

KUN TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUG

KUN TIL EKSPORT

Tilsigtet brug

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit er et sæt bestående af reagenser og materialer til klargøring af prøvebiblioteker fra genomisk DNA afledt fra humane celler og humant væv. Brugerleverede probepaneller er påkrævede til klargøring af biblioteker, der er målrettet specifikke genomiske interesseområder. De genererede prøvebiblioteker er beregnet til brug på sekventeringssystemer fra Illumina.

Procedureprincipper

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er beregnet til klargøring af DNA-sekventeringsbiblioteker, der beriges for målområder fra genomisk DNA afledt fra humane celler og humant væv.

Der er behov for brugerleverede biotinylerede oligonukleotidpaneller til målberigelsen. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med en række panelstørrelser, herunder små paneller (< 20.000 prober) til store paneller (> 200.000 prober). De berigede biblioteker, der bliver genereret, er beregnet til sekventering på sekventeringssystemer fra Illumina.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-proceduren består af følgende trin:

- **Tagmentering af genomisk DNA** – DNA-inputtet tagmenteres ved hjælp af Enrichment BLT Small (eBLTS). I forbindelse med tagmenteringen bliver gDNA fragmenteret og tagget med adaptere på et enkelt trin. Det kræver et DNA-input på minimum 50 ng at mætte eBLTS i tagmenteringsreaktionen. Efter mætning fragmenterer eBLTS et angivet antal DNA-molekyler for at generere normaliserede biblioteker med konsistent fordeling af fragmentstørrelser.
- **Oprensning efter tagmentering** – Oprensning af det adapter-taggede DNA på det eBLTS, der skal anvendes til amplificering.
- **Amplificering af tagmenteret DNA** – Det tagmenterede DNA amplificeres ved hjælp af et PCR-program med begrænsede cyklusser. Der bliver føjet unikke dobbeltindekser (UD-indekser) til DNA-fragmenternes ender, hvilket muliggør dobbelt unik stregkodning af DNA-bibliotekerne og clustergenerering under sekventeringen.
- **Oprensning af biblioteker** – Der udføres oprensning og størrelseudvælgelse på de amplificerede DNA-biblioteker ved hjælp af en perleoprensningprocedure.
- **Oprettelse af bibliotekspuljer** – DNA-biblioteker kombineres med unikke indekser i en pulje med op til 12 biblioteker. Du kan oprette bibliotekspuljer efter volumen eller masse.
- **Hybridisering af prober** – Består af en hybridiseringsreaktion, i løbet af hvilken de dobbeltstrengede DNA-biblioteker bliver denatureret, og et panel med biotinylerede DNA-prober bliver hybridiseret til målgenomområderne.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med flere forskellige paneler. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit indeholder ikke et berigelsespanel. Probepaneller skal anskaffes af brugeren, og de skal opfylde de påkrævede specifikationer. Reagenserne i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatible med DNA-berigelsesoligonukleotidpaneler fra både Illumina og tredjeparter, der opfylder de påkrævede specifikationer. Du kan finde oplysninger om de påkrævede specifikationer for tredjepartspaneller under [Krav til berigelsesprobepaneller på side 10](#).
- **Indfangning af hybridiserede prober** – Ved hjælp af Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) indfanges de biotinylerede prober hybridiseret til de målrettede interesseområder.
- **Amplificering af berigede biblioteker** – De berigede biblioteker amplificeres ved hjælp af PCR.
- **Oprensning af amplificerede berigede biblioteker** – Ved hjælp af en perleoprensningprocedure bliver de berigede biblioteker, der er klar til sekventering, oprenset.
- **Sekventering** – Sekventering af de berigede biblioteker udføres på et MiSeqDx-, NextSeq 550Dx- eller NovaSeq 6000Dx-sekventeringssystem. For MiSeqDx og NextSeq 550Dx bruges det integrerede modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager til konfiguration af sekventeringskørsler, kørselsmonitorering og primære analyser (generering af FASTQ ud fra basebestemmelser). For NovaSeq 6000Dx anvendes DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application til kørselskonfiguration og sekundær analyse med flere tilgængelige arbejds gange.

Procedurens begrænsninger

- Til *in vitro*-diagnostisk brug.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med genomisk DNA, der er afledt fra humane celler og humant væv.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med dobbeltstrenget gDNA-input på 50-1000 ng. Der kan ikke gives garanti for ydelsen med input uden for disse tærskler.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit indeholder ikke reagenser til DNA-ekstraktion. De analytiske testresultater, herunder interferenstestning, der er angivet under [Ydelsesegenskaber på side 57](#), er opnået med fuldblod og FFPE som repræsentative prøvetyper med repræsentative DNA-ekstraktionskits. Alle diagnostiske test, der bliver udviklet til brug sammen med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-reagenser, kræver fuld validering med hensyn til alle ydelsesaspekter med det valgte kit til DNA-ekstraktion.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit anbefales ikke til FFPE-prøver at ringe kvalitet med $\Delta Cq > 5$. Brug af prøver med $\Delta Cq > 5$ kan muligvis øge sandsynligheden for mislykket klargøring af biblioteket og nedsat analyseydelse.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-reagenserne er blevet konfigureret og testet for de prøveinput, berigelsesreaktioner og pleksiteter, der er angivet i nedenstående tabel.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Prøveinput	Berigelsesreaktioner	Berigelsespleksitet
16-prøvers kit	Lav kvalitet (FFPE)	16 reaktioner	1-plex
96-prøvers kit	Høj kvalitet (f.eks. fuldblod)	8 reaktioner	12-plex

- Behandling af FFPE-input er blevet testet og anbefales udelukkende til 1-plex-berigelsesreaktioner med brug af 16-prøvers kittet.
- Med 96-prøvers kittet kan der anvendes ikke-standard-pleksiteter (2-plex til 11-plex), men dette er forbundet med følgende begrænsninger:
 - Behandling af prøver i 2-plex- til 11-plex-berigelsesreaktioner reducerer kittets gennemløb.
 - Der kan ikke gives garanti for optimale resultater. Det kan kræve yderligere optimering at opnå passende berigelsesudbytte for ikke-standard-pleksiteter.
 - Hvad angår puljeoprettelsesstrategier med lav pleksitet (2-plex til 8-plex), skal der vælges indeksadaptore med forskellige sekvenser for at optimere farvebalancen med henblik på vellykket sekventering og dataanalyse. DNA GenerateFASTQ Dx -modulen på MiSeqDx og NextSeq 550Dx giver mulighed for at indstille farvebalancerede indeksskategorier under kørselskonfigurationen. Du kan finde flere oplysninger om puljeoprettelsesstrategier i [Puljeoprettelsesmetoder på side 33](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er udelukkende beregnet til at frembringe berigede biblioteker til sekventering på MiSeqDx, NextSeq 550Dx og NovaSeq 6000Dx. Brug af andre sekventeringssystemer kræver fuld validering med hensyn til alle ydelsesaspekter.
- Berigelsespaneler medfølger ikke som en del af dette produkt. De analytiske testresultater under [Ydelsesegenskaber på side 57](#) er opnået med repræsentative berigelsespaneler og er udelukkende til information. De analytiske ydelsesegenskaber har til formål at eksemplificere analysens generelle kapaciteter og klarlægger ikke kapaciteter eller velegnethed, hvad angår specifikke analysekrav. Alle diagnostiske tests, der bliver udviklet til brug med disse reagenser, skal valideres fuldt ud med hensyn til alle ydelsesaspekter.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med berigelsespaneler fra både Illumina og tredjeparter. Der kan imidlertid ikke gives garanti for ydelsen med berigelsespaneler fra tredjeparter, der ikke opfylder panelkravene. Du kan finde oplysninger om panelkrav under [Krav til berigelsesprobepaneler på side 10](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit bruger en hybridiseringstid på 2 timer. Anvendelse af længere hybridiseringstid kan have indvirkning på ydelsemålinger.
- DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager-moduler til MiSeqDx og NextSeq 550Dx leverer kun FASTQ-filer. Hvis du bruger disse moduler, behøver du ikke at udføre sekundær analysevalidering.

- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application er kun tilgængelig på NovaSeq 6000Dx. Applikationen understøtter flere arbejdsgange for sekundær analyse, inklusive FASTQ-generering, FASTQ- og VCF-generering for detektion af kimlinjevariationer og FASTQ- og VCF-generering for detektion af somatiske variationer. Hvis du bruger applikationen til VCF-generering, behøver du ikke at udføre sekundær analysevalidering.
- For begrænsninger ved DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application, når den anvendes med NovaSeq 6000Dx, henvises der til *NovaSeq 6000Dx Instrument Package Insert (Indlægsseddel til NovaSeq 6000Dx Instrument) (dokumentnr. 200025276)*.

Produktets bestanddele

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit består af følgende komponenter.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, katalognr. 20051354 (16 prøver) eller katalognr. 20051352 (96 prøver)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, katalognr. 20051355 (16 prøver) eller katalognr. 20051353 (96 prøver)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module for NextSeq 550Dx, katalognr. 20063024
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module for MiSeqDx, katalognr. 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NovaSeq 6000Dx, katalognr. 20074609

Medfølgende reagenser

Gennemførsel af Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kræver Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A eller Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Du kan udføre følgende antal biblioteksklargøringer og berigelsesreaktioner med et 16-prøvers eller 96-prøvers kit.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Prøveinput	Berigelsesreaktioner	Berigelsespleksitet
16-prøvers kit	Lav kvalitet (FFPE)	16 reaktioner	1-plex
96-prøvers kit	Høj kvalitet (f.eks. fuldblod)	8 reaktioner	12-plex

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

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, opbevaring ved 15 °C til 30 °C

Følgende reagenser afsendes ved rumtemperatur. Sæt omgående reagenserne til opbevaring ved de anviste temperaturer for at sikre korrekt ydelse.

Reagensnavn	Antal rør		Hættens farve	Fyldningsvolumen	Aktive stoffer
	16 prøver (nr. 20050020)	96 prøver (nr. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Rød	350 µl	Rensemiddelopløsning i vand.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Grøn	41 ml	Vandig bufferopløsning indeholdende rensmiddel og salt.
Cleanup Beads (CB)	1	N/A (IKKE RELEVANT)*	Rød	10 ml	Paramagnetiske fastfase-perler i vandig bufferopløsning.

* Cleanup Beads til 96 prøver er inkluderet i Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (nr. 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 Samples), opbevaring ved 15 °C til 30 °C

For 96-prøvers kits er Cleanup Beads inkluderet i Illumina Prep Dx Cleanup Beads (katalognr. 20050030). Følgende reagens afsendes ved rumtemperatur. Sæt omgående reagenserne til opbevaring ved de anviste temperaturer for at sikre korrekt ydelse. For 16-prøvers kits er Cleanup Beads inkluderet i Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (katalognr. 20050020).

Reagensnavn	Antal	Hættens farve	Fyldningsvolumen	Aktive stoffer
Cleanup Beads (CB)	4	Rød	10 ml	Paramagnetiske fastfase-perler i vandig bufferopløsning.

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, opbevaring ved 2 °C til 8 °C

Følgende reagenser afsendes på køl. Sæt omgående reagenserne til opbevaring ved de anviste temperaturer for at sikre korrekt ydelse. Opbevar eBLTS-opbevaringsrøret lodret, så perlerne altid er nedsunket i bufferen.

Reagensnavn	Antal rør		Hættens farve	Fyldningsvolumen		Aktive stoffer
	16 prøver (nr. 20050021)	96 prøver (nr. 20050026)		16 prøver	96 prøver	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Gul	200 µl	290 µl	Streptavidin Magnetic Beads sammenkædet med transposomer i vandig bufferopløsning, der indeholder glycerol, EDTA, dithiothreitol, salt og rensmiddel.
Resuspensionsbuffer (RSB)	1	4	Klar	1,8 ml	1,8 ml	Vandig bufferopløsning.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, opbevaring ved -25 °C til -15 °C

Følgende reagenser afsendes frosne. Sæt omgående reagenserne til opbevaring ved de anviste temperaturer for at sikre korrekt ydelse.

Reagensnavn	Antal rør		Hættens farve	Fyldningsvolumen		Aktive stoffer
	16 prøver (nr. 20050022)	96 prøver (nr. 20050027)		16 prøver	96 prøver	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Klar	290 µl	290 µl	Vandig bufferopløsning, der indeholder magnesiumsalt og dimethylformamid.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Klar	200 µl	610 µl	DNA-polymerase og dNTP'er i vandig bufferopløsning.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 samples), opbevaring ved 2 °C til 8 °C

For 16-prøvers kits er følgende reagenser inkluderet i Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr. 20050023). For 96-prøvers kits er reagenserne inkluderet i Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr. 20050028).

Følgende reagenser afsendes på køl. Sæt omgående reagenserne til opbevaring ved de anviste temperaturer for at sikre korrekt ydelse.

Reagensnavn	Antal rør	Hættens farve	Fyldningsvolumen	Aktive stoffer
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Klar	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads i vandig bufferopløsning indeholdende formamid, reensemiddel og salt.
Resuspensionsbuffer (RSB)	1	Klar	1,8 ml	Vandig bufferopløsning.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Klar	200 µl	Vandig bufferopløsning indeholdende reensemiddel og salt.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Klar	200 µl	Vandig bufferopløsning.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 samples), opbevaring ved 2 °C til 8 °C

For 96-prøvers kits er følgende reagenser inkluderet i Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr. 20050028). For 16-prøvers kits er reagenserne inkluderet i IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr. 20050023).

Følgende reagenser afsendes på køl. Sæt omgående reagenserne til opbevaring ved de anviste temperaturer for at sikre korrekt ydelse.

Reagensnavn	Antal rør	Hættens farve	Fyldningsvolumen	Aktive stoffer
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Klar	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads i vandig bufferopløsning indeholdende formamid, rensmiddel og salt.
Resuspensionsbuffer (RSB)	4	Klar	1,8 ml	Vandig bufferopløsning.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Klar	200 µl	Vandig bufferopløsning indeholdende rensmiddel og salt.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Klar	200 µl	Vandig bufferopløsning.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, opbevaring ved -25 °C til -15 °C

Følgende reagenser afsendes frosne. Sæt omgående reagenserne til opbevaring ved de anviste temperaturer for at sikre korrekt ydelse.

Reagensnavn	Antal rør		Hættens farve	Fyldningsvolumen	Aktive stoffer
	16 prøver (# 20050024)	96 prøver (# 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Klar	580 µl	Rensemiddelopløsning i vand.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Ravgul	4,1 ml	Vandig bufferopløsning indeholdende salte og resemiddel.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Klar	320 µl	Blanding af PCR-primere (oligonukleotider).
2N NaOH (HP3)	1	1	Klar	200 µl	2N natriumhydroxid (NaOH)-opløsning.
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Blå	480 µl	Vandig bufferopløsning med Cot-1 DNA, crowding-stof og formamid
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Klar	200 µl	DNA-polymerase og dNTP'er i vandig bufferopløsning.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B; opbevares ved -25 °C til -15 °C

Følgende reagenser afsendes frosne. Sæt omgående reagenserne til opbevaring ved de anviste temperaturer for at sikre korrekt ydelse. Du kan finde oplysninger om indeks-adaptersekvenser i [Bilag: Illumina UD-indeks-adaptersekvenser på side 60](#).

