

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
SOLO PARA EXPORTACIÓN

Uso previsto

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit es un juego de reactivos y consumibles usado para preparar librerías de muestra a partir del ADN genómico obtenido de tejido y células humanas. Para la preparación de librerías específicas para regiones de interés genómicas concretas se requieren paneles de sonda proporcionados por el usuario. Las librerías de muestras generadas están concebidas para usarse en sistemas de secuenciación de Illumina.

Principios de procedimiento

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit está concebido para la preparación de librerías de secuenciación de ADN enriquecidas para regiones objetivo de ADN genómico obtenido de tejido y células humanas.

Se necesitan paneles de oligonucleótidos con biotina proporcionados por el usuario para el enriquecimiento de objetivos. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es compatible con un intervalo de tamaños de panel, incluido de paneles pequeños (<20 000 sondas) a paneles grandes (>200 000 sondas). Las librerías enriquecidas generadas están concebidas para la secuenciación en los sistemas de secuenciación de Illumina.

El procedimiento de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit consiste en los siguientes pasos:

- **ADN genómico tagmentado:** usa BLT de enriquecimiento pequeño (eBLTS, Enrichment BLT Small) para tagmentar la entrada de ADN. Durante la tagmentación, el ADN_g se tagmenta y etiqueta con adaptadores en un paso individual. Se necesita una entrada de ADN mínima de 50 ng para saturar el eBLTS en la reacción de tagmentación. Cuando se satura, el eBLTS fragmenta un número establecido de moléculas de ADN para generar librerías normalizadas con una distribución de tamaño de fragmento consistente.
- **Limpieza tras la tagmentación:** limpia el ADN etiquetado con adaptadores en el eBLTS para usarlo en la amplificación.
- **Amplificación de ADN tagmentado:** amplifica el ADN tagmentado mediante un programa de PCR de ciclos limitados. Se añaden índices dobles únicos (UD, Unique Dual) en los extremos de los fragmentos de ADN, lo que permite un código de barras único doble de las librerías de ADN y la generación de grupos durante la secuenciación.
- **Limpieza de librerías:** usa un procedimiento de purificación de bolas para purificar y seleccionar el tamaño de las librerías de ADN amplificadas.
- **Agrupación de librerías:** combina librerías de ADN con índices únicos en una agrupación de hasta 12 librerías. Puede agrupar las librerías en volumen o en masa.
- **Hibridación de sondas:** consiste en una reacción de hibridación durante la que se desnaturalizan las librerías de ADN de cadena doble y se hibrida un panel de sondas de ADN con biotina en las regiones genómicas objetivo.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es compatible con múltiples paneles. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit no incluye un panel de enriquecimiento. Los paneles de sonda son proporcionados por el usuario y deben cumplir las especificaciones requeridas. Los reactivos de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit son compatibles con los paneles de oligonucleótidos de ADN de enriquecimiento de Illumina y de terceros que cumplen las especificaciones requeridas. Para obtener información sobre las especificaciones necesarias para los paneles de terceros, consulte [Requisitos de panel de sonda de enriquecimiento en la página 11](#).
- **Captura de sondas hibridadas:** usa las bolas magnéticas de estreptavidina (SMB3) para capturar las sondas con biotina hibridadas en las regiones objetivo de interés.
- **Amplificación de librerías enriquecidas:** usa la PCR para amplificar las librerías enriquecidas.
- **Limpieza de librerías enriquecidas amplificadas:** usa un procedimiento de purificación de bolas para purificar la lectura de librerías enriquecidas para la secuenciación.
- **Secuenciación:** se realiza la secuenciación de las librerías enriquecidas en los sistemas de secuenciación MiSeqDx, NextSeq 550Dx o NovaSeq 6000Dx. Para MiSeqDx y NextSeq 550Dx, el módulo integrado de DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager se usa para la configuración del experimento de secuenciación, la supervisión del experimento y el análisis primario (generación de FASTQ a partir de llamadas de bases). Para NovaSeq 6000Dx, se usa DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application para la configuración del experimento y el análisis secundario con varios flujos de trabajo disponibles.

