materiál

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (Resuspenzační pufr)
- 1N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- Zkumavka pro knihovnu NovaSeq 6000Dx

Příprava

Připravte čerstvé ředění 0,2N roztoku NaOH pro denuraci knihoven pro sekvenování. Chcete-li zabránit tomu, aby drobné chyby při pipetování ovlivnily konečnou koncentraci NaOH, připravte ještě další objem.



UPOZORNĚNÍ

Čerstvě zředěný 0,2N roztok NaOH je pro proces denurace nezbytný. Nesprávná denurace může snížit výtěžnost.

1. Zkombinujte následující objemy ve zkumavce mikroadstředivky, a zředte 1N roztok NaOH na 0,2N roztok NaOH:

Tabulka 4 Režim S2

Reagencie	Objem jedné průtokové kyvety (μ l)	Objem dvou průtokových kyvet (μ l)
Voda laboratorní jakosti	40	80
1N roztok NaOH	10	20

Tyto objemy odpovídají 50 μ l 0,2N roztoku NaOH pro jednu průtokovou kyvetu nebo 100 μ l 0,2N roztoku NaOH pro dvě průtokové kyvety.

Tabulka 5 Režim S4

Reagencie	Objem jedné průtokové kyvety (μ l)	Objem dvou průtokových kyvet (μ l)
Voda laboratorní jakosti	80	160
1N roztok NaOH	20	40

Tyto objemy odpovídají 100 μ l 0,2N roztoku NaOH pro jednu průtokovou kyvetu nebo 200 μ l 0,2N roztoku NaOH pro dvě průtokové kyvety.

2. Několikrát zkumavku obraťte, aby se promíchal její obsah, nebo použijte vortexovou třepačku.

POZNÁMKA Nechte zkumavku uzavřenou. Použijte čerstvé ředění, od jehož přípravy neuběhlo více než **12 hodin**.

Vytvoření fondu normalizovaných knihoven

Koncentrace pro vložení se může lišit v závislosti na přípravě knihovny a metodách kvantifikace a normalizace. Pomocí následujících pokynů normalizujte knihovny na příslušnou koncentraci a poté je vložte do fondu. Knihovny sekvenované na stejné průtokové kyvetě musí být zkombinovány do jednoho normalizovaného fondu.

POZNÁMKA Maximální počet vzorků, u kterých lze provést analýzu v jednom běhu pomocí sady Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, je 192. Tento limit je dán celkovým počtem indexů UD v sadě A a B.

Normalizace knihoven pro sdružování do fondu

- Určete požadovanou koncentraci knihovny sdružené do fondu na základě požadované konečné koncentrace pro vložení.
 - Pro konečnou koncentraci pro vložení 350 pM je požadovaná koncentrace knihovny sdružené do fondu 1,75 nM.
 - Chcete-li určit koncentraci knihovny sdružené do fondu pro jinou konečnou koncentraci pro vložení, postupujte podle části [Ředění knihoven na počáteční koncentraci na straně 47](#).
- Normalizujte knihovny na požadovanou koncentraci knihovny sdružené do fondu 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Potřebujete-li pomoc s ředěním knihoven na vhodnou koncentraci, postupujte podle [Kalkulačky sdružování do fondu](#) na webu Illumina.

Doporučené koncentrace pro vložení

Optimální koncentrace DNA pro vložení závisí na typu knihovny a velikosti vložky. V případě knihoven, které jsou větší než 450 bp, mohou být nutné vyšší koncentrace pro vložení.

Sdružování normalizovaných knihoven do fondu a přidání volitelné kontroly PhiX

- Zkombinujte příslušný objem každé normalizované knihovny v nové zkumavce mikroodstředivky tak, abyste získali jeden z následujících konečných objemů:

Režim	Konečný objem (µl)
S2	150
S4	310

- [Volitelné]** Přidejte špičku 1% nedenaturované kontroly PhiX>, jak je uvedeno níže.
 - Zřeďte 10 nM PhiX na 2,5 nM pomocí 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.

- b. Přidejte vhodný objem nedenaturované 2,5nM kontroly PhiX do zkumavky s nedenaturovaným fondem knihoven.

Režim	Nedenaturovaná 2,5nM kontrola PhiX (µl)	Nedenaturovaný fond knihoven (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Pokud je přidána špička ke kontrole PhiX, je doporučené množství pro dobře vyvážené knihovny 1 %. Knihovny s nízkou diverzitou mohou vyžadovat vyšší hodnotu. Pokud chcete použít kontrolu PhiX s knihovnami s nízkou diverzitou, požádejte o návod technickou podporu společnosti Illumina.