Komponent	Antal
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Indexes), nr. 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 Indexes), nr. 20050039	1

Reagenser, der ikke medfølger

Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

- Reagenser til DNA-ekstraktion og -oprensning
- Reagenser til DNA-kvantificering
- Ethanol (200 proof til molekylærbiologi)
- Nukleasefrit vand
- 1M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5-8,5
- 1N NaOH-opløsning, molekylærbiologisk kvalitet
- Hvis du anvender et NextSeq 550Dx-sekventeringssystem:
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (katalognr. 20028871)
- Hvis du anvender et MiSeqDx-sekventeringssystem:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalognr. 20037124)
- Hvis du anvender et NovaSeq 6000Dx-sekventeringssystem:
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (katalognr. 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (katalognr. 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalognr. 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalognr. 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalognr. 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (katalognr. 20062291)

Krav til berigelsesprobepaneller

Reagenserne i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatible med DNA-berigelsesoligonukleotidpaneller fra både Illumina og tredjeparter. Hvis du bruger tredjeparts biotinylerede DNA-prober (faste eller brugerdefinerede paneller), skal du sørge for, at de opfylder de påkrævede specifikationer.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er optimeret og valideret ved brug af følgende specifikationer for tredjepartspaneller. Der gives ingen garanti for tilsvarende ydelse ved brug af tredjepartspaneller, der ikke opfylder specifikationerne.

- Probelængde på 80 bp eller 120 bp
- Mellem 500 og 675.000 prober
- Enkelt- eller dobbeltstrenget DNA
- Totalt probeinput på ≥ 3 pmol for berigelse ved en pleksitet fra 1-plex til 12-plex

Opbevaring og håndtering

- Rumtemperatur er defineret som 15 °C til 30 °C.
- Reagenserne er stabile ved de anførte opbevaringsbetingelser indtil den udløbsdato, der fremgår af mærkningen på sættene. For opbevaringstemperaturer henvises der til [Medfølgende reagenser på side 4](#).
- De frosne reagenser er stabile i maksimalt fire nedfrysings-/optøningscykluser, der gennemføres inden den anførte udløbsdato.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-proceduren har følgende sikre stoptidspunkter:
 - Efter [Amplificering af tagmenteret DNA på side 28](#) er de amplificerede biblioteker stabile i op til 30 dage ved opbevaring ved -25 °C til -15 °C.
 - Efter [Oprensning af biblioteker på side 31](#) er de oprensede, amplificerede biblioteker stabile i op til 30 dage ved opbevaring ved -25 °C til -15 °C.
 - Efter [Oprettelse af forudberigede bibliotekspuljer på side 33](#) er bibliotekspuljerne stabile i op til 30 dage ved opbevaring ved -25 °C til -15 °C.
 - Efter [Amplificering af beriget bibliotek på side 43](#) kan pladen med berigede, amplificerede biblioteker forblive på termocyklere i op til 24 timer. Alternativt kan pladen opbevares ved 2 °C til 8 °C i op til 48 timer.
 - De endelige, oprensede, berigede biblioteker er stabile i op til 7 dage ved opbevaring ved -25 °C til -15 °C.
- Kontakt Illuminas kundeservice, hvis emballagen eller indholdet i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er beskadiget eller brudt.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) kan danne synligt bundfald eller krystaller. Hvis du bemærker bundfald: Opvarm ved 37 °C i 10 minutter, og bland derefter på vortexblander, indtil bundfaldet er opløst.
- Hybridization Oligos (HYB) og Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) skal forvarmes til samme temperatur som den relevante hybridiseringsholdetemperatur pr. prøvetype og probepanel. Du kan finde flere oplysninger om håndtering af NHB2 og EEW i [Noter til fremgangsmåde på side 16](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) og HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) kan danne krystaller og uklarhed. Hvis du bemærker krystaller eller uklarhed, skal du blande på vortexblander eller pipettere op og ned, indtil opløsningen er klar. Sørg for at forvarme NHB2 inden pipettering.
- Anvend følgende best practice i forbindelse med håndtering af Cleanup Beads (CB):
 - Nedfrys aldrig perlerne.

- Bland perlerne i vortexblander umiddelbart inden brug, indtil de er genopløst, og farven er homogen.
- Anvend følgende best practice i forbindelse med håndtering af Enrichment BLT Small (eBLTS):
 - Opbevar eBLTS-røret lodret, så perlerne altid er nedsunket i bufferen.
 - Bland eBLTS grundigt på vortexblander, indtil perlerne er genopløste. For at undgå at perlerne sætter sig igen, frarådes det at centrifugere inden pipettering.
 - Hvis perlerne har sat sig på siden eller i toppen af pladen med 96 brønde, centrifugeres der ved 280 × g i 3 sekunder, hvorefter de genopløses ved pipettering.
- Anvend følgende best practice i forbindelse med håndtering af indexadapterplader:
 - Tilføj ikke prøver til indeksadapterpladen.
 - Hver brønd på indekspladen er kun til engangsbrug.

Nødvendigt udstyr og nødvendige materialer, medfølger ikke

Udover Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit skal du sørge for, at du har det nødvendige udstyr og de nødvendige materialer, før du starter protokollen.

Udstyr

Sørg for, at du har det udstyr, du skal bruge, før du starter protokollen.

Protokollen er optimeret og valideret ved brug af de anførte specifikationer. Der gives ingen garanti for tilsvarende ydelse ved brug af udstyr uden for specifikationerne.

Nogle artikler er kun nødvendige til specifikke arbejdsgange. Disse artikler er angivet i separate tabeller.

- Termocykler med følgende specifikationer:
 - Opvarmet låg
 - Temperaturkontrolinterval på minimum 10 °C til 98 °C
 - Temperaturpræcision på minimum ±0,25 °C
 - Reaktionsvolumen på maksimum 100 µl
 - Kompatibilitet med PCR-plader med 96 brønde og fuldt skørt
- Mikroprøveinkubator med følgende specifikationer:
 - Interval for omgivelsestemperatur på +5,0 °C til 99,0 °C
 - Kompatibilitet med MIDI-plader med 96 brønde
- Indsatser til mikroprøveinkubator, der er kompatible med MIDI-plader med 96 brønde
- Højhastighedsmikropladeomryster med et blandingshastighedsinterval på 200-3000 o/m
- Magnetisk holder, der er kompatibel med PCR-plader med 96 brønde

- Magnetisk holder, der er kompatibel med MIDI-plader med 96 brønde
- Fluorometer, der er kompatibelt med din kvantificeringsmetode
- DNA-fragmentanalyseenhed
- Præcisionspipetter:
 - 10 µl enkeltkanal- og multikanalpipetter
 - 20 µl enkeltkanal- og multikanalpipetter
 - 200 µl enkeltkanal- og multikanalpipetter
 - 1000 µl enkeltkanalpipetter
 - Præcisionspipetter sikrer nøjagtig levering af reagens og prøve. Enkeltkanal- eller multikanalpipetter kan anvendes, hvis de bliver kalibreret regelmæssigt og har en nøjagtighed inden for 5 % i forhold til den angivne volumen.
- Mikropladecentrifuge
- Mikrocentrifuge
- Et af følgende Illumina sekventeringssystemer:
 - MiSeqDx Instrument, katalognr. DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx Instrument, katalognr. 20005715
 - NovaSeq 6000Dx Instrument, katalognr. 20068232
- **[Valgfrit]** Vakuumkantrator
- **[FFPE]** PCR-detektionssystem i realtid

Materialer

Sørg for, at du har de materialer, du skal bruge, før du starter protokollen.

Nogle artikler er kun nødvendige til specifikke arbejdsgange. Disse artikler er angivet i separate tabeller.

Protokollen er optimeret og valideret ved brug af de anførte artikler. Der gives ikke garanti for samme ydelse ved brug af andre materialer.

- Pipettespidser med filter
- Koniske centrifugerør, 15 ml eller 50 ml
- 1,5 ml mikrocentrifugerør
- RNase/DNase-frie multikanalsreagensreservoirer, engangsbrug
- RNase/DNase-fri strips med 8 rør og hætter
- Serologiske pipetter
- Dybbrøndsopbevaringsplade af polypropylen med 96 brønde, 0,8 ml (MIDI-plade)
- Hard-Shell PCR-plader med fuldt skørt og 96 brønde
- **[FFPE]** qPCR-plader, der er kompatible med qPCR-instrument

- Selvklebende forseglinger til 96-brønds plader med følgende specifikationer:
 - Optisk klar polyester, der kan pilles af
 - Velegnede til PCR-plader med skørt
 - Stærkt klæbemiddel, der kan modstå flere temperaturændringer fra -40 °C til 110 °C
 - DNase/RNase-frit
- Plastikmaterialer, der er kompatible med den valgte kvantificeringsmetode
- Fluorometrisk dsDNA-kvantificeringskit, der er kompatibelt med det valgte kvantificeringssystem:
 - Til kvantificering af forudberigede, amplificerede biblioteker kan der anvendes et kvantificeringskit med bredt interval.
 - Til kvantificering af berigede biblioteker afhænger kvantificeringskittets interval af det anvendte probepanel.
- Fragmentanalysekit til biblioteks kvalificering med det valgte kvalificeringssystem:
 - Til kvalificering af forudberigede, amplificerede biblioteker kan der anvendes et kvalificeringskit med bredt interval.
 - Til kvalificering af berigede biblioteker afhænger kvalificeringskittets interval af det anvendte probepanel.
- **[Valgfrit]** Kit til DNA-ekstraktion fra humane celler og humant væv. Du kan anvende en hvilken som helst valideret ekstraktionsmetode.

Indhentning, transport og opbevaring af prøver



FORSIGTIG

Alle prøver skal håndteres som potentielt infektiøse stoffer.

- Denne analyse er kompatibel med genomisk DNA, der er afledt fra humane celler og humant væv.
- Hvad angår kommercielt tilgængeligt oprenset gDNA, skal du sikre dig, at prøverne er blevet transporteret under de korrekte betingelser og opbevaret i henhold til producentens anvisninger. Følg best practice for gDNA'ets opbevaring og nedfrysningsoptøningscyklusser.
- Hvad angår fuldblodsinput, skal du følge de gældende krav til indsamling, transport og opbevaring af blod for den valgte DNA-ekstraktionsmetode. Der kan anvendes en hvilken som helst valideret ekstraktionsmetode. Helblod skal transporteres i overensstemmelse med nationale, regionale og lokale regler vedrørende transport af ætiologiske stoffer.
- Til ekstraktion af DNA fra FFPE-væv kan der anvendes en hvilken som helst valideret ekstraktionsmetode. Følg anvisningerne og anbefalingerne for den valgte ekstraktionsmetode for at fastlægge praksis for følgende:
 - Metode til formalinfiksering og paraffinindstøbning af væv for at sikre optimal kvalitet af det ekstraherede DNA.

- Opbevaring af FFPE-prøver.
- Krav til startmaterialer, såsom antallet og tykkelsen af FFPE-sektionerne. De fleste oprensningsmetoder anbefaler brug af nyskårne sektioner.

Advarsler og forsigtighedsregler

- Reagenserne i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder briller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfaren. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende nationale love og forordninger. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladene (SDS) på support.illumina.com/sds.html.
- Alle blodprøver skal håndteres som værende smitsomme med human immundefekt-virus (hiv), human hepatitis B-virus (HBV) eller andre blodbårne patogener (universelle forsigtighedsregler).
- Overhold laboratoriets rutinemæssige forholdsregler. Må ikke pipetteres med munden. Der må ikke indtages mad og drikke eller ryges i arbejdsområderne. Anvend engangshandsker og laboratoriekittel i forbindelse med håndtering af prøver og reagenser. Vask hænderne grundigt efter håndtering af prøver og reagenser.
- For at forhindre nedbrydning af prøver eller reagenser skal det tilsikres, at alle natriumhypochloritdampe som følge af rengøring er fuldstændigt forsvundet, inden protokollen påbegyndes.
- Kontaminering af prøverne med andre PCR-produkter/amplikoner kan forårsage unøjagtige og upålidelige resultater. Anvend følgende best practices for at undgå kontaminering:
 - Anvend korrekt laboratoriepraksis og laboratoriehygiejne.
 - Udfør trinnene i arbejdsgangen i det relevante præ- eller post-amplifikationsområde.
 - Sæt brugte reagenser til opbevaring, før du rengør biblioteker i et præ-amplifikationsområde.
 - Adskil præ-amplifikationsreagenser fra post-amplifikationsreagenser.
 - For at forhindre kontaminering skal det sikres, at præ- og post-amplifikationsområderne har dedikeret udstyr, f.eks. pipetter, pipettespidser, vortexblander og centrifuge.
- Undgå krydskontaminering. Brug nye pipettespidser mellem hver prøve og mellem dispensering af reagenser. Brug af spidser med filter reducerer risikoen for amplikonoverførsel og krydskontaminering fra prøve til prøve.
 - Skift spidser mellem hver prøve, når du tilføjer eller overfører prøver eller reagens-masterblandinger.
 - Skift spidser mellem hver række eller hver kolonne, når du tilføjer indeksadaptere med en multikanalpipette. Skift spidser mellem hver prøve, hvis du bruger en enkeltkanalspipette.
 - Fjern indeksadapterplader, der ikke er i brug, fra arbejdsområdet.
- Anvend følgende best practice på trin med ethanolvask:
 - Klargør altid frisk 80 % ethanol. Ethanol kan absorbere vand fra luften, hvilket kan påvirke resultaterne.

- Sørg for, at alt ethanol fjernes fra bunden af brøndene på vasketrinnene. Resterende ethanol kan påvirke resultaterne.
- Overhold den anviste tørretid på trinnene med den magnetiske holder for at sikre fuldstændig fordampning. Resterende ethanol kan påvirke resultaterne af efterfølgende reaktioner.
- Klargør altid masterblandinger inden brug, og opbevar aldrig de blandede arbejdsopløsninger.
- Der gives ingen garanti for de opnåede resultater med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, hvis procedurerne ikke bliver fulgt, som beskrevet i indlægssedlen.
- Brug ikke komponenterne i kittet efter den udløbsdato, der er angivet på kittets etiket.
- Byt ikke om på kitkomponenter fra forskellige Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-kit. Kit-identifikationen fremgår af etiketten.

Noter til fremgangsmåde

Anbefalinger vedrørende DNA-input

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-protokollen er kompatibel med dobbeltstrenget genomisk DNA (gDNA)-input af høj kvalitet på 50-1000 ng.