Limitaciones del procedimiento

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es compatible con el ADN genómico obtenido de tejido y células humanas.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es compatible con entradas de ADN bicatenario de 50-1000 ng. No se garantiza el rendimiento con entradas fuera de estos umbrales.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit no incluye reactivos para la extracción de ADN. Los resultados de las pruebas analíticas, incluidas las pruebas de interferencia, que figuran en las [Características de rendimiento en la página 59](#) se han obtenido con sangre completa y FFPE como tipos de muestra representativos con kits de extracción de ADN representativos. Todas las pruebas de diagnóstico desarrolladas para su uso con los reactivos de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit requieren una validación completa de todos los aspectos del rendimiento con el kit de extracción de ADN elegido.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit no se recomienda para muestras FFPE de baja calidad con $\Delta Cq > 5$. El uso de muestras con $\Delta Cq > 5$ podría aumentar las posibilidades de fallo en la preparación de librerías o disminuir el rendimiento del ensayo.
- Los reactivos de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se han configurado y analizado para determinar la entrada de muestra, las reacciones de enriquecimiento y la plexicidad indicada en la siguiente tabla.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit | Entrada de muestras | Reacciones de enriquecimiento | Plexicidad de enriquecimiento |
|---|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Kit de 16 muestras | Baja calidad (FFPE) | 16 reacciones | 1 unidad de plexado |
| Kit de 96 muestras | Alta calidad (por ejemplo, sangre completa) | 8 reacciones | 12 unidades de plexado |

- El procesamiento de entrada de FFPE se ha analizado y se recomienda exclusivamente para las reacciones de enriquecimiento de 1 unidad de plexado con el uso del kit de 16 muestras.
- En el kit de 96 muestras, resultan posibles las plexicidades no estándar (de 2 a 11 unidades de plexado), pero tienen las siguientes limitaciones:
 - El procesamiento de muestras en reacciones de enriquecimiento de 2 unidades de plexado a 11 unidades de plexado reduce la productividad del kit.
 - No se garantizan resultados óptimos. La obtención de un rendimiento de enriquecimiento adecuado para plexicidades no estándar podría requerir una optimización adicional.
 - En las estrategias de agrupación de baja plexicidad (de 2 unidades de plexado a 8 unidades de plexado), se necesita la selección de adaptadores de índices con diversas secuencias para optimizar el equilibrio de color para la correcta secuenciación y análisis de datos. El módulo de DNA GenerateFASTQ Dx en MiSeqDx and NextSeq 550Dx proporciona opciones para las combinaciones de índices con equilibrio de color durante la configuración del experimento. Para obtener más información sobre las estrategias de agrupación, consulte [Métodos de agrupación en la página 35](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se limita al suministro de librerías enriquecidas que se secuencian en MiSeqDx, NextSeq 550Dx y NovaSeq 6000Dx únicamente. El uso de otros sistemas de secuenciación requiere una validación completa de todos los aspectos del rendimiento.
- Los paneles de enriquecimiento no se incluyen como parte de este producto. Los resultados de las pruebas analíticas que se proporcionan en las [Características de rendimiento en la página 59](#) se han obtenido con paneles de enriquecimiento representativos y se proporcionan con fines informativos únicamente. Las características de rendimiento analítico sirven para ilustrar las capacidades generales del ensayo y no establecen las capacidades o la idoneidad en relación con cualquier notificación específica del ensayo. Todas las pruebas diagnósticas desarrolladas para su uso con estos reactivos requieren una validación completa de todos los aspectos del rendimiento.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es compatible con paneles de enriquecimiento de Illumina y de terceros. Sin embargo, no se garantiza el rendimiento con paneles de enriquecimiento de terceros que no cumplan los requisitos del panel. Para obtener información sobre los requisitos de panel, consulte [Requisitos de panel de sonda de enriquecimiento en la página 11](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit usa un tiempo de hibridación de 2 horas. El uso de un mayor tiempo de hibridación puede afectar a los criterios de medición del rendimiento.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- Los módulos de The DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager para MiSeqDx y NextSeq 550Dx únicamente suministran archivos FASTQ. Si está usando estos módulos, deberá realizar la validación del análisis secundario.
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application está disponible en NovaSeq 6000Dx. La aplicación soporta múltiples flujos de trabajo de análisis secundario, incluida la generación de FASTQ, FASTQ y VCF para la detección de variantes germinales y FASTQ y VCF para la detección de variantes somáticas. Si está usando la aplicación para la generación de VCF, no necesita realizar la validación del análisis secundario.
- Para obtener información sobre las limitaciones de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application cuando se use con NovaSeq 6000Dx, consulte las *Instrucciones de uso de NovaSeq 6000Dx Instrument (n.º de documento 200025276)*.