Denaturace fondu knihoven a volitelná kontrola PhiX

- Do zkumavky s nedenaturovaným fondem knihoven a volitelnou kontrolou PhiX přidejte 0,2N roztok NaOH následujícím způsobem.

Průtoková kyveta	0,2N roztok NaOH	Nedenaturovaný fond knihoven (µl)	Výsledný objem
S2	37	150	187 µl nebo 187,9 µl s kontrolou PhiX
S4	77	310	387 µl nebo 388,9 µl s kontrolou PhiX

- Nasadte uzávěr a krátce promíchejte vortexovou třepačkou.
- Odstřed'ujte při 280 g po dobu až 1 minuty.
- Inkubujte 8 minut při pokojové teplotě kvůli denaturaci.
- K neutralizaci přidejte 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 takto.

Režim	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Výsledný objem
S2	38	225 µl nebo 225,9 µl s kontrolou PhiX
S4	78	465 µl nebo 466,9 µl s kontrolou PhiX

- Nasadte uzávěr a krátce promíchejte vortexovou třepačkou.
- Odstřed'ujte při 280 g po dobu až 1 minuty.
- Přeneste celý objem denaturované knihovny nebo denaturované knihovny s kontrolou PhiX do zkumavky pro knihovnu NovaSeq 6000Dx.
- Přejděte k sekvenaci. Pokyny naleznete v *dokumentaci k přístroji NovaSeq 6000Dx (dokument č. 200010105)*.

Řešení problémů

K řešení problémů v pracovním postupu můžete použít následující tabulku. Pokud se běh sekvenování nebo příprava knihovny pro vzorek dvakrát nezdaří, může být nutné provést dodatečné řešení problémů. Obratě se na technickou podporu společnosti Illumina.

Pozorování	Možná příčina	Doporučený postup
Běh sekvenování nevyhovuje specifikacím kontroly kvality	Chyba uživatele nebo laboratorního vybavení v rámci pracovního postupu rozboru	<p>Kvalifikací obohacených knihoven zajistíte patřičnou výtěžnost knihoven a rozdělení velikostí fragmentů. Opakujte přípravu knihovny od jednoho z následujících kroků v závislosti na tom, kde došlo k domněle chybnému použití nebo závadě vybavení. Pokud došlo k neznámé nebo jiné chybě, obraťte se v rámci odstraňování chyby běhu na technickou podporu společnosti Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Opakujte sekvenování knihoven. Viz části Příprava na sekvenování systémem NextSeq 550Dx na straně 48, Příprava sekvenování MiSeqDx na straně 50 nebo Příprava na sekvenování systémem NovaSeq 6000Dx na straně 51. • Opakujte obohacení knihoven. Viz část Hybridizace sond na straně 35. • Začněte s přípravou knihovny od začátku pracovního postupu. Viz část Návod k použití na straně 20.
	Problém s přístrojem	Obratě se na technickou podporu společnosti Illumina.
Chyba při generování souboru FASTQ nebo obecná chyba sekvenování (např. chyba sítě, chyba při vkládání/odebírání reagensů atd.)	Problém se softwarem nebo přístrojem	<p>Nápovědu ke generování souboru FASTQ naleznete v <i>příručce softwaru Local Run Manager (dokument č. 10000002702)</i>, <i>referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)</i>, <i>referenční příručce přístroje MiSeqDx pro systém MOS v4 (dokument č. 1000000157953)</i> nebo v <i>dokumentaci pro přístroj NovaSeq 6000Dx (dokument č. 200010105)</i>.</p> <p>Další pomoc získáte od zákaznické podpory společnosti Illumina.</p>