Sørg for, at den initiale gDNA-prøve ikke indeholder > 1 mM EDTA og er fri for organiske kontaminanter, såsom phenol og ethanol. Disse stoffer kan interferere med tagmenteringsreaktionen og resultere i analysefejl.

gDNA-input \geq 50 ng

Ved gDNA-input på 50-1000 ng er det ikke nødvendigt at kvantificere og normalisere den initiale gDNA-prøve.

gDNA-input < 50 ng

DNA-input på 10-50 ng kan anvendes med følgende justeringer:

- Ved anvendelse af 10-49 ng gDNA-input anbefales det at kvantificere den initiale gDNA-prøve for at bestemme det nødvendige antal PCR-cykluser efter tagmentering. Anvend en fluorometribaseret metode til kvantificering af dobbeltstrenget gDNA-input. Undgå metoder, der måler total nukleinsyre, såsom NanoDrop eller andre UV-absorbansmetoder.
- Denne protokol normaliserer ikke endelige forudberigede biblioteksudbytter fra 10-49 ng gDNA, og derfor er kvantificering og normalisering af bibliotekerne før og efter berigelse nødvendig.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er blevet karakteriseret og verificeret til DNA-input på 50-1000 ng. Der kan ikke gives garanti for en tilsvarende produkydelse for gDNA-input < 50 ng.

Anbefalinger vedrørende blodinput

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med gDNA, der er ekstraheret fra perifert fuldblod. Der kan anvendes en hvilken som helst valideret ekstraktionsmetode. Ved ekstraktion af gDNA fra fuldblod er indledende kvantificering af input-DNA'et ikke nødvendig, og Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit frembringer normaliserede udbytter af forudberigede biblioteker.

Følgende faktorer kan have negativ indvirkning på mængden af DNA, der indhentes fra fuldblodprøver, og dermed biblioteksnormaliseringen:

- Blodprøvens alder
- Opbevaringsbetingelser
- Underliggende medicinske tilstande, der påvirker antallet af hvide blodlegemer

Anbefalinger vedrørende FFPE-vævsprøveinput

Anvend følgende kvalitetskriterier for FFPE DNA for at klarlægge passende input til vellykket biblioteksklargøring:

- For FFPE-prøver med en ΔCq -værdi ≤ 5 er det anbefalede DNA-input 50-1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx anbefales ikke til FFPE-prøver at ringe kvalitet med $\Delta Cq > 5$. Brug af prøver med $\Delta Cq > 5$ er mulig, men kan muligvis øge sandsynligheden for mislykket klarlægning af biblioteket eller nedsat analyseydelse.

Ekstraktion fra FFPE

Anvend en metode til nukleinsyreisolering, der frembringer høje gendannelsesudbytter, minimerer prøveforbruget og bevarer prøveintegriteten. Du kan anvende en hvilken som helst valideret metode til ekstraktion af DNA fra FFPE-prøver. For gDNA, der er ekstraheret fra FFPE-væv, skal der udføres initial kvantificering af input-DNA, og Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit frembringer ikke normaliserede udbytter af forudberigede biblioteker.

Kvalificering af DNA fra FFPE

gDNA, der er ekstraheret fra FFPE-væv, skal kvalificeres inden brug. Med henblik på optimal ydelse skal DNA-prøvekvaliteten vurderes ved hjælp af en valideret ekstraktionsmetode til kvalificering af DNA, der er ekstraheret fra FFPE-prøver. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-protokollen er kompatibel med FFPE DNA-samples med ΔCq -værdi på ≤ 5 . Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit anbefales ikke til FFPE-prøver at ringe kvalitet med $\Delta Cq > 5$. Brug af prøver med $\Delta Cq > 5$ er mulig, men kan muligvis øge sandsynligheden for mislykket klarlægning af biblioteket eller nedsat analyseydelse.

[Valgfrit] FFPE-refernceprøver

Anvend karakteriserede referencematerialer, såsom Horizon HD799 (DNA), som positivkontrol ved gennemførelse af protokollen. Der kan også anvendes kvalificerede FFPE-materialer fra cellelinjederiverede xenografter som referenceprøver. Anvend en fluorometribaseret metode til kvantificering af referencematerialer inden brug.

BEMÆRK! Kørsel af en positiv kontrolreferenceprøve eller kontrol uden skabelon forbruger reagenser og reducerer det totale antal ukendte prøver, der kan behandles.

Anbefalinger vedrørende prøveinput

Anbefalingerne vedrørende prøveinput til Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er opsummeret i tabellen nedenfor.

Tabel 1 Anbefalinger vedrørende prøveinput

Typen af prøveinput	Mængden af prøveinput	Kvantificering af input-DNA påkrævet	Påkrævet kvalitet af DNA-input	Normaliseret udbytte af forudberiget bibliotek
gDNA	10-49 ng	Ja	260/280-ratio på 1,8-2,0	Nej
gDNA	50-1000 ng	Nej	260/280-ratio på 1,8-2,0	Ja
gDNA fra blod	50-1000 ng	Nej	260/280-ratio på 1,8-2,0	Ja
gDNA fra FFPE	50-1000 ng	Ja	ΔCq -værdi ≤ 5	Nej

De anbefalede PCR-cyklusser til eBLTS PCR-programmet justeres på baggrund af koncentrationen og kvaliteten af prøveinput. Du kan finde flere oplysninger i [Amplificering af tagmenteret DNA på side 28](#).

Tips og teknikker**Forebyggelse af krydskontaminering**

- Skift spidser mellem *hver prøve*, når du tilføjer eller overfører prøver.
- Skift spidser mellem *hver række* eller *hver kolonne*, når du tilføjer indeksadaptere med en multikanalpipette. Skift spidser mellem hver prøve, hvis du bruger en enkeltkanalspipette.

Forsegling af pladen

- Forsegl altid pladen med 96 brønde med ny, selvklæbende forsegling ved hjælp af en gummirulle for at dække pladen, inden følgende trin i protokollen udføres:

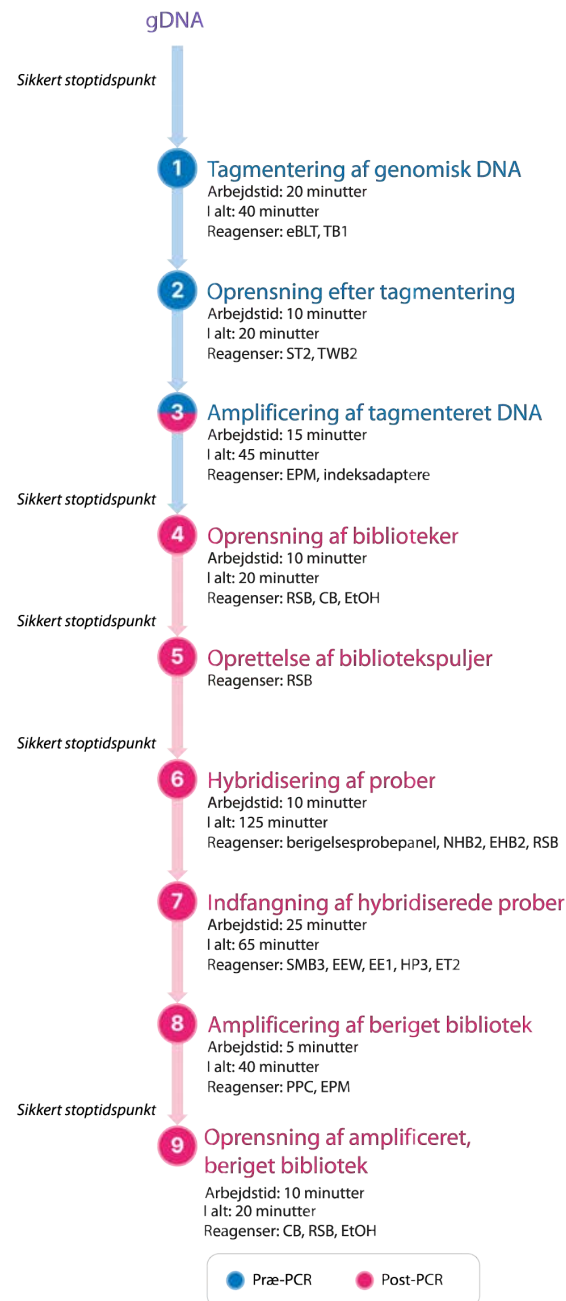
- Omrystningstrin
- Inkubationstrin. Hvis pladen ikke bliver korrekt forseglet, kan det medføre fordampning under inkubationen.
- Centrifugeringstrin
- Hybridiseringstrin
- Sørg for, at kanterne og brøndene er fuldstændigt forseglede for at reducere risikoen for krydskontaminering og fordampning.
 - Centrifuger efter behov inden fjernelse af forseglingen, hvis der observeres væske eller kondensdannelse på forseglingen eller brøndenes sidevægge.
- Placer pladen på en jævn overflade, inden forseglingen fjernes forsigtigt.

Håndtering af Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Opbevar eBLTS-opbevaringsrøret lodret i køleskabet, så perlerne altid er nedsunket i bufferen.
- Umiddelbart inden brug blandes eBLTS-opbevaringsrøret grundigt på vortexblander, indtil perlerne er genopløste. For at undgå at perlerne sætter sig igen, frarådes det at centrifugere inden pipettering.
- Hvis perlerne har sat sig på siden eller i toppen af pladen med 96 brønde, centrifugeres der ved $280 \times g$ i 3 sekunder, hvorefter de genopløses ved pipettering.
- Ved vask af eBLTS:
 - Brug den korrekte magnetiske holder til pladen.
 - Bibehold pladen på den magnetiske holder, indtil vejledningen angiver, at den skal fjernes.
 - Hvis perlerne suges op i pipettespidsen, skal du dispensere perlerne tilbage på pladen på den magnetiske holder og vente, indtil væsken er klar (2 minutter).

Arbejdsgang med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Arbejdsgangen med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er illustreret i nedenstående diagram. Sikre stoptidspunkter er markeret mellem trinnene. Tidsestimeringer er baseret på behandling af 12 prøver ved 12-plex-berigelse.



Brugervejledning

Dette kapitel beskriver Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-protokollen.

- Gennemgå hele arbejdsgangen for den planlagte sekventering, fra prøve til analyse, for at sikre kompatibilitet med produkter og eksperimentparametre.
- Før du fortsætter, skal du kontrollere kitindholdet og sørge for, at du har de nødvendige komponenter, udstyr og materialer.
 - Tredjeparts bioetnylerede prober skal opfylde specifikke krav. Se [Krav til berigelsesprobepaneller på side 10](#) for at sikre, at dine tredjepartsprober opfylder kravene.
- Følg protokollen i den viste rækkefølge, og anvend de angivne voluminer og inkubationsparametre.
- Fortsæt straks til næste trin, medmindre der er et sikkert stoptidspunkt i protokollen.
- Når du opretter en masterblanding, er overskud inkluderet i de angivne voluminer.
- Sørg for at bruge den korrekte magnetiske holder til din pladetype.

Klargøring til puljeoprettelse

Dette trin er nødvendigt for at sikre vellykket sekventering af berigede biblioteker. Oprettelse af bibliotekspuljer kan ske inden berigelse og inden sekventering.

Inden berigelse – Individuelle, indekserede, amplificerede biblioteker samles i puljer med henblik på berigelse med det valgte probepanel. Derved bliver der oprettet en multiplekseret pulje med berigede biblioteker. For FFPE-prøveinput er behandlingen blevet testet og anbefales udelukkende til 1-plex-berigelsesreaktioner. For gDNA af høj kvalitet er 12-plex blevet testet, men 2-plex til 11-plex er muligt.

Inden sekventering – 1-plex-berigede biblioteker og/eller multipleksberigede biblioteker samles i puljer inden sekventering. Antallet af berigede biblioteker, der kan sekventeres, afhænger af mållæsningsdybden for hver prøve på dit sekventeringssystem.

Unik dobbeltindeksering

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit anvender unikke dobbeltindekser.

- Dobbeltindekserede biblioteker tilføjer Index 1 (i7)- og Index 2 (i5)-sekvenser for at generere unikt taggedede biblioteker.
- UD-indekser har forskellige, urelaterede indekssekvenser for i7- og i5-index-læsningen. Indekser er 10 baser lange.

Valg af indeksadaptere med forskellige sekvenser til puljede biblioteker optimerer farvebalancen med henblik på vellykket sekventering og dataanalyse. Pleksitetspuljer, der er ≥ 10 -plex, er i sigens natur farvebalancerede, så du kan anvende en hvilken som helst indeksadapterkombination. I forbindelse med sekventeringskørslen

giver DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module dig mulighed for at indstille farvebalancerede indekskombinationer og giver dig besked, hvis der ikke er tilstrækkelig diversitet i de valgte indekskombinationer.

Du kan finde oplysninger om Illuminas UD-indeks-adaptersekvenser og pladelayouts i [Bilag: Illumina UD-indeks-adaptersekvenser på side 60](#).

Understøttede berigelsespleksiteter

Reagenserne i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er konfigureret og testet ved en berigelsespleksitet på 1-plex og 12-plex. Det er muligt at anvende andre berigelsespleksiteter, men visse pleksiteter kræver yderligere klargøring af forudberigede biblioteker og berigelse af probepanelreagenser.

Det kan kræve yderligere optimering at opnå passende berigelsesudbytte med ikke-standard-berigelsespleksitet. Der kan ikke gives garanti for optimale resultater.

- **Berigelsespleksitet** – Antallet af forudberigede biblioteker (1-12), der samles i en pulje i én berigelsesreaktion med henblik på hybridisering med berigelsesprobepanellerne. Eksempel: Hvis du samler 12 forudberigede biblioteker, får du en 12-plex-berigelsespulje.
- **Berigelsesreaktion** – Antallet af unikke berigelsesreaktionspræparationer, uanset antallet af forudberigede biblioteker i puljen pr. reaktion. Eksempel: En enkelt berigelsesreaktion kan præparere en 1-plex- eller 12-plex-berigelsespulje.

For at beregne det totale antal post-berigede biblioteker skal du gange berigelsespleksiteten pr. reaktion med antallet af berigelsesreaktioner. Eksempel: En enkelt berigelsesreaktion for en 12-plex-berigelsespulje frembringer en pulje med 12 post-berigede biblioteker.

Ved oprettelse af puljer med forudberigede biblioteker understøtter reagenserne i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit følgende berigelsesreaktioner og pleksitet.

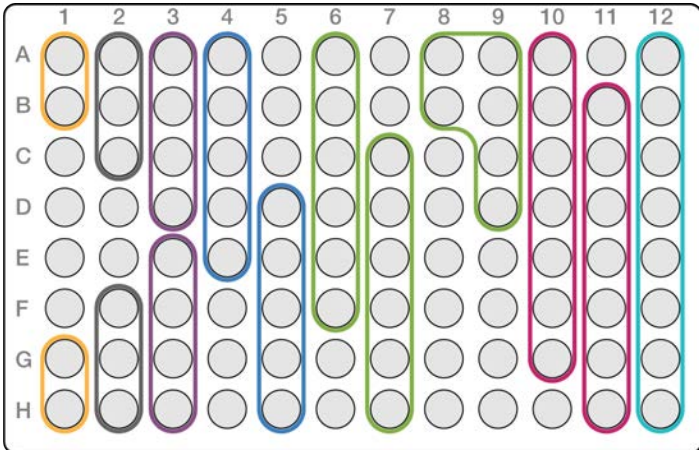
Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Reagents	Berigelsesreaktioner	Berigelsespleksitet
16-prøvers kit	16 reaktioner	1-plex
96-prøvers kit	8 reaktioner	12-plex

Strategier for oprettelse af to-plex- til otte-plex-puljer

Nedenstående tabel viser indeksadapters (brønde), der kan kombineres i en 2-8-plex-pulje, og den farvekodede figur illustrerer hver kombination.