Componentes del producto

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit consta de los siguientes componentes.

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

Reactivos suministrados

La realización de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx requiere Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A o Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Puede realizar el siguiente número de reacciones de enriquecimiento y preparación de librerías usando un kit de 16 muestras o 96 muestras.

| Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit | Entrada de muestras | Reacciones de enriquecimiento | Plexicidad de enriquecimiento |
|---|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Kit de 16 muestras | Baja calidad (FFPE) | 16 reacciones | 1 unidad de plexado |
| Kit de 96 muestras | Alta calidad (por ejemplo, sangre completa) | 8 reacciones | 12 unidades de plexado |

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

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, conservación a una temperatura entre 15 °C y 30 °C

Los siguientes reactivos se envían a temperatura ambiente. Conserve rápidamente los reactivos a la temperatura de conservación indicada para garantizar un rendimiento adecuado.

| Nombre de reactivo | Cantidad de tubo | | Color de tapa | Volumen de llenado | Principios activos |
|--|----------------------------|----------------------------|---------------|--------------------|---|
| | 16 muestras (n.º 20050020) | 96 muestras (n.º 20050025) | | | |
| Tampón de tagmentación de parada 2 (ST2, Stop Tagment Buffer 2) | 1 | 4 | Rojo | 350 µl | Solución de detergente en agua. |
| Tampón de lavado de tagmentación 2 (TWB2, Tagment Wash Buffer 2) | 1 | 1 | Verde | 41 ml | Solución acuosa tamponada que contiene detergente y sal. |
| Bolas de limpieza (CB) | 1 | N/A* | Rojo | 10 ml | Bolas paramagnéticas de fase sólida en solución acuosa tamponada. |

* Las bolas de limpieza para 96 muestras se incluyen en Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (n.º 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 Samples), conservación a una temperatura entre 15 °C y 30 °C

En los kits de 96 muestras, las bolas de limpieza se incluyen en Illumina Prep Dx Cleanup Beads (n.º de catálogo 20050030). El siguiente reactivo se envía a temperatura ambiente. Conserve rápidamente los reactivos a la temperatura de conservación indicada para garantizar un rendimiento adecuado. En los kits de 16 muestras, las bolas de limpieza se incluyen en Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (n.º de catálogo 20050020).