Pozorování	Možná příčina	Doporučený postup
Knihovna DNA negeneruje dostatečnou výtěžnost pro vložení k sekvenování	Nebyly splněny požadavky na vstupní materiál vzorků	Zajistěte vhodný vstupní materiál vzorků a opakujte přípravu knihovny. Viz část Doporučení ke vstupnímu materiálu vzorku na straně 17 .
	Chybné použití nebo závada vybavení v pracovním postupu rozboru	Opakujte přípravu knihovny od jednoho z následujících kroků v závislosti na tom, kde došlo k domněle chybnému použití nebo závadě vybavení. Pokud došlo k neznámé nebo jiné chybě, obraťte se v rámci odstraňování chyby běhu na technickou podporu společnosti Illumina. <ul style="list-style-type: none"> • Opakujte sekvenování knihoven. Viz části Příprava na sekvenování systémem NextSeq 550Dx na straně 48, Příprava sekvenování MiSeqDx na straně 50 nebo Příprava na sekvenování systémem NovaSeq 6000Dx na straně 51. • Opakujte obohacení knihoven. Viz část Hybridizace sond na straně 35. • Začněte s přípravou knihovny od začátku pracovního postupu. Viz část Návod k použití na straně 20.
	Požadavky na panel sond pro obohacení nebyly splněny	Zajistěte vhodný panel sond pro obohacení a opakujte přípravu knihovny. Viz část Požadavky na panel sond pro obohacení na straně 9 .

Charakteristiky účinnosti

Charakteristiky účinnosti aplikace DRAGEN pro sadu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pro systém NovaSeq 6000Dx jsou uvedeny v *příbalovém letáku k přístroji NovaSeq 6000Dx (dokument č. 200025276)*.

Účinnost s panely pro celý exom

Účinnost panelu pro exom byla testována s použitím nejnižšího (50 ng) a nejvyššího (1000 ng) doporučeného množství vstupního materiálu Coriell Cell Line gDNA NA12878, se známými závěry stanovenými pro detekci germinálních variant (Coriell Platinum Genome). Jako reprezentativní panely byly použity Panel pro exom 1 (45 Mb) a Panel pro exom 2 (36,8 Mb). 24 technických replikátů bylo otestováno rozbohem Illumina DNA Prep

with Enrichment Dx s využitím Panelu pro exom 1 (45 Mb) v rámci dvou 12plexních reakcí obohacení. 12 technických replikátů bylo otestováno rozbohem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s využitím Panelu pro exom 2 (36,8 Mb) v rámci jedné 12plexní reakce obohacení. Obohacené knihovny byly sekvenovány na sekvenačním systému NextSeq 550Dx s modulem DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

V následující tabulce jsou uvedeny střední hodnoty metrik účinnosti sekundárního sekvenování a přiřazení variant pro technické replikáty testované s jednotlivými panely.

Tabulka 6 Účinnost rozboru se dvěma panely pro celý exom

Panel	Obohacení s jedinečnými čteními s výplní	Jednotnost pokrytí	Medián délky fragmentu	Síla SNV ¹	Přesnost SNV ²	Síla indelu ¹	Přesnost indelu ²
Panel pro exom 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Panel pro exom 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹Síla=pozitivní/(skutečně pozitivní + falešně negativní)

²Přesnost=skutečně pozitivní/(skutečně pozitivní + falešně pozitivní)

Limit detekce

K otestování limitu detekce byl použit referenční standard Horizon HD799 DNA. Standard HD799 obsahuje mírně znehodnocenou, formalínem ošetřenou DNA se známými SNV na frekvencích alely v rozsahu 1–24,5 %. Bylo použito nejmenší doporučené množství vstupního materiálu DNA (50 ng) a byla vyhodnocena míra detekce SNV $s \geq 5,0\%$ frekvencí variantní alely (VAF). 16 technických replikátů bylo otestováno rozbohem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s využitím pracovního postupu FFPE, obohaceno panelem obohacení pro všechny typy karcinomů (1,94 Mb) v 16 (1plexních) obohaceních a následně sekvenováno na přístroji NextSeq 550Dx s modulem DNA GenerateFASTQ Dx.

Všechny vzorky splnily požadavky na vzorek specifické pro panel, jak je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 7 Účinnost vzorku z hlediska limitu detekce

Panel	Míra detekce variant SNV $s \geq 5,0\%$ VAF	Průměr Jednotnost pokrytí
Panel obohacení pro všechny typy karcinomů (1,94 Mb, 523 genů)	100 %	99 %

Interferující látky

Vliv potenciálně ovlivňujících látek byl vyhodnocen v sadě Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vyhodnocením účinnosti rozboru za přítomnosti ovlivňujících látek.