Opret puljer med pleksitet ≥ 2 fra toppen eller bunden af en kolonne. Opret ikke puljer på tværs af en række.

Pleksitet	Kombinationer	Farve på figur
2	De to første eller to sidste brønde i en kolonne: <ul style="list-style-type: none">• A og B• G og H Række C-F anvendes ikke.	Orange
3	De tre første eller tre sidste brønde i en kolonne: <ul style="list-style-type: none">• A-C• F-H Række D og E anvendes ikke.	Grå
4	De fire første eller fire sidste brønde i en kolonne: <ul style="list-style-type: none">• A-D• E-H	Lilla
5	De fem første eller fem sidste brønde i en kolonne: <ul style="list-style-type: none">• A-E• D-H	Blå
6	[Mulighed 1] De seks første eller seks sidste brønde i en kolonne: <ul style="list-style-type: none">• A-F• C-H [Mulighed 2] De to første brønde (A og B) eller to sidste brønde (G og H) i en kolonne og fire vilkårlige brønde i en tilstødende kolonne.	Grøn
7	De syv første eller syv sidste brønde i en kolonne: <ul style="list-style-type: none">• A-G• B-H	Lyserød
8	Hele kolonnen.	Turkis

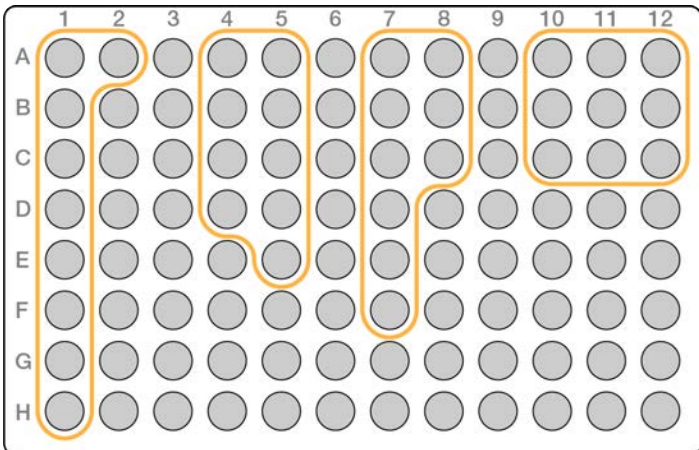


Strategier for oprettelse af ni-plex-puljer

Anvend indeksadapters fra brønde, der optimerer farvebalancen i en sekventeringskørsel, for eksempel:

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

Alle fire eksempler er afbildet på nedenstående figur.



Tagmentering af genomisk DNA

På dette trin anvendes der Enrichment BLT Small (eBLTS) til at tagmentere DNA, hvilket er en proces, der fragmenterer og tagger DNA med adaptersekvenser.

Materialer

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (gul hætte)

- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nukleasefrit vand
- PCR-plade med 96 brønde
- Selvklæbende forsegling
- 1,7 ml mikrocentrifugerør
- Strip med 8 rør
- Pipettespidser
 - 200 µl multikanalpipetter



FORSIGTIG

Dette reagenssæt indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder briller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfaren. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende nationale love og forordninger. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladene (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

Om reagenser

- eBLTS skal opbevares ved temperaturer mellem 2 °C til 8 °C. Undlad at bruge eBLTS, som er blevet opbevaret under 2 °C.
- Centrifuger ikke eBLTS.

Klargøring

1. Klargør følgende materialer:

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
eBLTS (gul hætte)	2 °C til 8° C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur. Bland på vortexblander umiddelbart inden brug. Centrifuger ikke før pipettering.
TB1	-25 °C til -15 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur. Bland på vortexblander.

2. Bland eller pipetter DNA, og centrifuger derefter kortvarigt.
3. Gem følgende TAG-program på termocycleren:
 - Vælg funktionen til præopvarmning af låget, og indstil til 100 °C
 - Indstil reaktionsvoluminen til 50 µl
 - 55 °C i 5 minutter
 - Hold ved 10 °C

Fremgangsmåde

1. Tilføj 2-30 µl DNA til hver brønd på en PCR-plade med 96 brønde, så den totale inputmængde er 50-1000 ng.
Hvis DNA-volumen er < 30 µl: Tilføj nukleasefrit vand til DNA-prøverne for at opnå en totalvolumen på 30 µl.
2. Bland eBLTS grundigt på vortexblander, indtil perlerne er helt genopløste.
3. Bland følgende voluminer i et rør for at klargøre Tagmentation Master Mix. Gang hver volumen med antallet af prøver, der skal behandles.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Reagensoverskud er inkluderet i voluminen.
4. Bland Tagmentation Master Mix grundigt ved pipettering.
5. Fordel Tagmentation Master Mix-voluminen ligeligt i en strip med 8 rør.
6. Overfør ved hjælp af en 200 µl multikanalpipette 20 µl Tagmentation Master Mix til hver brønd på PCR-pladen, der indeholder en prøve. Brug en ny spids pr. prøvekolonne eller -række.
7. Kassér strippen med 8 rør, når du har overført Tagmentation Master Mix.
8. Pipetter hver prøve 10 gange for at blande ved hjælp af en 200 µl pipette, der er indstillet til 40 µl. Brug en ny spids til hver prøvekolonne.
Alternativt kan du forsegle og omryste PCR-pladen ved 1600 o/m i 1 minut.
9. Forsegl pladen, og anbring den derefter på den forudprogrammerede termocykler, og kør TAG-programmet.
10. Vent, indtil TAG-programmet har nået holdetemperaturen på 10 °C, og fjern så pladen omgående..
11. Lad PCR-pladen med 96 brønde stå ved rumtemperatur i 2 minutter, og fortsæt derefter til næste trin.

Oprensning efter tagmentering

På dette trin vaskes det adapter-taggede DNA på eBLTS'en inden PCR-amplifikation.

Materialer

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- Magnetisk holder til PCR-plade med 96 brønde
- Selvklæbende forsegling
- Strip med 8 rør
- Pipettespidser
 - 20 µl multikanalpipetter
 - 200 µl multikanalpipetter

- Klargør følgende til senere procedure:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Indeksadapterplade

Om reagenser

- Sørg for at bruge den korrekte magnetiske holder til din plade. Brug af en magnetisk MIDI-pladeholder til en PCR-plade kan forhindre TWB2 i at binde til perlerne.
- Pipetter TWB2 langsomt for at minimere skumdannelse og undgå opsugning af ukorrekt volumen og ufuldstændig blanding.

Klargøring

1. Klargør følgende materialer:

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
EPM	-25 °C til -15 °C	Optø på is i 1 time. Vend op og ned for at blande, og centrifuger derefter kortvarigt.
ST2	15 °C til 30 °C	Hvis du bemærker bundfald: Opvarm ved 37 °C i 10 minutter, og bland derefter på vortexblander, indtil bundfaldet er opløst. Anvendes ved rumtemperatur.
TWB2	15 °C til 30 °C	Anvendes ved rumtemperatur.
Indeksadapterplade	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur i 30 minutter.

Fremgangsmåde

1. Tilføj 10 µl ST2 til hver tagmenteringsreaktion. Hvis du bruger en multikanalpipette, skal du pipettere ST2 ned i en strip med 8 rør og derefter overføre de relevante volumener til PCR-pladen. Brug en ny spids pr. prøvekolonne eller -række.
2. Pipetter langsomt hver brønd 10 gange for at genopløse perlerne ved hjælp af en 200 µl pipette, der er indstillet til 50 µl.
Alternativt kan du forsegle og omryste pladen ved 1600 o/m i 1 minut. Gentag efter behov.
3. Forsegl pladen, og centrifuger derefter ved 280 × g i 10 sekunder.
4. Inkuber ved rumtemperatur i 5 minutter.
5. Anbring den på den magnetiske PCR-pladeholder, og vent, til væsken er klar (3 minutter).
6. [≤ 48 prøver] Vask tre gange, som følger.
 - a. Fjern og kassér supernatant uden at forstyrre perlepelleten ved hjælp af en 200 µl multikanalpipette, der er indstillet til 60 µl.
 - b. Fjern pladen fra den magnetiske holder.

- c. Umiddelbart herefter tilsætter du langsomt 100 µl TWB2 direkte på perlerne.
 - d. Pipetter langsomt, indtil perlerne er helt genopløste. Alternativt kan du forsegle og omryste pladen ved 1600 o/m i 1 minut.
 - e. I tilfælde af stænk centrifugeres der ved 280 × g i 10 sekunder.
 - f. Anbring den på den magnetiske PCR-pladeholder, og vent, til væsken er klar (3 minutter).
Lad pladen blive på den magnetiske holder og TWB2 i brøndene for at forhindre overtørring, når du udfører den tredje vask. Fjern og kassér supernatant, når du har klargjort PCR Master Mix.
 - g. Fjern og kassér supernatant ved hjælp af en 200 µl multikanalpipette, der er indstillet til 100 µl.
 - h. Gentag trin c-f to gange, dvs. tre vaske i alt.
7. [> 48 prøver] Vask tre gange, som følger.
- a. Gennemfør trin b og c trinvist i 1 til 2 kolonner ad gangen, indtil alle kolonner er blevet behandlet, for at undgå overtørring.
 - b. Fjern og kassér supernatant ved hjælp af en 200 µl multikanalpipette, der er indstillet til 60 µl.
 - c. Fjern pladen fra den magnetiske holder.
 - d. Umiddelbart herefter tilsætter du langsomt 100 µl TWB2 direkte på perlerne.
 - e. Pipetter langsomt, indtil perlerne er helt genopløste. Alternativt kan du forsegle og omryste pladen ved 1600 o/m i 1 minut.
 - f. I tilfælde af stænk centrifugeres der ved 280 × g i 10 sekunder.
 - g. Anbring den på den magnetiske PCR-pladeholder, og vent, til væsken er klar (3 minutter).
Lad pladen blive på den magnetiske holder og TWB2 i brøndene for at forhindre overtørring, når du udfører den tredje vask. Fjern og kassér supernatant, når du har klargjort PCR Master Mix.
 - h. Fjern og kassér supernatant ved hjælp af en 200 µl multikanalpipette, der er indstillet til 100 µl.
 - i. Fjern pladen fra den magnetiske holder, og tilsæt langsomt 100 µl TWB2 direkte på perlerne.
 - j. Gennemfør trin h og i trinvist i 1 til 2 kolonner ad gangen, indtil alle kolonner er blevet behandlet.
 - k. Gentag trin e-h to gange, dvs. tre vaske i alt.
8. Lad pladen stå på den magnetiske holder indtil trin 4 i afsnittet *Procedure under Amplificering af tagmenteret DNA*.
TWB2 forbliver i brøndene for at forhindre overtørring af perlerne.

Amplificering af tagmenteret DNA

På dette trin bliver det tagmenterede DNA amplificeret ved hjælp af et PCR-program med begrænsede cyklusser. På PCR-trinnet bliver der tilføjet indeks 1 (i7)-adaptere, indeks 2 (i5)-adaptere og de nødvendige sekvenser til sekventering og clustergenerering.

Materialer

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Indeksadapterplade

- PCR-plade med 96 brønde
- Nukleasefrit vand
- Selvklæbende forsegling
- 1,5 ml mikrocentrifugerør
- Pipettespidser
 - 20 µl multikanalpipetter
 - 200 µl multikanalpipetter

Om reagenser

- Indeksadapterplader
 - En brønd kan indeholde > 10 µl indeksadaptere.
 - Tilføj ikke prøver til indeksadapterpladen.
 - Hver brønd på indekspladen er kun til engangsbrug.

Klargøring

1. Klargør følgende materialer:

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
EPM	-25 °C til -15 °C	Optø ved 4 °C eller på is i 1 time. Vend op og ned for at blande, og centrifuger derefter kortvarigt.
Indeksadapterplade	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur i 30 minutter.

2. Gem følgende eBLTS PCR-program på en termocycler ved brug af det relevante antal PCR-cykler, som angivet i tabellen nedenfor.
 - Vælg funktionen til præopvarmning af låget, og indstil til 100 °C
 - Indstil reaktionsvoluminen til 50 µl
 - 72 °C i 3 minutter
 - 98 °C i 3 minutter
 - X cyklusser ved:
 - 98 °C i 20 sekunder
 - 60 °C i 30 sekunder
 - 72 °C i 1 minut
 - 72 °C i 3 minutter
 - Hold ved 10 °C

Den totale kørselstid er ~38 minutter for 9 cyklusser og ~46 minutter for 12 cyklusser.

Typen af prøveinput	Antal PCR- cyklusser (X)
10-49 ng gDNA	12
50-1000 ng gDNA	9
50-1000 ng gDNA ekstraheret fra FFPE	12
gDNA ekstraheret fra blod	9

Fremgangsmåde

1. Bland følgende for at klargøre PCR Master Mix. Gang hver volumen med antallet af prøver, der skal behandles.
 - EPM (23 µl)
 - Nukleasefrit vand (23 µl)Reagensoverskud er inkluderet i voluminen.
2. Pipetter PCR Master Mix 10 gange for at blande, og centrifuger derefter kortvarigt.
3. Lad pladen stå på den magnetiske holder, og fjern og bortskaf TWB2 ved hjælp af en 200 µl multikanalpipette.
Tilbageværende skum på brøndvæggene har ikke negativ indvirkning på biblioteket.
4. Fjern pladen fra den magnetiske holder.
5. Tilføj straks 40 µl PCR Master Mix direkte på perlerne i hver brønd.
6. Pipetter straks for at blande, indtil perlerne er helt genopløste. Alternativt kan du forsegle og omryste pladen ved 1600 o/m i 1 minut.
7. Forsegl prøvepladen, og centrifuger ved 280 × g i 10 sekunder.
8. Centrifuger indeksadapterpladen ved 1000 × g i 1 minut.
9. Klargør indeksadapterpladen.
 - [< 96 prøver] Prik hul på folieforseglingen på indeksadapterpladen med en ny pipettspids for hver brønd (kun til det antal prøver, der skal behandles).
 - [96 prøver] Anbring en ny PCR-plade med halvskørt over indeksadapterpladen, og tryk ned for at prikke hul på folieforseglingen. Kassér den PCR-plade, som du brugte til at prikke hul på folieforseglingen.
10. Tilføj ved hjælp af en ny pipettespids 10 µl på forhånd parrede indeksadaptere til hver brønd.
11. Pipetter 10 gange for at blande ved hjælp af en pipette, der er indstillet til 40 µl. Alternativt kan du forsegle og omryste pladen ved 1600 o/m i 1 minut.
12. Forsegl pladen, og centrifuger derefter ved 280 × g i 10 sekunder.
13. Placer på termocykler, og køre eBLTS PCR-programmet.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal ALS PCR-pladen opbevares ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

Oprensning af biblioteker

På dette trin oprenses de amplificerede biblioteker ved hjælp af en procedure med dobbeltsidet perleoprensning.