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Nombre de reactivo | Cantidad | Color de tapa | Volumen de llenado | Principios activos |
|------------------------|----------|---------------|--------------------|---|
| Bolas de limpieza (CB) | 4 | Rojo | 10 ml | Bolas paramagnéticas de fase sólida en solución acuosa tamponada. |

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, conservación a una temperatura entre 2 °C y 8 °C

Los siguientes reactivos se envían refrigerados. Conserve rápidamente los reactivos a la temperatura de conservación indicada para garantizar un rendimiento adecuado. Conserve el tubo de reserva de eBLTS en posición vertical para que las bolas estén siempre sumergidas en el tampón.

| Nombre de reactivo | Cantidad de tubo | | Color de tapa | Volumen de llenado | | Principios activos |
|--|----------------------------|----------------------------|---------------|--------------------|-------------|---|
| | 16 muestras (n.º 20050021) | 96 muestras (n.º 20050026) | | 16 muestras | 96 muestras | |
| BLT de enriquecimiento pequeño (eBLTS) | 1 | 4 | Amarillo | 200 µl | 290 µl | Bolas magnéticas de estreptavidina unidas a transposomas en solución acuosa tamponada que contiene glicerol, EDTA, ditioneitol, sal y detergente. |
| Tampón de resuspensión (RSB) | 1 | 4 | Transparente | 1,8 ml | 1,8 ml | Solución acuosa tamponada. |

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, conservación a una temperatura entre -25 °C y -15 °C

Los siguientes reactivos se envían congelados. Conserve rápidamente los reactivos a la temperatura de conservación indicada para garantizar un rendimiento adecuado.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Nombre de reactivo | Cantidad de tubo | | Color de tapa | Volumen de llenado | | Principios activos |
|---|----------------------------|----------------------------|---------------|--------------------|-------------|--|
| | 16 muestras (n.º 20050022) | 96 muestras (n.º 20050027) | | 16 muestras | 96 muestras | |
| Tampón de tagmentación 1 (TB1, Tagmentation Buffer 1) | 1 | 4 | Transparente | 290 µl | 290 µl | Solución acuosa tamponada que contiene sal de magnesio y dimetilformamida. |
| Mezcla de PCR mejorada (EPM) | 2 | 4 | Transparente | 200 µl | 610 µl | ADN-polimerasa y dNTP en solución acuosa tamponada. |

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 samples), conservación a una temperatura entre 2 °C y 8 °C

En los kits de 16 muestras, los siguientes reactivos se incluyen en Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (n.º de catálogo 20050023). En los kits de 96 muestras, los reactivos se incluyen en Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (n.º de catálogo 20050028).

Los siguientes reactivos se envían refrigerados. Conserve rápidamente los reactivos a la temperatura de conservación indicada para garantizar un rendimiento adecuado.

| Nombre de reactivo | Cantidad de tubo | Color de tapa | Volumen de llenado | Principios activos |
|--|------------------|---------------|--------------------|---|
| Bolas magnéticas de estreptavidina (SMB3, Streptavidin Magnetic Beads 3) | 4 | Transparente | 1,2 ml | Bolas magnéticas de estreptavidina en solución acuosa tamponada que contiene formamida, detergente y sal. |
| Tampón de resuspensión (RSB) | 1 | Transparente | 1,8 ml | Solución acuosa tamponada. |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Nombre de reactivo | Cantidad de tubo | Color de tapa | Volumen de llenado | Principios activos |
|---|------------------|---------------|--------------------|--|
| Tampón de hibridación de enriquecimiento 2 (EHB2, Enrichment Hyb Buffer 2) | 1 | Transparente | 200 µl | Solución acuosa tamponada que contiene detergente y sal. |
| Tampón de elución de las regiones de interés 2 (ET2, Elute Target Buffer 2) | 1 | Transparente | 200 µl | Solución acuosa tamponada. |

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 samples), conservación a una temperatura entre 2 °C y 8 °C

En los kits de 96 muestras, los siguientes reactivos se incluyen en Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (n.º de catálogo 20050028). En los kits de 16 muestras, los reactivos se incluyen en IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (n.º de catálogo 20050023).