Ovlivnění v plné krvi

Acetaminofen (exogenní sloučenina, lék), kreatinin a triglyceridy (endogenní metabolity) byly testovány jejich vpravením do vzorků plné lidské krve před extrakcí DNA. Aby bylo možné vyhodnotit ovlivnění v důsledku odběru krve (krátký odběr), byl do vzorků plné krve vpraven také roztok EDTA. Aby bylo možné vyhodnotit ovlivnění v důsledku přípravy vzorku, byl navíc do DNA získané z plné krve vpraven ethanol v kvalitě pro molekulární biologii.

V následující tabulce jsou uvedeny testovací koncentrace pro jednotlivé ovlivňující faktory.

Tabulka 8 Potenciálně ovlivňující látky a koncentrace testované v plné krvi

Testovaná látka	Testovací koncentrace
Acetaminofen	15,6 mg/dl* Trojnásobek nejvyšší koncentrace očekávané během terapeutické dávky léku.
Kreatinin	15 mg/dl* Nejvyšší pozorovaná koncentrace v populaci.
Triglyceridy	1,5 g/dl* Nejvyšší pozorovaná koncentrace v populaci.
EDTA	6 mg/ml Trojnásobek koncentrace očekávané v krvi odebrané ve zkumavkách s EDTA.
Ethanol v kvalitě pro molekulární biologii	15 % v/v V eluátu po extrakci DNA.

*Podle normy CLSI EP37-ED1:2018

Pro každou ovlivňující látku bylo otestováno 12 technických replikátů rozbohem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx obohaceným panelem pro exom 1 (45 Mb) v jednom (12plexním) obohacení. Následně bylo provedeno sekvenování přístrojem NextSeq 550Dx s modulem DNA GenerateFASTQ Dx.

Pro testované látky splnilo všech 12 vzorků požadavky na účinnost vzorku a nebylo pozorováno žádné ovlivnění účinnosti rozboru.

Ovlivnění v tkáni FFPE

Byly otestovány dva kolorektální vzorky FFPE – jeden za přítomnosti a jeden za absence hemoglobinu – při hodnotě 0,1 mg na 10 µm části FFPE. Tyto vzorky představovaly nejhorší možný případ 50% kontaminace vzorku tkáně FFPE krví s vysokou hladinou hemoglobinu. Vzorky byly otestovány rozbohem Illumina DNA Prep

with Enrichment Dx s použitím panelu obohacení pro všechny typy karcinomů 1 (1,94 Mb), který je reprezentativním panelem v případě jednoplexních obohacení. Obohacené knihovny byly následně sekvenovány v přístroji NextSeq 550Dx s modulem DNA GenerateFASTQ Dx. Všechny vzorky splnily požadavky na účinnost vzorku a bylo prokázáno, že hemoglobin neovlivňuje účinnost rozboru.

Aby bylo možné vyhodnotit ovlivnění způsobené přípravou vzorku, byly dvě exogenní sloučeniny přidán do DNA získané ze vzorku tkáně FFPE karcinomu močového měchýře. Testované exogenní látky jsou roztoky pro extrakci, které jsou běžně používány v procesu extrakce DNA a jsou uvedeny společně s testovaným množstvím v následující tabulce.

Roztoky testovaných látek jsou komerčně dostupné v sadách pro izolaci DNA kolonkovou metodou.

Tabulka 9 Potenciálně ovlivňující exogenní látky a koncentrace testované v rámci FFPE

Testovaná látka	Testovaná koncentrace (μl / 30 μl eluátu)
Deparafinizační činidlo	113×10^{-6}
Promývací pufr AW2	0,417

Pro každou ovlivňující látku bylo otestováno osm technických replikátů rozbohem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, obohaceno panelem obohacení pro všechny typy karcinomů (1,94 Mb) v rámci jednoplexních obohacení a následně sekvenováno na přístroji NextSeq 550Dx s modulem DNA GenerateFASTQ Dx.

Pro obě testované látky splnilo všech osm vzorků požadavky na účinnost vzorku a nebylo pozorováno žádné ovlivnění účinnosti rozboru.

Křížová kontaminace

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (ženské pohlaví, 10 vzorků), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (mužské pohlaví, 12 vzorků) a kontroly bez templátu (NTC, 2 vzorky) byly otestovány rozbohem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx v šachovnicovém uspořádání desky. Všechny vzorky používaly nejvyšší doporučené množství vstupního materiálu gDNA (1000 ng), což je nejpřísnější podmínka pro hodnocení křížové kontaminace vzorků. Testování bylo provedeno dvakrát dvěma různými pracovníky. V rámci 12plexních reakcí obohacení byl použit Panel pro exom 1 (45 Mb). Obohacené knihovny byly sekvenovány v přístroji NextSeq 550Dx s modulem DNA GenerateFASTQ Dx. Hodnocení bylo provedeno rozbohem pokrytí chromozomu Y specifického pro mužské pohlaví ve vzorcích ženského pohlaví tím, že byly porovnány s hodnotami pozadí plné desky vzorků ženského pohlaví jako i se zastoupením indexu ve vzorcích NTC.