Materialer

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Nyklargjort 80 % ethanol (EtOH)
- Dybbrøndsopbevaringsplade af polypropylen med 96 brønde, 0,8 ml (MIDI-plade)
- PCR-plade med 96 brønde
- Magnetisk holder til MIDI-plade
- Magnetisk holder til PCR-plade
- 1,5 ml mikrocentrifugerør
- Nukleasefrit vand

Om reagenser

- Cleanup Beads
 - Bland på vortexblander inden hver brug.
 - Bland hyppigt på vortexblander for at sikre, at perlerne er jævnt fordelt.
 - Skal opsuges og dispenseres langsomt på grund af opløsningens viskositet.

Klargøring

1. Klargør følgende materialer:

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
CB	Rumtemperatur	Blandes på vortexblander og ved at vende op og ned, indtil væskens farve er homogen.
RSB	2 °C til 8 °C	Optø ved rumtemperatur i 30 minutter. Bland på vortexblander.

Fremgangsmåde

1. Omryst PCR-pladen med 96 brønde ved 1800 o/m i 1 minut, og centrifuger den derefter kortvarigt.
2. Anbring den på en magnetisk PCR-pladeholder, og vent, til væsken er klar (1 minut).
3. Bland CB på vortexblander 3 gange i 10 sekunder, og vend den derefter op og ned flere gange for at genopløse.
4. Gør følgende for gDNA af høj kvalitet.

- a. Tilføj 77 µl nukleasefrit vand til hver brønd på en ny MIDI-plade.
 - b. Tilføj 88 µl CB til hver brønd på MIDI-pladen.
 - c. Overfør 45 µl supernatant fra hver brønd på PCR-pladen til den tilsvarende brønd på MIDI-pladen.
 - d. Kassér PCR-pladen.
 - e. Pipetter hver brønd 10 gange for at blande. Alternativt kan du forsegle og omryste pladen ved 1800 o/m i 1 minut.
 - f. Forsegl og inkuber pladen ved rumtemperatur i 5 minutter.
 - g. Kontrollér for luftbobler. Centrifuger i tilfælde af luftbobler.
 - h. Anbring den på en magnetisk MIDI-pladeholder, og vent, til væsken er klar (5 minutter).
 - i. Bland CB grundigt på vortexblander under inkubation, og tilføj derefter 20 µl til hver brønd på en *ny* MIDI-plade.
 - j. Overfør 200 µl supernatant fra hver brønd på den første MIDI-plade til den tilsvarende brønd på den nye MIDI-plade (indeholdende 20 µl CB).
 - k. Kassér den første MIDI-plade.
 - l. Pipetter hver brønd på den nye MIDI-plade 10 gange for at blande. Alternativt kan du forsegle og omryste pladen ved 1800 o/m i 1 minut.
5. Gør følgende for ekstraheret FFPE.
- a. Tilføj 81 µl CB til hver brønd på en ny MIDI-plade.
 - b. Overfør 45 µl supernatant fra hver brønd på PCR-pladen til den tilsvarende brønd på MIDI-pladen.
 - c. Kassér PCR-pladen.
 - d. Pipetter hver brønd 10 gange for at blande. Alternativt kan du forsegle og omryste pladen ved 1800 o/m i 1 minut.
6. Inkuber ved rumtemperatur i 5 minutter.
7. Kontrollér for luftbobler. Centrifuger i tilfælde af luftbobler.
8. Anbring den på en magnetisk MIDI-pladeholder, og vent, til væsken er klar (5 minutter).
9. Fjern og kassér supernatant uden at forstyrre perlerne.
10. Vask perlerne som følger.
- a. Mens pladen står på den magnetiske holder, tilsættes 200 µl frisk 80 % EtOH uden at blande.
 - b. Inkuber i 30 sekunder.
 - c. Fjern og kassér supernatant uden at forstyrre perlerne.
11. Vask perlerne en **ekstra** gang.
12. Lad lufttørre på den magnetiske holder i 5 minutter.
13. Under lufttørring bruges en 20 µl pipette til at fjerne og kassere resterende EtOH.
14. Fjern pladen fra den magnetiske holder.
15. Tilføj 17 µl RSB til perlerne.
16. Forsegl og omryst pladen ved 1800 o/m i 2 minutter.

17. Inkuber ved rumtemperatur i 2 minutter.
18. Kontrollér for luftbobler. Centrifuger i tilfælde af luftbobler.
19. Anbring pladen på den magnetiske MIDI-pladeholder, og vent, til væsken er klar (2 minutter).
20. Overfør 15 µl supernatant til en ny PCR-plade med 96 brønde.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal du forsegle pladen og opbevare den ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

Oprettelse af forudberigede bibliotekspuljer

På dette trin kombineres DNA-biblioteker med unikke indekser i en pulje med op til 12 biblioteker.

Puljeoprettelsesmetoder

Du kan oprette puljer efter volumen eller masse. Brug nedenstående tabel til at klarlægge den relevante metode til dit input.

Tabel 2 Anbefalede puljeoprettelsesmetoder

Prøveinput	Puljeoprettelsesmetode
10-49 ng gDNA	Masse
50-1000 ng gDNA	Volumen
gDNA ekstraheret fra FFPE	Masse
gDNA ekstraheret fra blod	Volumen

- Enkelt-plex-berigelse kræver ikke puljeoprettelse af forudberigede biblioteker. Det kan imidlertid være nødvendigt at tilføje RSB.
- Efter kvantificering af forudberigede biblioteker kan alle prøveinputtyper puljes efter masse for at opnå optimal indeksbalance.
- Det endelige udbytte af forudberigede biblioteker, der bliver genereret i separate eksperimentelle præparater, kan variere. Det anbefales derfor at puljer oprettes efter masse for at opnå optimal indeksbalance.
- Anvend 1-plex-berigelse i følgende situationer.
 - 10-49 ng gDNA
 - 50-1000 ng gDNA ekstraheret fra FFPE
 - Lav, ubetydelig allelfrekvensdetektion for somatisk variationsbestemmelse.

Puljeoprettelse efter masse

I følgende situationer skal du kvantificere dine biblioteker med henblik på at anvende en DNA-masse pr. bibliotek til berigelse, som specificeret under [Puljeoprettelse af forudberigede biblioteker i lige stor koncentration på side 34](#).

- 10-49 ng gDNA-prøveinput
- 50-1000 ng gDNA ekstraheret fra FFPE-prøveinput
- Lav, ubetydelig allelfrekvensdetektion for somatisk variationsbestemmelse
- gDNA ekstraheret fra blod for optimal indeksbalance

Kvantificering af forudberigede biblioteker

1. Kør 1 µl af de forudberigede biblioteker ved hjælp af din foretrukne fluorescensbaserede kvantifikationsmetode med dsDNA-interkalerende farvestof.
 - For 50-1000 ng gDNA af høj kvalitet kan du forvente et forudberiget biblioteksudbytte \geq 500 ng.
 - For 50-1000 ng gDNA ekstraheret fra FFPE kan du forvente et forudberiget biblioteksudbytte på 500-6000 ng, afhængigt af kvaliteten af den initiale prøve.

BEMÆRK! For kvantificeringsmetoder med forskellig bias skal du kvalificere kvantificeringsmetoden til denne arbejdsgang. Koncentrationsresultater kan variere afhængigt af den anvendte metode.

Puljeoprettelse af forudberigede biblioteker i lige stor koncentration

Anvend nedenstående tabel til at klarlægge den påkrævede DNA-masse pr. bibliotek til berigelse i henhold til prøvetype og berigelsespleksitet. Der gives ingen garanti for optimale berigelsesudbytter og optimal analyseydelse ved brug af lavere forudberigede biblioteksudbytter end anbefalet.

Den totale DNA-masse i berigelsesreaktionen bør ikke overstige 6000 ng.

Prøveinput	Berigelsespleksitet	DNA-masse pr. bibliotek (ng)	Total DNA-biblioteksmasse (ng)
gDNA af høj kvalitet	12	250-500	3000-6000
gDNA ekstraheret fra FFPE	1	200	200

1. Registrer indekserne for de biblioteker, som du planlægger at pulje på dette trin.
2. Beregn den volumen, der skal føjes til berigelsesreaktionen for at opnå den påkrævede DNA-masse, ud fra koncentrationen af hvert bibliotek.
 - gDNA af høj kvalitet: Beregn den nødvendige biblioteksvolumen til 250-500 ng input.
 - gDNA ekstraheret fra FFPE: Beregn den nødvendige biblioteksvolumen til 200 ng input.

3. Tilføj den beregnede volumen for hvert bibliotek i den samme brønd på PCR-pladen.
4. Hvis du bruger gDNA af høj kvalitet, skal du foretage en af følgende handlinger baseret på den totale volumen af puljede forudberigede biblioteker:
 - Hvis den forudberigede biblioteksvolumen = 30 µl, skal du fortsætte til [Hybridisering af prober på side 36](#).
 - Hvis den forudberigede biblioteksvolumen < 30 µl, skal du tilføje RSB for at opnå en totalvolumen på 30 µl.
 - Hvis den forudberigede biblioteksvolumen > 30 µl, skal du anvende en perlebaseret metode eller en vakuumkoncentrator til at koncentrere den puljede prøve. Tilføj RSB til den koncentrerede puljede prøve for at opnå en totalvolumen på 30 µl.
5. Hvis du bruger gDNA ekstraheret fra FFPE, skal du gennemføre en af følgende handlinger baseret på den totale volumen af puljede forudberigede biblioteker.
 - Hvis den forudberigede biblioteksvolumen = 7,5 µl, skal du fortsætte til [Hybridisering af prober på side 36](#).
 - Hvis den forudberigede biblioteksvolumen < 7,5 µl, skal du tilføje RSB for at opnå en totalvolumen på 7,5 µl.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper: Forsegel pladen, og opbevar den ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

Puljeoprettelse efter volumen

Hvis inputtet er 50-1000 ng gDNA, er det ikke nødvendigt at kvantificere og normalisere individuelle biblioteker, der bliver genereret i det samme eksperiment.

For at opnå optimal ydelse skal du kun pulje forudberigede biblioteksprøver, der er blevet klargjort af den samme bruger med det samme reagensbatch og den samme indeksadapterplade.

1. Registrer indekserne for de biblioteker, som du planlægger at pulje på dette trin.
2. Kombiner følgende forudberigede biblioteks- og RSB-voluminer til din berigelsespleksitet i samme brønd på en ny PCR-plade.
Den opnåede volumen er 30 µl.

Berigelsespleksitet *	Volumen af hvert forudberiget bibliotek (µl)	RSB-volumen (µl)
1-plex	14	16
2-plex	14	2
3-plex	10	0
4-plex	7,5	0
5-plex	6	0

Berigelsespleksitet *	Volumen af hvert forudberiget bibliotek (µl)	RSB-volumen (µl)
6-plex	5	0
7-plex	4,2	0,6
8-plex	3,7	0,4
9-plex	3,3	0,3
10-plex	3	0
11-plex	2,7	0,3
12-plex	2,5	0

*For oplysninger om pleksiteter, som ikke er standard, (2-plex til 11-plex), henvises til [Procedurens begrænsninger på side 2](#).

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper: Forsegl pladen, og opbevar den ved -25 °C til -15 °C i op til 30 dage.

[Valgfrit] Kvalificering af forudberigede biblioteker

Hvis du opretter puljer efter volumen, skal du kvantificere de forudberigede biblioteker ved hjælp af en fluorometribaseret metode med dsDNA-interkalerende farvestof. Anvend en DNA-fragmentanalyseenhed med det relevante fragmentanalysekit til kvalificering af de forudberigede biblioteker.

Anvend 1 µl i alt til bibliotekskvalificering. Forudberigede biblioteker er tilstrækkeligt koncentrerede til, at der kan foretages små fortyndinger med henblik på kvantificering eller fragmentanalyse.

Hybridisering af prober

Dette trin binder målrettede regioner i DNA'et med indfangningsprober.

Reagenserne i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatible med DNA-berigelsesoligonukleotidpaneler fra både Illumina og tredjeparter. Du kan finde oplysninger om de påkrævede specifikationer for tredjepartspaneler under [Krav til berigelsesprobepaneler på side 10](#).

Materialer

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (blå hætte)
- Berigelsesprobepanel
- PCR-plade med 96 brønde
- Selvklæbende forsegling
- Klargør følgende til senere procedure:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (ravgul hætte)

Om reagenser

- NHB2 danner bundfald og skiller under opbevaring.
- Berigelsesprobepanel henviser til det valgte berigelsesoligonukleotidpanel fra Illumina-leverandør.

Klargøring

1. Klargør følgende materialer:

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
EHB2	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur. Bland på vortexblander. Hvis du bemærker krystaller eller uklarhed, skal du gentage blandingen på vortexblander eller pipettere op og ned, indtil opløsningen er klar.
Berigelses- probepanel	-25 °C til -15 °C (Illumina)	Lad paneler fra både Illumina og tredjeparter opnå rumtemperatur. Bland på vortexblander.
NHB2 (blå hætte)	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Ved opnåelse af rumtemperatur forvarmes den i en mikroprøveinkubator til den samme temperatur som den probe, du anvender, i 5 minutter. Bland på vortexblander ved maksimal hastighed 3 gange a 10 sekunder for at genopløse. Centrifuger kortvarigt. Pipetter op og ned fra bunden af røret. Hvis du bemærker krystaller eller uklarhed, skal du gentage blandingen på vortexblander eller pipettere op og ned, indtil opløsningen er klar. Anvend den, mens den er varm, for at undgå dannelse af bundfald igen.
SMB3*	2 °C til 8 °C	Hvis du fortsætter til næste procedure umiddelbart efter holdeperioden på 90 minutter i HYB-programmet, skal den bringes til rumtemperatur i mindst 2 timer før opstart af HYB-programmet.
EEW* (ravgult rør)	-25 °C til -15 °C	Hvis du fortsætter til næste procedure umiddelbart efter holdeperioden på 90 minutter i HYB-programmet, skal den bringes til rumtemperatur i mindst 2 timer før opstart af HYB-programmet. Ved opnåelse af rumtemperatur forvarmes den i en mikroprøveinkubator til den relevante hybridiserings- og indfangningstemperatur i 30 minutter, før HYB-programmet slutter.

* Hvis du stopper inden den næste procedure, skal du vente med at klargøre denne reagens, til du når til den procedure.