Los siguientes reactivos se envían refrigerados. Conserve rápidamente los reactivos a la temperatura de conservación indicada para garantizar un rendimiento adecuado.

| Nombre de reactivo | Cantidad de tubo | Color de tapa | Volumen de llenado | Principios activos |
|---|------------------|---------------|--------------------|---|
| Bolas magnéticas de estreptavidina (SMB3, Streptavidin Magnetic Beads 3) | 2 | Transparente | 1,2 ml | Bolas magnéticas de estreptavidina en solución acuosa tamponada que contiene formamida, detergente y sal. |
| Tampón de resuspensión (RSB) | 4 | Transparente | 1,8 ml | Solución acuosa tamponada. |
| Tampón de hibridación de enriquecimiento 2 (EHB2, Enrichment Hyb Buffer 2) | 1 | Transparente | 200 µl | Solución acuosa tamponada que contiene detergente y sal. |
| Tampón de elución de las regiones de interés 2 (ET2, Elute Target Buffer 2) | 1 | Transparente | 200 µl | Solución acuosa tamponada. |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, conservación a una temperatura entre -25 °C y -15 °C

Los siguientes reactivos se envían congelados. Conserve rápidamente los reactivos a la temperatura de conservación indicada para garantizar un rendimiento adecuado.

| Nombre de reactivo | Cantidad de tubo | | Color de tapa | Volumen de llenado | Principios activos |
|---|----------------------------|----------------------------|---------------|--------------------|--|
| | 16 muestras (n.º 20050024) | 96 muestras (n.º 20050029) | | | |
| Tampón de elución de enriquecimiento 1 (EE1, Enrichment Elution 1) | 1 | 1 | Transparente | 580 µl | Solución de detergente en agua. |
| Tampón de lavado de enriquecimiento mejorado (EEW) | 4 | 4 | Ámbar | 4,1 ml | Solución acuosa tamponada que contiene sales y detergente. |
| Mezcla de cebadores de PCR (PPC) | 1 | 1 | Transparente | 320 µl | Mezcla de cebadores de PCR (oligonucleótidos). |
| NaOH 2 N (HP3) | 1 | 1 | Transparente | 200 µl | Solución de hidróxido sódico 2 N (NaOH). |
| Tampón de hibridación 2 + Bloqueadores NXT de IDT (NHB2, HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) | 2 | 1 | Azul | 480 µl | Solución acuosa tamponada con ADN Cot-1, agente aglutinante y formamida. |
| Mezcla de PCR mejorada (EPM) | 2 | 1 | Transparente | 200 µl | ADN-polimerasa y dNTP en solución acuosa tamponada. |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, conservación a una temperatura entre -25 °C y -15 °C

Los siguientes reactivos se envían congelados. Conserve rápidamente los reactivos a la temperatura de conservación indicada para garantizar un rendimiento adecuado. Para conocer las secuencias de adaptadores de índices, consulte [Apéndice: Secuencias de adaptadores de índices UD de Illumina en la página 63](#).

| Componente | Cantidad |
|--|----------|
| Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Indexes), n.º 20050038 | 1 |
| Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 Indexes), n.º 20050039 | 1 |

Reactivos no suministrados

Reactivos necesarios no suministrados

- Reactivos de extracción de ADN y purificación
- Reactivos de cuantificación de ADN
- Etanol puro para biología molecular
- Agua sin nucleasas
- Tris-HCl 1 M, a pH 7,0
- Tris-HCl 10 mM, a pH 7,5-8,5
- Solución de NaOH 1 N para biología molecular
- Si usa el sistema de secuenciación NextSeq 550Dx:
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (n.º de catálogo 20028871)
- Si usa el sistema de secuenciación MiSeqDx:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (n.º de catálogo 20037124)
- Si usa el sistema de secuenciación NovaSeq 6000Dx:
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (n.º de catálogo 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (n.º de catálogo 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (n.º de catálogo 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (n.º de catálogo 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (n.º de catálogo 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (n.º de catálogo 20062291)

Requisitos de panel de sonda de enriquecimiento

Los reactivos de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit son compatibles con los paneles de oligonucleótidos de ADN de enriquecimiento de Illumina y de terceros. Si usa sondas de ADN con biotina de terceros (paneles fijos o personalizados), asegúrese de que cumplen las especificaciones requeridas.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se ha optimizado y validado usando las siguientes especificaciones de panel de terceros. No se garantiza un rendimiento comparable cuando se usan paneles de terceros que no cumplen las especificaciones.