Tabulka 10 Výsledky křížové kontaminace

Vzorky ženského pohlaví s pokrytím mužského chromozomu Y se základní úrovní šumu < 3x	Zastoupení indexu ve vzorcích NTC
100 %	< 0,0005 %

Příloha: Sekvence adaptéru indexů UD Illumina

Tyto jedinečné dvojité (UD) adaptéry indexu jsou uspořádány na desce tak, aby obsluhu přiměly dodržovat doporučenou strategii párování. Adaptéry indexu mají délku 10 bází namísto obvyklých osmi bází.

Adaptéry indexu 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Adaptéry indexu 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Pro oříznutí adaptéru čtení 1 a čtení 2 je použita následující sekvence.

CTGTCTCTTATACACATCT

Adaptéry indexu – deska A/sada 1

Název indexu	Báze i7 v adaptéru	Báze i5 v adaptéru
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG

Název indexu	Báze i7 v adaptéru	Báze i5 v adaptéru
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCTT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACCTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG

Název indexu	Báze i7 v adaptéru	Báze i5 v adaptéru
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	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGCACTAATG	TGACTACATA

Název indexu	Báze i7 v adaptéru	Báze i5 v adaptéru
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	GGTGAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Adaptéry indexu – deska B/sada 2

Název indexu	Báze i7 v adaptéru	Báze i5 v adaptéru
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

Název indexu	Báze i7 v adaptéru	Báze i5 v adaptéru
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	GGCCTGTCCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG

Název indexu	Báze i7 v adaptéru	Báze i5 v adaptéru
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	GTATTCTCTA	TATAGATTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
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

Název indexu	Báze i7 v adaptéru	Báze i5 v adaptéru
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCTGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTA

Historie revizí

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 200019584 v02	Září 2022	Byl přidán obsah týkající se podpory sekvenování na přístroji NovaSeq 6000Dx.
Dokument č. 200019584 v01	Květen 2022	Byly přidány názvy a katalogová čísla sekvenačních systémů. Byly odstraněny informace o jedinečném dvojitém indexování pro knihovny s jedním indexem.
Dokument č. 200019584 v00	Květen 2022	První vydání.

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah je vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. a jejich přidružených společností (dále jen „Illumina“). Slouží výlučně zákazníkovi ke smluvním účelům v souvislosti s použitím zde popsaných produktů a k žádnému jinému účelu. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen za žádným jiným účelem ani jinak sdělován, zveřejňován či rozmnožován bez předchozího písemného souhlasu společnosti Illumina. Společnost Illumina nepředává tímto dokumentem žádnou licenci na svůj patent, ochrannou známku, autorské právo či práva na základě zvykového práva ani žádná podobná práva třetích stran.

Pokyny v tomto dokumentu musí být důsledně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a řádně proškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaných produktů. Veškerý obsah tohoto dokumentu musíte před použitím takových produktů beze zbytku přečíst a pochopit.

NEDODRŽENÍ POŽADAVKU NA PŘEČTENÍ CELÉHO TEXTU A NA DŮSLEDNÉ DODRŽOVÁNÍ ZDE UVEDENÝCH POKYNŮ MŮŽE VÉST K POŠKOZENÍ PRODUKTŮ, PORANĚNÍ OSOB, AŤ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A POVEDE KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.

SPOLEČNOST ILLUMINA NA SEBE NEBERE ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽITÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ DÍLŮ TĚCHTO PRODUKTŮ NEBO SOFTWARE).

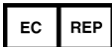
© 2022 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejich příslušných vlastníků. Informace o konkrétních ochranných známkách naleznete na adrese www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktní údaje



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornie 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Nizozemsko

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

Štítky na produktech

Úplné reference k symbolům, které se objevují na balení a označení produktu, naleznete v klíči symbolů na adrese support.illumina.com na kartě *Documentation* (Dokumentace) příslušné sady.