2. Gem følgende HYB-program på termocyklere ved brug af det relevante antal cyklusser, som angivet i [Tabel 3](#).
- Vælg funktionen til præopvarmning af låget, og indstil til 100 °C
 - Indstil reaktionsvoluminen
 - [gDNA af høj kvalitet] 100 µl
 - [gDNA ekstraheret fra FFPE] 25 µl
 - 98 °C i 5 minutter
 - X cyklusser a 1 minut, startende ved 98 °C for den første cyklus, hvorefter temperaturen nedsættes med 2 °C pr. cyklus
 - Hold ved den relevante temperatur i 90 minutter:
 - [gDNA ekstraheret fra FFPE] 58 °C
 - [80 mer probepaneller] 58 °C
 - [Somatisk variationsbestemmelse] 58 °C
 - [Alle andre] 62 °C

Total kørselstid er ~115 minutter.

Tabel 3 Cyklusantal pr. prøve eller panel

Prøve- og paneltype	Antal cyklusser (X)
gDNA ekstraheret fra FFPE (uanset paneltype)	20
80 mer probepaneller (uanset prøvetype)	20
Somatisk variationsbestemmelse	20
Alle andre prøver og paneller	18

Fremgangsmåde

1. **[gDNA af høj kvalitet]** Tilføj følgende reagenser *i den angivne rækkefølge* til hvert puljet bibliotek i PCR-pladen.
Opret ikke en masterblanding. Oprettelse af en masterblanding med NHB2 og EHB2 påvirker berigelsesydelsen negativt.
 - NHB2 (blå hætte) (50 µl)
 - Berigelsesprobepanel (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. **[gDNA af høj kvalitet]** Bland hver brønd ved at pipettere 10 gange med en pipette, der er indstillet til 90 µl.
3. **[gDNA ekstraheret fra FFPE]** Tilføj følgende reagenser *i den angivne rækkefølge* til hvert puljet bibliotek i PCR-pladen.
Opret ikke en masterblanding. Oprettelse af en masterblanding med NHB2 og EHB2 påvirker berigelsesydelsen negativt.

- NHB2 (blå hætte) (12,5 µl)
 - Berigelsesprobepanel (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. [gDNA ekstraheret fra FFPE] Bland hver brønd ved at pipettere 10 gange med en pipette, der er indstillet til 20 µl.
 5. Forsegl og centrifuger pladen ved 280 × g i 10 sekunder.
 6. Anbring prøvepladen på den forudprogrammerede termocykler, og kørs HYB-programmet.
 7. Fortsæt straks til næste procedure, når HYB-programmets temperaturholdeperiode slutter.

**FORSIGTIG**

Der sker bundfældning, hvis hybridiseringsreaktionstemperaturen falder under rumtemperaturen.

Indfangning af hybridiserede prober

På dette trin bliver der anvendt Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) til at indfangne prober hybridiseret til de målrettede interesseområder.

Materialer

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (ravgul hætte)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5 ml mikrocentrifugerør
- MIDI-plade med 96 brønde
- PCR-plade med 96 brønde
- Selvklæbende forsegling
- Magnetisk holder til MIDI-plade
- Klargør følgende til senere procedure:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Om reagenser

- EEW
 - Sørg for, at EEW er blevet optøet ved rumtemperatur i mindst 2 timer inden forvarmning på en mikroprøveinkubator.
 - Sørg for, at EEW er blevet opvarmet i en mikroprøveinkubator i 30 minutter, før HYB-programmet slutter.
 - Lad EEW være i mikroprøveinkubatoren, når den ikke er i brug. EEW skal forblive opvarmet igennem protokollen.
 - Kan være uklar efter opnåelse af rumtemperatur.
 - Kan være gul.
- SMB3
 - SMB3 skal have rumtemperatur før brug.

Klargøring

1. Klargør følgende materialer.

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
SMB3	2 °C til 8 °C	Lad stå i 2 timer for at opnå rumtemperatur. Vend op og ned, og bland derefter på vortexblander indtil fuld genopløsning.
EEW (ravgult rør)	-25 °C til -15 °C	Efter 2 timers inkubation ved rumtemperatur forvarmes den i en mikroprøveinkubator til den relevante hybridiserings- og indfangningstemperatur i 30 minutter, før HYP-programmet slutter.
EE1	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur, og bland derefter på vortexblander.
HP3	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur, og bland derefter på vortexblander.
ET2	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur. Bland på vortexblander.
EPM	-25 °C til -15 °C	Optø på is i én time. Vend op og ned for at blande, og centrifuger derefter kortvarigt. Sæt til side på is.
PPC	-25 °C til -15 °C	Optø på is i én time. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt. Sæt til side på is.

2. Forvarm en mikroprøveinkubator med en MIDI-varmeblokindsats for at inkubere prøvepladen til en af følgende temperaturer. Der kan anvendes en anden valgfri mikroprøveinkubator til forvarmning af EEW. Lad EEW hvile oven på MIDI-varmeblokindsatsen.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer pr. probepanel] 58 °C
 - [Somatisk variationsbestemmelse] 58 °C
 - [Alle andre] 62 °C

Fremgangsmåde

Indfangning

1. Tilføj SMB3 til den tilsvarende brønd på en ny MIDI-plade, som følger.
 - [gDNA af høj kvalitet] Tilføj 250 µl SMB3.
 - [gDNA ekstraheret fra FFPE] Tilføj 62,5 µl SMB3.
2. Overfør ved hjælp af en pipette, der er indstillet til 100 µl for gDNA af høj kvalitet eller 25 µl for FFPE, hvert puljet bibliotek fra PCR-pladen med 96 brønde til den tilsvarende brønd på den nye MIDI-plade .
3. Forseg og omryst pladen ved 1200 o/m i 4 minutter.
4. I tilfælde af stænk centrifugeres pladen kortvarigt.
5. Anbring pladen med de puljede biblioteker på MIDI-varmebloksindsatsen på mikroprøveinkubatoren, under EEW-røret, luk låget, og inkuber derefter i 15 minutter ved den relevante temperatur:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer probepanel] 58 °C
 - [Somatisk variationsbestemmelse] 58 °C
 - [Alle andre] 62 °C
6. Fjern pladen med de puljede biblioteker, og centrifuger den ved 280 × g i 30 sekunder.
7. Anbring den omgående på en magnetisk MIDI-pladeholder, og vent, til væsken er klar (2 minutter).
8. [gDNA af høj kvalitet] Fjern og kassér ved hjælp af en pipette, der er indstillet til 200 µl, al supernatant fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
9. [gDNA ekstraheret fra FFPE] Fjern og kassér ved hjælp af en pipette, der er indstillet til 90 µl, al supernatant fra hver brønd uden at forstyrre perlepelleten.
10. Fjern og kassér al resterende supernatant.

Vask

1. Fjern pladen fra den magnetiske holder.
2. [gDNA af høj kvalitet] Fjern hurtigt EEW fra mikroprøveinkubatoren, og tilføj 200 µl til hver brønd.
3. [gDNA ekstraheret fra FFPE] Fjern hurtigt EEW fra mikroprøveinkubatoren, og tilføj 50 µl til hver brønd.
4. Returner ubrugt EEW til mikroprøveinkubatoren, og hold det opvarmet.
5. Forseg og omryst ved 1800 o/m i 4 minutter.
6. Anbring prøvepladen på MIDI-varmebloksindsatsen på mikroprøveinkubatoren, under EEW-røret, luk låget, og inkuber derefter i 5 minutter ved den relevante temperatur:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer probepaneller] 58 °C
 - [Somatisk variationsbestemmelse] 58 °C

- [Alle andre paneler] 62 °C
7. Anbring den omgående på en magnetisk MIDI-pladeholder, og vent, til væsken er klar (2 minutter).
 8. Fjern og bortskaf al supernatant fra hver brønd ved hjælp af en pipette, der er indstillet til 200 µl for gDNA af høj kvalitet, eller til 50 µl for FFPE.
 9. Gentag trin 1-8 to gange, dvs. tre vaske i alt.

Overførsel af vask

1. Fjern pladen fra den magnetiske holder.
2. [gDNA af høj kvalitet] Fjern hurtigt EEW fra mikroprøveinkubatoren, og tilføj 200 µl til hver brønd.
3. [gDNA ekstraheret fra FFPE] Fjern hurtigt EEW fra mikroprøveinkubatoren, og tilføj 50 µl til hver brønd.
4. Forsegl og omryst ved 1800 o/m i 4 minutter. I tilfælde af stænk reduceres hastigheden til 1600 o/m.
5. Overfør den genopløste perleopløsning til en ny MIDI-plade.
Noget prøvemateriale kan forblive i brøndene.



FORSIGTIG

Overførsel af reagenset minimerer overførsel af restreagenser, der kan hæmme downstream-PCR.

6. Anbring prøvepladen på MIDI-varmeblokindsatsen på mikroprøveinkubatoren, luk låget, og inkuber derefter i 5 minutter ved den relevante temperatur:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer probepaneler] 58 °C
 - [Somatisk variationsbestemmelse] 58 °C
 - [Alle andre] 62 °C
7. Anbring den omgående på en magnetisk MIDI-pladeholder, og vent, til væsken er klar (2 minutter).
8. Fjern og bortskaf al supernatant fra hver brønd ved hjælp af en pipette, der er indstillet til 200 µl for gDNA af høj kvalitet, eller til 50 µl for FFPE.
9. Centrifuger pladen ved 280 × g i 30 sekunder.
10. Placer pladen på en magnetisk MIDI-pladeholder i 10 sekunder.
11. Brug en 20 µl pipette til at fjerne og kassere resterende væske fra hver brønd.
12. Fortsæt straks til [Eluer på side 43](#) for at undgå overtørring af perlerne og tab af biblioteksudbytte.

Eluer

1. Bland følgende voluminer for at klargøre en Elution Master Mix. Gang hver volumen med antallet af puljede biblioteker, der skal behandles.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Yderligere reagensoverskud er inkluderet i voluminen.
2. Bland på vortexblander, og centrifugér derefter kortvarigt.
3. Fjern MIDI-pladen fra den magnetiske holder.
4. Tilføj 23 µl Elution Master Mix til hver brønd.
5. Forsegl og omryst pladen ved 1800 o/m i 2 minutter.
6. Inkuber pladen ved rumtemperatur i 2 minutter.
7. Centrifugér ved $280 \times g$ i 30 sekunder.
8. Anbring den på en magnetisk MIDI-pladeholder, og vent, til væsken er klar (2 minutter).
9. Overfør 21 µl supernatant fra MIDI-pladen til den tilsvarende brønd på en ny PCR-plade med 96 brønde.
10. Kassér MIDI-pladen.
11. Tilføj 4 µl ET2 til hver brønd indeholdende 21 µl supernatant.
12. Indstil pipetten til 20 µl, og pipetter langsomt hver brønd 10 gange for at blande.
13. Forsegl pladen, og centrifugér derefter ved $280 \times g$ i 10 sekunder.
14. Inkuber pladen ved rumtemperatur i 1 minut.

Amplificering af beriget bibliotek

På dette trin anvendes der PCR til at amplificere det berigede bibliotek.

Materialer

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Selvklæbende forsegling

Klargøring

1. Klargør følgende materialer:

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
EPM	-25 °C til -15 °C	Optø ved 4 °C eller på is i én time. Vend op og ned for at blande, og centrifuger derefter kortvarigt. Sæt til side på is.
PPC	-25 °C til -15 °C	Optø ved 4 °C på is i én time. Bland på vortexblander, og centrifuger så kortvarigt. Sæt til side på is.

2. Gem følgende AMP-program på termocyklere ved brug af det relevante antal PCR-cykler, som angivet i følgende tabel.

- Vælg funktionen til præopvarmning af låget, og indstil til 100 °C
- Indstil reaktionsvoluminen til 50 µl
- 98 °C i 45 sekunder
- (X) cyklusser ved:
 - 98 °C i 30 sekunder
 - 60 °C i 30 sekunder
 - 72 °C i 30 sekunder
- 72 °C i 5 minutter
- Hold ved 10 °C

Total kørselstid er ~35 minutter.

Prøve- og paneltype	(X) Cyklusser
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) for high quality gDNA	10
Illumina Exome Panel (CEX) for FFPE	12
Alle andre prøver og paneler	12 ¹²³⁴

¹ Kan justeres op til 15 cyklusser for små tredjepartspaneler ved hjælp af efterfølgende optimering. Hvis der anvendes FFPE, kan antallet af cyklusser justeres op til 17.

² Kan justeres op til 17 cyklusser for tredjepartspaneler, som kun har 500 prøber. Hvis der anvendes FFPE, kan antallet af cyklusser justeres op til 19.

³ Kan justeres op til 14 cyklusser for FFPE-prøver.

⁴ Øgning af antallet af PCR-cykler kan resultere i en højere dubletrate og mindre fragmentstørrelser for FFPE-prøver.

Fremgangsmåde

1. Tilføj 5 µl PPC til hver brønd.

2. Tilføj 20 µl EPM til hver brønd.
3. Forsegl og omryst pladen ved 1200 o/m i 1 minut.
4. Centrifuger pladen ved 280 × g i 10 sekunder.
5. Anbring på den forudprogrammerede termocykler, og kørs AMP-programmet.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper: Opbevares ved 2 °C til 8 °C i op til to dage eller efterlades i termocykleren i op til 24 timer.

Oprensning af amplificeret, beriget bibliotek

På dette trin anvendes der Cleanup Beads til at oprense det berigede bibliotek og fjerne uønskede produkter.

Materialer

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Nyklargjort 80 % ethanol (EtOH)
- Selvklæbende forseglinger
- MIDI-plade med 96 brønde
- PCR-plade med 96 brønde
- Magnetisk holder til MIDI-plade

Om reagenser

- Cleanup Beads
 - Bland på vortexblander inden hver brug.
 - Bland hyppigt på vortexblander for at sikre, at perlerne er jævnt fordelt.
 - Skal opsuges og dispenseres langsomt på grund af opløsningens viskositet.

Klargøring

1. Klargør følgende materialer.

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
CB	Rumtemperatur	Blandes på vortexblander og ved at vende op og ned, indtil væskens farve er homogen.
RSB	2 °C til 8 °C	Lad henstå for at opnå rumtemperatur. Bland på vortexblander.

2. Klargør frisk 80 % EtOH fra absolut ethanol.

Fremgangsmåde

1. Centrifuger PCR-pladen ved $280 \times g$ i 10 sekunder.
2. Bland CB på vortexblander 3 gange i 10 sekunder, og vend den derefter op og ned.
3. Tilføj 40,5 μl CB til hver brønd på en ny **MIDI-plade**.
4. Overfør 45 μl fra hver brønd på PCR-pladen til den tilsvarende brønd på MIDI-pladen.
5. Forsegl og omryst pladen ved 1800 o/m i 1 minut.
6. Inkuber MIDI-pladen ved rumtemperatur i 5 minutter.
7. Centrifuger ved $280 \times g$ i 10 sekunder.
8. Anbring den på en magnetisk MIDI-pladeholder, og vent, til væsken er klar (5 minutter).
9. Fjern og bortskaf ved hjælp af en pipette, der er indstillet til 95 μl , al supernatant fra hver brønd.
10. Vask to gange, som følger.
 - a. Mens pladen står på den magnetiske holder, tilsættes 200 μl frisk 80 % EtOH uden at blande.
 - b. Inkuber i 30 sekunder.
 - c. Fjern og kassér supernatant uden at forstyrre perlerne.
11. Lad lufttørre på den magnetiske holder i 5 minutter.
12. Under lufttørring bruges en 20 μl pipette til at fjerne og kassere resterende EtOH fra hver brønd.
13. Fjern pladen fra magnetholderen, og tilføj 32 μl RSB til hver brønd.
14. Forsegl og omryst pladen ved 1800 o/m i 1 minut.
15. Inkuber pladen ved rumtemperatur i 5 minutter.
16. Centrifuger ved $280 \times g$ i 10 sekunder.
17. Anbring den på en magnetisk MIDI-pladeholder, og vent, til væsken er klar (2 minutter).
18. Overfør 30 μl supernatant fra MIDI-pladen med 96 brønde til den tilsvarende brønd på en ny PCR-plade.
19. Kassér MIDI-pladen.