- Longitud de sonda de 80 pb o 120 pb
- Entre 500 y 675 000 sondas
- ADN de cadena sencilla o de cadena doble
- Entrada de sonda total ≥ 3 pmol para el enriquecimiento a plexidades de 1 unidad de plexado a 12 unidades de plexado

Conservación y manipulación

- La temperatura ambiente se define como la temperatura que varía entre 15 °C y 30 °C.
- Los reactivos son estables si se conservan siguiendo las indicaciones hasta la fecha de caducidad especificada en las etiquetas de los kits. Para obtener información sobre las temperaturas de conservación, consulte [Reactivos suministrados en la página 4](#).
- Los reactivos congelados se mantienen estables durante un máximo de cuatro ciclos de congelación y descongelación cuando se llevan a cabo en una fecha anterior a la fecha de caducidad especificada.
- El procedimiento de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit contiene los siguientes puntos de detención de seguridad:
 - Después de [Amplificación de ADN tagmentado en la página 30](#), las librerías amplificadas se mantienen estables durante un periodo de 30 días como máximo cuando se conservan a una temperatura entre -25 °C y -15 °C.
 - Después de [Limpieza de librerías en la página 32](#), las librerías amplificadas limpias se mantienen estables durante un periodo de 30 días como máximo cuando se conservan a una temperatura entre -25 °C y -15 °C.
 - Después de [Agrupación de librerías preenriquecidas en la página 35](#), las librerías agrupadas se mantienen estables durante un periodo de 30 días como máximo cuando se conservan a una temperatura entre -25 °C y -15 °C.
 - Después de [Amplificación de las librerías enriquecidas en la página 46](#), la placa de librerías amplificadas enriquecidas puede permanecer en el ciclador térmico durante un periodo de 24 horas como máximo. Como alternativa, la placa se puede conservar a una temperatura entre 2 °C y 8 °C durante un periodo de 48 horas como máximo.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- Las librerías enriquecidas limpias se mantienen estables durante un periodo de 7 días como máximo cuando se conservan a una temperatura entre -25 °C y -15 °C.
- Si alguno de los envases o contenidos de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit está dañado o comprometido, póngase en contacto con el servicio de atención al cliente de Illumina.
- El tampón de tagmentación de parada 2 (ST2) puede formar precipitados o cristales visibles. Si se observan precipitados, caliente a una temperatura de 37 °C durante 10 minutos y, a continuación, agite en vórtice hasta que se disuelvan los precipitados.
- Los oligonucleótidos de hibridación (HYB) y el tampón de lavado de enriquecimiento mejorado (EEW) se deben precalentar hasta la misma temperatura que la temperatura de mantenimiento de hibridación aplicable por tipo de muestra y panel de sonda. Para obtener más información sobre la manipulación de los NHB2 y EEW, consulte [Notas del procedimiento en la página 17](#).
- El tampón de hibridación de enriquecimiento 2 (EHB2) y el tampón de hibridación + los bloqueadores NXT de IDT (NHB2) pueden producir cristales y turbidez. Si se observan cristales y turbidez, agite en vórtice o pipetee hacia arriba y hacia abajo para mezclar hasta que la solución esté transparente. Asegúrese de precalentar el NHB2 antes del pipeteo.
- Cuando manipule bolas de limpieza (CB), use las siguientes mejores prácticas:
 - No congele nunca las bolas.
 - Justo antes del uso, agite en vórtice las bolas hasta que se resuspendan y el color tenga un aspecto homogéneo.
- Cuando manipule el BLT de enriquecimiento pequeño (eBLTS), use las siguientes mejores prácticas:
 - Conserve el tubo de eBLTS en posición vertical para que las bolas estén siempre sumergidas en el tampón.
 - Agite en vórtice el eBLTS exhaustivamente hasta que las bolas se resuspendan. A fin de evitar la sedimentación de nuevo de las bolas, no se recomienda centrifugar antes de pipetear.
 - Si las bolas se adhieren al lado o la parte superior de una placa de 96 pocillos, centrifugue a 280 × g durante 3 segundos y, a continuación, pipetee para resuspender.
- Cuando manipule placas de adaptadores de índices, use las siguientes mejores prácticas:
 - No añada muestras a la placa de adaptadores de índices.
 - Cada pocillo de la placa de índices es de un solo uso.

Materiales y equipo necesarios, no suministrados

Además de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, asegúrese de que dispone de los materiales y el equipo necesarios antes de empezar el protocolo.

Equipo

Asegúrese de que dispone del equipo necesario antes de empezar el protocolo.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

El protocolo se ha optimizado y validado usando los elementos con las especificaciones enumeradas. No se garantiza un rendimiento comparable cuando se usa un equipo fuera de las especificaciones.

Algunos elementos son necesarios solo para flujos de trabajo específicos. Estos elementos se especifican en tablas separadas.

- Ciclador térmico con las especificaciones siguientes:
 - Tapa calefactada
 - Intervalo de control de temperatura mínimo de 10 °C a 98 °C
 - Exactitud de temperatura mínima de $\pm 0,25$ °C
 - Volumen de reacción máximo de 100 μ l
 - Compatible con placas de PCR de 96 pocillos con faldón completo
- Incubadora de micromuestras con las siguientes especificaciones:
 - Intervalo de temperatura de ambiental +5,0 °C a 99,0 °C
 - Compatible con placas MIDI de 96 pocillos
- Fragmentos de incubadora de micromuestras compatibles con placas MIDI de 96 pocillos
- Agitador de microplacas de alta velocidad con un intervalo de velocidad de mezclado de 200-3000 rpm
- Soporte magnético compatible con placas de PCR de 96 pocillos
- Soporte magnético compatible con placas MIDI de 96 pocillos
- Fluorómetro compatible con su método de cuantificación
- Analizador de fragmentos de ADN
- Pipetas de precisión:
 - Pipetas de canal único y multicanal de 10 μ l
 - Pipetas de canal único y multicanal de 20 μ l
 - Pipetas de canal único y multicanal de 200 μ l
 - Pipetas de canal único de 1000 μ l
 - Las pipetas de precisión garantizan el suministro exacto de reactivos y muestras. Se pueden usar pipetas de canal único o multicanal si se calibran con frecuencia y ofrecen una precisión del 5 % o menos del volumen indicado.
- Centrífuga de microplacas
- Microcentrífuga
- Uno de los siguientes sistemas de secuenciación de Illumina:
 - MiSeqDx Instrument, n.º de catálogo DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx Instrument, n.º de catálogo 20005715
 - NovaSeq 6000Dx Instrument, n.º de catálogo 20068232
- **[Opcional]** Concentrador de vacío
- **[FFPE]** Sistema de detección de PCR en tiempo real

Materiales

Asegúrese de que dispone de los materiales necesarios antes de empezar el protocolo.

Algunos elementos son necesarios solo para flujos de trabajo específicos. Estos elementos se especifican en tablas separadas.

El protocolo se ha optimizado y validado usando los elementos enumerados. No se garantiza un rendimiento comparable cuando se usan materiales alternativos.