SIKKERT STOPTIDSPUNKT

Hvis du stopper, skal du forsegle pladen og opbevare den ved $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ i op til 7 dage.

Kontrol af berigede biblioteker

Brug en fluorescensbaseret metode med interkalerende farvestof til at kvantificere dobbeltstrenget gDNA-input. Undgå metoder, der måler total nukleinsyre, såsom NanoDrop eller andre UV-absorbansmetoder.

1. Kør 1 μl af de berigede biblioteker ved hjælp af din kvantificeringsmetode.

BEMÆRK! Den totale probemolaritet påvirker biblioteksudbyttet efter berigelse proportionalt.

Forvent en gennemsnitlig fragmentstørrelse på 125-235 bp og fordeling af DNA-fragmenter med en størrelse fra ~200 bp til ~1000 bp.

Fortynding af biblioteker til startkoncentration

På dette trin fortyndes bibliotekerne til startkoncentrationen for dit sekventeringssystem. Dette trin er det første i en serie fortynding. Efter fortynding til startkoncentrationen er bibliotekerne klar til denaturering og fortynding til den endelige overførselskoncentration.

Til sekventering anbefaler Illumina, at du konfigurerer en paired end-kørsel med 151 cyklusser pr. læsning (2 × 151) og 10 cyklusser pr. indekslæsning, uanset hvilket berigelsesprobepanel du anvender. Hvis du ønsker færre overlappede læsninger eller mindre rå dækning, kan du sekventere ned til 2 × 126 eller 2 × 101.

1. Beregn molaritetsværdien for biblioteket eller de puljede biblioteker ved hjælp af følgende formel.

- For biblioteker, der er kvalificeret på en DNA-fragmentanalyseenhed, anvendes den gennemsnitsstørrelse, der er opnået for biblioteket.
- Ved alle andre kvalificeringsmetoder anvendes der 350 bp som gennemsnitlig biblioteksstørrelse.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{gennemsnitlig biblioteksstørrelse (bp)}} = \text{Molaritet (nM)}$$

Eksempel: Hvis din bibliotekskoncentration er 20 ng/μl, og gennemsnitsstørrelsen er 350 bp, er molaritetsværdien 86,58 nM.

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

2. Ved hjælp af molaritetsværdien beregnes de nødvendige RSB- og biblioteksvoluminer til fortynding af bibliotekerne til startkoncentrationen for dit system.

Sekventeringssystem	Påkrævet minimal biblioteksvolumen (μl)	Startkoncentration (nM)	Endelig overførselskoncentration (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) eller 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM er startkoncentrationen for en endelig overførselskoncentration på 350 pM. Juster om nødvendigt den endelige overførselskoncentration ved hjælp af følgende tabel.

Endelig overførselskoncentration (pM)	Koncentration for det puljede bibliotek (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1

Endelig overførselskoncentration (pM)	Koncentration for det puljede bibliotek (nM)
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Fortyndning af biblioteker med RSB:

- **Biblioteker, der er kvantificeret som en multiplekseret bibliotekspulje** – Fortynd puljen til startkoncentrationen for dit system.
- **Biblioteker, der er kvantificeret individuelt** – Fortynd hvert bibliotek til startkoncentrationen for dit system. Tilføj 10 µl af hvert fortyndet bibliotek til et rør for at oprette en multiplekseret bibliotekspulje.

4. Følg anvisningerne vedrørende denaturering og fortyndning for dit system for at fortynde til den endelige overførselskoncentration.

- For NextSeq 550Dx System henvises der til [Klargøring til sekventering på NextSeq 550Dx på side 48](#).
- For MiSeqDx System henvises der til [Klargøring til sekventering på MiSeqDx på side 50](#).
- For NovaSeq 6000Dx System henvises der til [NovaSeq 6000Dx Sequencing Preparation på side 51](#).

De endelige overførselskoncentrationer udgør udgangspunkter og generelle retningslinjer. Optimer koncentrationerne til din arbejdsgang og kvantificeringsmetode over de efterfølgende sekventeringskørsler eller ved hjælp af flowcelletitrering.

Klargøring til sekventering på NextSeq 550Dx

Brug nedenstående instruktioner til denaturering og fortyndning af biblioteker, der skal sekventeres på NextSeq 550Dx-sekventeringssystemet.

Materialer

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

Klargøring

Klargør en *frisk* fortyndning af 0,2 N NaOH for at denaturere biblioteker til sekventering. For at undgå, at små pipetteringsfejl påvirker den endelige NaOH-koncentration, klargøres der ekstra volumen.

**FORSIGTIG**

Friskt fortyndet 0,2 N NaOH er afgørende for denatureringsprocessen. Forkert denaturering kan reducere udbytte.

1. Kombiner følgende volumener i et mikrocentrifugerør for at fortynde 1 N NaOH til 0,2 N NaOH:
1. Klargør følgende materialer.

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
HT1	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Opbevar ved 2 °C til 8 °C, indtil du er klar til at fortynde de denaturerede biblioteker.

2. Bland følgende volumener i et mikrocentrifugerør for at klargøre en frisk fortynding af NaOH:
 - Vand godkendt til laboratorier (800 µl)
 - 1 N NaOH (200 µl)Resultatet er 1 ml 0,2N NaOH.
3. Vend op og ned på røret gentagne gange for at blande.
4. Kombiner følgende volumener i et mikrocentrifugerør for at klargøre 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.
 - Vand godkendt til laboratorier (800 µl)
 - 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)Resultatet er 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

BEMÆRK! Behold hættten på røret. Anvend den friske fortynding inden for **12 timer**.

Denaturering af biblioteker

1. Kombiner følgende volumener af bibliotek og frisk fortyndet 0,2 N NaOH i et mikrocentrifugerør.
 - 10 µl bibliotek
 - 10 µl 0,2N NaOH
2. Bland kortvarigt på vortexblander, og centrifuger derefter ved 280 × g i 1 minut.
3. Inkuber ved rumtemperatur i 5 minutter.
4. Tilføj 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Fortynding af denaturerede biblioteker til 20 pM

1. Tilføj 970 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til røret med denaturerede biblioteker. Resultatet er et denatureret bibliotek på 20 pM.
2. Bland kortvarigt på vortexblander, og centrifuger derefter ved 280 × g i 1 minut.
3. Anbring 20 pM bibliotekerne på is, indtil du er klar til at fortsætte til den endelige fortynding.

Fortynding af biblioteker til overførselskoncentration

1. Tilføj følgende voluminer for at fortynde den denaturerede 20 pM biblioteksopløsning til 1,2 pM.
 - Denatureret biblioteksopløsning (78 µl)
 - HT1, der er afkølet på forhånd (1222 µl)Den totale volumen er 1,3 ml ved 1,2 pM.
2. Vend op og ned for at blande, og pulscentrifuger.
3. Fortsæt til sekventering. Du kan finde instruktioner i *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet)* (dokumentnr. 1000000009513).

Klargøring til sekventering på MiSeqDx

Brug nedenstående instruktioner til denaturering og fortynding af biblioteker, der skal sekventeres på MiSeqDx-sekventeringssystemet.

Materialer

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1N NaOH

Klargøring

Klargør en *frisk* fortynding af 0,2 N NaOH for at denaturere biblioteker til sekventering. For at undgå, at små pipetteringsfejl påvirker den endelige NaOH-koncentration, klargøres der ekstra volumen.



FORSIGTIG

Friskt fortyndet 0,2 N NaOH er afgørende for denatureringsprocessen. Forkert denaturering kan reducere udbytte.

1. Kombiner følgende volumener i et mikrocentrifugerør for at fortynde 1 N NaOH til 0,2 N NaOH:
1. Klargør følgende materialer.

Artikel	Opbevaring	Instruktioner
HT1	-25 °C til -15 °C	Optø ved rumtemperatur. Opbevar ved 2 °C til 8 °C, indtil du er klar til at fortynde de denaturerede biblioteker.

2. Bland følgende voluminer i et mikrocentrifugerør for at klagøre en frisk fortynding af NaOH:
 - Vand godkendt til laboratorier (800 µl)
 - 1 N NaOH (200 µl)Resultatet er 1 ml 0,2N NaOH.

BEMÆRK! Behold hættten på røret. Anvend den friske fortynding inden for **12 timer**.

Denaturering af et bibliotek på 4 nM

- Kombiner følgende voluminer i et mikrocentrifugerør.
 - Bibliotek på 4 nM (5 µl)
 - 0,2 N NaOH (5 µl)
- Bland kortvarigt på vortexblander, og centrifuger derefter ved 280 × g i 1 minut.
- Inkuber ved rumtemperatur i 5 minutter.
- Tilføj 990 µl HT1, der er afkølet på forhånd, til røret med det denaturerede bibliotek. Resultater er 1 ml denatureret bibliotek på 20 pM.

Fortynding af denatureret 20 pM bibliotek

- Fortynd til den ønskede koncentration ved hjælp af følgende voluminer.

Koncentration	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM bibliotek	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
HT1, der er afkølet på forhånd	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- Vend op og ned for at blande, og pulscentrifuger.
- Fortsæt til sekventering. Du kan finde instruktioner i *MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (Oversigtsvejledning til MiSeqDx-instrument med MOS v4) (dokumentnr. 1000000157953)*.

NovaSeq 6000Dx Sequencing Preparation

Brug nedenstående instruktioner til denaturering og fortynding af biblioteker, der skal sekventeres på NovaSeq 6000Dx-sekventeringssystemet.

Materialer

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

Klargøring

Klargør en *frisk* fortynding af 0,2 N NaOH for at denaturere biblioteker til sekventering. For at undgå, at små pipetteringsfejl påvirker den endelige NaOH-koncentration, klargøres der ekstra volumen.

**FORSIGTIG**

Friskt fortyndet 0,2 N NaOH er afgørende for denatureringsprocessen. Forkert denaturering kan reducere udbytte.

1. Kombiner følgende volumener i et mikrocentrifugerør for at fortynde 1 N NaOH til 0,2 N NaOH:

Tabel 4 S2-tilstand

Reagens	Volumen for én flowcelle (μ l)	Volumen for to flowceller (μ l)
Vand godkendt til laboratorier	40	80
Opbevar 1 N NaOH	10	20

Disse volumener resulterer i 50 μ l 0,2 N NaOH for én flowcelle eller 100 μ l 0,2 N NaOH for to flowceller.

Tabel 5 S4-tilstand

Reagens	Volumen for én flowcelle (μ l)	Volumen for to flowceller (μ l)
Vand godkendt til laboratorier	80	160
Opbevar 1 N NaOH	20	40

Disse volumener resulterer i 100 μ l 0,2 N NaOH for én flowcelle eller 200 μ l 0,2 N NaOH for to flowceller.

2. Vend op og ned på røret gentagne gange for at blande, eller bland det grundigt i en vortexblander.

BEMÆRK! Behold hættten på røret. Anvend den friske fortynding inden for **12 timer**.

Opret en normaliseret bibliotekspulje

Overførselskoncentrationen kan varieres afhængigt af klargøring, kvantificering og normaliseringsmetoder for biblioteket.

Brug følgende instruktioner til at normalisere bibliotekerne til den passende koncentration, og opret så en pulje. Biblioteker, som er sekventeret på samme flowcelle, skal kombineres i en enkelt normaliseret pulje.

BEMÆRK! Det maksimale antal prøver, som kan køres pr. bane med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, er 192. Denne grænse skyldes det samlede antal UD-indekser i sæt A og B.

Normaliser biblioteker til puljeoprettelse

1. Fastslå den påkrævede koncentration for det puljede bibliotek baseret på den ønskede endelige overførselskoncentration.

- For en endelig overførselskoncentration på 350 pM er den nødvendige koncentration for det puljede bibliotek 1,75 nM.
 - For at bestemme koncentrationen af det puljede bibliotek for en anden endelig overførselskoncentration henvises der til [Fortynding af biblioteker til startkoncentration på side 47](#).
2. Normaliser biblioteker til den ønskede koncentration for det puljede bibliotek ved hjælp af 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
For hjælp med fortynding af biblioteker til den passende koncentration henvises der til [Pooling Calculator](#) (Puljeberegner) på Illuminas websted.

Anbefalede overførselskoncentrationer

Den optimale DNA-overførselskoncentration afhænger af bibliotekstypen og indsatsstørrelsen. Højere overførselskoncentrationer kan være nødvendige for biblioteker > 450 bp.

Lav pulje a normaliserede biblioteker, og tilføj valgfri PhiX-kontrol

1. Kombiner det passende volumen af hvert normaliseret bibliotek i et nyt mikrocentrifugerør for at skabe et af følgende endelige volumener:

Tilstand	Endeligt volumen (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Valgfrit]** Tilføj 1 % ikke-denatureret PhiX> som følger.
- Fortynd 10 nM PhiX til 2,5 mM ved hjælp af 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
 - Føj det passende volumen ikke-denatureret 2,5 nM PhiX til røret for ikke-denatureret bibliotekspulje.

Tilstand	Ikke-denatureret 2,5 nM PhiX (µl)	Ikke-denatureret bibliotekspulje (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Når du tilføjer PhiX, er 1 % den anbefalede mængde for velbalancerede biblioteker. Biblioteker med lav diversitet kan kræve mere. Kontakt Illuminas tekniske support for vejledning i brug af en PhiX-kontrol med biblioteker med lav diversitet.

Denaturer bibliotekspulje og valgfri PhiX-kontrol

1. Føj 0,2 N NaOH til røret for ikke-denatureret bibliotekspulje og valgfri PhiX som følger.

Flowcelle	0,2 N NaOH	Ikke-denatureret bibliotekspulje (µl)	Opnået volumen
S2	37	150	187 µl eller 187,9 µl med PhiX

Flowcelle	0,2 N NaOH	Ikke-denatureret bibliotekspulje (µl)	Opnået volumen
S4	77	310	387 µl eller 388,9 µl med PhiX

- Sæt hætte på, og bland kortvarigt på vortexblender.
- Centrifuger ved 280 × g i 1 minut.
- Inkuber ved rumtemperatur i 8 minutter for at denaturere.
- Tilføj 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 som følger for at neutralisere.

Tilstand	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Opnået volumen
S2	38	225 µl eller 225,9 µl med PhiX
S4	78	465 µl eller 466,9 µl med PhiX

- Sæt hætte på, og bland kortvarigt på vortexblender.
- Centrifuger ved 280 × g i 1 minut.
- Overfør hele volumen af denatureret bibliotek eller denatureret bibliotek og PhiX til NovaSeq 6000Dx-biblioteksrøret.
- Fortsæt til sekventering. Du kan finde instruktioner i *NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation* (Produktdokumentation for NovaSeq 6000Dx Instrument) (dokumentnr. 200010105).

Fejlfinding

Brug følgende tabel til fejlfinding af problemer i arbejdsgangen. Hvis en sekventeringskørsel eller klargøring af bibliotek mislykkes to gange, kan der være behov for yderligere fejlfinding. Kontakt Illuminas tekniske support.

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
Sekventeringskørslen lever ikke op til specifikationerne for kvalitetskontrol af kørslen	Bruger- eller laboratorieudstyrsfejl under analysearbejdsgangen	<p>Kvalificer berigede biblioteker for at sikre korrekt biblioteksudbytte og fordeling af fragmentstørrelser. Gentag klargøring af bibliotek fra ét af de følgende trin, afhængigt af hvor den formodede fejl i anvendelse eller udstyr opstod. Hvis årsagen er ukendt, eller hvis der opstod andre fejl, skal du kontakte Illuminas tekniske support for hjælp til fejlfinding af din kørsel.</p> <ul style="list-style-type: none">• Sekventer bibliotekerne igen. Se Klargøring til sekventering på NextSeq 550Dx på side 48, Klargøring til sekventering på MiSeqDx på side 50 eller NovaSeq 6000Dx Sequencing Preparation på side 51.• Berig bibliotekerne igen. Se Hybridisering af prober på side 36.• Start klargøring af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Brugervejledning på side 21.
	Problem med instrumentet	Kontakt Illuminas tekniske support.

Observation	Mulig årsag	Anbefalet handling
Fejl under FASTQ-generering eller generel fejl med sekventeringssystemet (f.eks. netværksfejl, fejl under tilføjelse/fjernelse af reagenser osv.)	Software- eller instrumentfejl	Se <i>Local Run Manager Software Guide (Vejledning til softwaren Local Run Manager)</i> (dokumentnr. 100000002702) for hjælp med FASTQ-generering, eller se <i>NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet)</i> (dokumentnr. 1000000009513), <i>MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (Oversigtsvejledning til MiSeqDx-instrument med MOS v4)</i> (dokumentnr. 1000000157953) eller <i>NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation (Produktdokumentation om NovaSeq 6000Dx-instrument)</i> (dokumentnr. 200010105). Kontakt Illuminas tekniske support for yderligere hjælp.
DNA-biblioteket genererer ikke tilstrækkeligt udbytte til sekventeringsoverførsel	Krav til prøveinput blev ikke overholdt	Sørg for relevant prøveinput, og gentag biblioteksklargøringen. Se Anbefalinger vedrørende prøveinput på side 18 .
	Fejl i anvendelse eller udstyr under analysearbejdsgangen	Gentag klarlægning af bibliotek fra ét af de følgende trin, afhængigt af hvor den formodede fejl i anvendelse eller udstyr opstod. Hvis årsagen er ukendt, eller hvis der opstod andre fejl, skal du kontakte Illuminas tekniske support for hjælp til fejlfinding af din kørsel. <ul style="list-style-type: none"> • Sekventer bibliotekerne igen. Se Klargøring til sekventering på NextSeq 550Dx på side 48, Klargøring til sekventering på MiSeqDx på side 50 eller NovaSeq 6000Dx Sequencing Preparation på side 51. • Berig bibliotekerne igen. Se Hybridisering af prober på side 36. • Start klarlægning af bibliotek fra starten af arbejdsgangen. Se Brugervejledning på side 21.
	Kravene til berigelsesprobepanelet er ikke blevet overholdt	Sørg for relevant berigelsesprobepanel, og gentag biblioteksklargøringen. Se Krav til berigelsesprobepaneller på side 10 .

Ydelsesegenskaber

Ydelsesegenskaber ved DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NovaSeq 6000Dx kan findes i *NovaSeq 6000Dx Instrument Package Insert (Indlægsseddel til NovaSeq 6000Dx Instrument)* (dokumentnr. 200025276).

Ydelse med helexompaneler

Exompanydelsen blev testet ved brug af det laveste (50 ng) og det højeste (1000 ng) anbefalede input for Coriell Cell Line gDNA NA12878 med et kendt sandhedssæt for detektion af kimbanevariationer (Coriell platinum genome). Exompanel 1 (45 Mb) og exompanel 2 (36,8 Mb) blev anvendt som repræsentative paneler. 24 tekniske replikater blev testet ved hjælp af Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen med exompanel 1 (45 Mb) i to 12-plex-berigelsesreaktioner. 12 tekniske replikater blev testet ved hjælp af Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen med exompanel 2 (36,8 Mb) i en enkelt 12-plex-berigelsesreaktion. De berigede biblioteker blev sekventeret på NextSeq 550Dx-sekventeringssystemet med DNA GenerateFATSQ Dx Local Run Manager-modulet.

I nedenstående tabel kan du se middelværdierne for sekundære målinger af sekventerings- og variationsbestemmelsesydelsen for de tekniske replikater, der blev testet med hvert panel.

Tabel 6 Analysens ydelse med to helexompaneler

Panel	Berigelse af 'padded' unik læsning	Ensartethed af dækning	Fragmentlængde, median	SNV-genbestemmelse ¹	SNV-præcision ²	Indelgenbestemmelse ¹	Indelpræcision ²
Exompanel 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Exompanel 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹Genbestemmelse = Positive/(sandt positive + falsk negative)

²Præcision = Sandt positive/(sandt positive + falsk positive)

Detektionsgrænse

Detektionsgrænsen er testet ved brug af referencestandardens Horizon HD799 DNA. HD799 består af moderat kompromitteret, formalin-behandlet DNA med kendte SNV'er i allelfrekvenser i intervallet 1-24,5 %. Der blev anvendt det laveste anbefalede DNA-input (50 ng), og detektionsraten for SNV'er med $\geq 5,0$ % variationsallelfrekvens (VAF) blev evalueret. 16 tekniske replikater blev testet ved hjælp af Illumina DNA Prep

with Enrichment Dx-analysen ved hjælp af FFPE-arbejdsgangen, beriget med et pan-cancer-berigelsespanel (1,94 Mb) i 16 (1-plex) berigelser, og derefter sekventeret på et NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulet.

Alle prøver bestod de panelspecifikke ydelsekrav, som vist i nedenstående tabel.

Tabel 7 Prøvens ydelse for detektionsgrænse

Panel	Variationsdetektionsrate for SNV'er med VAF \geq 5,0 %	Gennemsnit Ensartethed af dækning
Pan-cancer-berigelsespanel (1,94 Mb, 523 gener)	100%	99 %

Interfererende stoffer

Indvirkningen af potentielle interferenter er blevet vurderet i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ved at evaluere analysens ydelse under tilstedeværelse af interfererende stoffer.

Interferens i fuldblod

Acetaminophen (eksogent stof, lægemiddel), kreatinin og triglycerider (endogene metabolitter) blev testet ved at føje dem til humane fuldblodsprøver inden DNA-ekstraktion. For at vurdere interferens som følge af blodindsamling (short draw - blodprøver, der indeholder mindre end de anbefalede volumener) blev der også føjet EDTA til fuldblodsprøverne. For at vurdere interferens som følge af prøveklargøring blev der desuden føjet ethanol af molekylærbiologisk kvalitet til DNA, der var ekstraheret fra fuldblod.

Testkoncentrationerne pr. interferent kan ses i nedenstående tabel.

Tabel 8 Potentielt interfererende stoffer og koncentrationer testet i fuldblod

Teststof	Testkoncentration
Acetaminophen	15,6 mg/dl* Tre gange den højeste forventede koncentration efter en terapeutisk lægemiddeldosis.
Kreatinin	15 mg/dl* Højeste observerede koncentration i populationen.
Triglycerider	1,5 g/dl* Højeste observerede koncentration i populationen.
EDTA	6 mg/ml Tre gange den forventede koncentration i blod, indhentet i EDTA-rør.
Ethanol af molekylærbiologisk kvalitet	15 % v/v I eluatet efter DNA-ekstraktion.

* I henhold til CLSI EP37-ED1:2018

For hvert interfererende stof blev 12 tekniske replikater testet ved hjælp af Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen, beriget med exompanel 1 (45 Mb) i en enkelt (12-plex) berigelse, og derefter sekventeret på et NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulet.

For de testede stoffer opfyldte alle 12 prøver kravene til prøveydelse, og der blev ikke set nogen interferens med analysens ydelse.

Interferens i FFPE-væv

To kolorektale FFPE-prøver blev testet med og uden tilstedeværelse af hæmoglobin ved 0,1 mg pr. 10 µm FFPE-sektion for at afspejle et værst tænkeligt scenarie i form af 50 % FFPE-vævsprøvekontamination med højt hæmoglobinniveau i blodet. Prøverne blev testet ved hjælp af Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen ved brug af pan-cancer-berigelsespanel 1 (1,94 Mb) som repræsentativt panel ved single-plex-berigelser. De berigede biblioteker blev derefter sekventeret på et NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulet. Alle prøverne opfyldte kravene til prøveydelse, og det blev påvist, at hæmoglobin ikke interfererer med analysens ydelse.

For at vurdere interferens som følge af prøveklargøring blev der føjet to eksogene stoffer til DNA, der var ekstraheret fra en FFPE-vævsprøve med blærecancer. De testede eksogene stoffer bestod af almindeligt anvendte ekstraktionsopløsninger i forbindelse med DNA-ekstraktion og er angivet i nedenstående tabel med de testede mængder.

Teststofopløsningerne er kommercielt tilgængelige i kolonnebaserede DNA-isolationskit.

Tabel 9 Potentielt interfererende eksogene stoffer og koncentrationer testet i FFPE

Teststof	Testkoncentration (µl/30 µl eluat)
Afparaffineringsopløsning	113 x 10 ⁻⁶
Wash Buffer AW2	0,417

For hvert interfererende stof blev otte tekniske replikater testet ved hjælp af Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen, beriget med et pan-cancer-berigelsespanel (1,94 Mb) i single-plex-berigelser, og derefter sekventeret på et NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulet.

For begge de testede stoffer opfyldte alle otte prøver kravene til prøveydelse, og der blev ikke set nogen interferens med analysens ydelse.

Krydskontaminering

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (kvindelig, 10 prøver), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (mandlig, 12 prøver) og kontroller uden skabelon (NTC, 2 prøver) blev testet ved hjælp af Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen i et skakbrætmonstret pladelayout. Der blev anvendt det højeste anbefalede (1000 ng) gDNA-input for alle prøver som den mest stringente betingelse til evaluering af krydskontaminering mellem prøverne. Testen blev udført to gange af to forskellige operatører. Exompanel 1 (45 Mb) blev anvendt i 12-plex-berigelsesreaktioner. De berigede biblioteker blev sekventeret på NextSeq 550Dx med DNA GenerateFASTQ

Dx. Evalueringen blev udført ved at vurdere dækningen for det mandsspecifikke Y-kromosom i kvindelige prøver ved at sammenligne baggrunds niveauerne på en fuld plade med kvindelige prøver samt indeksrepræsentationen i NTC-prøverne.

Tabel 10 Resultater vedrørende krydskontaminering

Kvindelige prøver med mandlig Y-kromosom-dækning ved < 3 x baselinestøj	Indeksrepræsentation i NTC
100 %	< 0,0005 %

Bilag: Illumina UD-indeks-adaptersekvenser

Disse unikke dobbelt (UD)-indeksadaptere anbringes i pladen for at underbygge den anbefalede parringstrategi. Indexadapterne har en længde på 10 baser i stedet for de typiske otte baser.

Index 1 (i7)-adaptere

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (i5)-adaptere

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Følgende sekvens anvendes til adaptertrimning for læsning 1 og læsning 2.

CTGTCTCTTATACACATCT

Indeksadaptere til plade A/sæt 1

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
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

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTGCTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACCACTGAA

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTGCGGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGACTAATG	TGACTACATA
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGGT	CTCATAGCGA
UDP0083	GTAAGGCATA	AGACACATTA
UDP0084	GTCCACTTGT	GCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	CATGAGTACT
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	CATGTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGAAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Indeksadaptere til plade B/sæt 2

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCATT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCTTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGTAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTGTCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Revisionshistorik

Dokument	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 200019584 v02	September 2022	Tilføjelse af indhold til understøttelse af sekventering på NovaSeq 6000Dx Instrument.
Dokumentnr. 200019584 v01	Maj 2022	Tilføjelse af sekventeringssystemnavne og katalognumre. Fjernelse af oplysninger om unik dobbeltindeksning for enkeltindeksede biblioteker.
Dokumentnr. 200019584 v00	Maj 2022	Oprindelig udgivelse.

Patenter og varemærker

Dette dokument og dets indhold er ophavsretligt beskyttet af Illumina, Inc. og dets datterselskaber ("Illumina") og er udelukkende beregnet til kundens kontraktmæssige brug i forbindelse med anvendelsen af det produkt eller de produkter, som er beskrevet heri, og til intet andet formål. Dette dokument og dets indhold må ikke bruges eller distribueres til noget andet formål og/eller på anden måde kommunikeres, offentliggøres eller reproduceres på nogen som helst måde uden forudgående skriftligt samtykke fra Illumina. Med dette dokument udsteder Illumina ingen licens under sit patent, varemærke, sin copyright eller sædvaneret eller lignende rettigheder for nogen tredjeparter.

Instruktionerne i dette dokument skal følges nøje og fuldstændigt af kvalificerede og behørigt uddannede medarbejdere for at sikre, at det produkt eller de produkter, der er beskrevet heri, anvendes korrekt og sikkert. Alt indhold i dette dokument skal læses grundigt og forstås inden brug af produktet/produkterne.

HVIS ALLE INSTRUKTIONERNE HERI IKKE GENNEMLÆSES FULDT UD OG FØLGES NØJE, KAN DET MEDFØRE SKADE PÅ PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE, SKADE PÅ PERSONER, HERUNDER BRUGERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANDEN EJENDOM OG VIL GØRE ENHVER GARANTI GÆLDENDE FOR PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE UGYLDIG.

ILLUMINA PÅTAGER SIG INTET ANSVAR SOM FØLGE AF FORKERT BRUG AF DET PRODUKT ELLER DE PRODUKTER, DER ER BESKREVET HERI (HERUNDER DELE HERAF ELLER SOFTWARE).

© 2022 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

Alle varemærker tilhører Illumina, Inc. eller de respektive ejere. Specifikke varemærkeoplysninger er tilgængelige på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktoplysninger



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (uden for Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australsk sponsor

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

Produktmærkning

Se forklaringer på de symboler, der fremgår af produktemballagen og -mærkningen, i symbolnøglen på support.illumina.com under fanen *Documentation* (Dokumentation) for dit sæt.