- Puntas de pipeta con filtro
- Tubos de centrifuga cónicos, de 15 ml o 50 ml
- Tubos de microcentrifuga de 1,5 ml
- Depósitos de reactivos multicanal, desechables, sin ARNasa/ADNasa
- Tapas y gradillas de 8 tubos sin ARNasa/ADNasa
- Pipetas serológicas
- Placa de conservación de pocillos profundos de polipropileno de 96 pocillos de 0,8 ml (placa MIDI)
- Placas de PCR con faldón completo de 96 pocillos de carcasa dura
- [FFPE] Placas de qPCR compatibles con el instrumento qPCR
- Sellos adhesivos para placas de 96 pocillos con las siguientes especificaciones:
 - Poliéster desprendible, transparente en términos ópticos
 - Adecuados para placas de PCR con faldón
 - Adhesivo resistente que aguanta varios cambios de temperatura de -40 °C a 110 °C
 - Sin ARNasa ni ADNasa
- Consumibles de plástico compatibles con el método de cuantificación elegido
- Kit de cuantificación fluorométrica de ADN bicatenario compatible con el sistema de cuantificación elegido:
 - En la cuantificación de las librerías amplificadas preenriquecidas, se puede usar un kit de cuantificación de amplio intervalo.
 - En la cuantificación de las librerías enriquecidas, el intervalo del kit de cuantificación depende del panel de sonda usado.
- Kit de análisis de fragmentos para la calificación de librerías con el sistema de calificación elegido:
 - En la calificación de las librerías amplificadas preenriquecidas, se puede usar un kit de amplio intervalo.
 - En la calificación de las librerías enriquecidas, el intervalo del kit de cualificación depende del panel de sonda usado.
- [Opcional] Kit para la extracción de ADN de tejido y células humanas. Puede usar cualquier método de extracción validado.

Recogida, transporte y conservación de muestras



PRECAUCIÓN

Manipule todas las muestras como si fueran agentes potencialmente infecciosos.

- Este ensayo es compatible con ADN genómico obtenido de tejido y células humanas.
- En el ADNg purificado disponible en el mercado, asegúrese de que las muestras se han transportado en las condiciones correctas y se han conservado según las instrucciones del fabricante. Siga las mejores prácticas para los ciclos de conservación y congelación y descongelación del ADNg.
- En la entrada de sangre completa, siga los requisitos de extracción, transporte y conservación de sangre aplicables al método de extracción de ADN elegido. Se puede usar cualquier método de extracción validado. El transporte de sangre completa debe cumplir con la regulación nacional, federal, estatal y local en materia de transporte de agentes etiológicos.
- En la extracción de ADN de tejido FFPE, se puede usar cualquier método de extracción validado. Siga las instrucciones y recomendaciones aplicables al método de extracción elegido para la determinación de las siguientes prácticas:
 - Método de fijación en formol y embebido en parafina de los tejidos, para garantizar la mejor calidad del ADN extraído.
 - Conservación de las muestras FFPE.
 - Los requisitos de materiales de partida, tales como el número y espesor de las secciones FFPE. La mayoría de los métodos de purificación recomiendan el uso de secciones recién cortadas.

Advertencias y precauciones

- Los reactivos de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit contienen sustancias químicas potencialmente peligrosas. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos usados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables. Para obtener más información medioambiental, sanitaria y de seguridad, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS) en support.illumina.com/sds.html.
- Manipule todas las muestras de sangre como si contuviesen agentes infecciosos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), del virus de la hepatitis B humana (VHB) o de cualquier otro patógeno de transmisión sanguínea (precauciones universales).
- Utilice las precauciones rutinarias del laboratorio. No pipetee con la boca. No coma, beba ni fume en las zonas de trabajo designadas. Lleve guantes desechables y batas de laboratorio para la manipulación de muestras y los reactivos del kit. Lávese bien las manos tras la manipulación de muestras y reactivos del kit.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- Para evitar la degradación de las muestras o los reactivos, asegúrese de que se hayan disipado por completo todos los vapores del hipoclorito de sodio usado para limpiar antes de comenzar cualquier protocolo.
- La contaminación de las muestras con otros productos/amplificaciones de la PCR puede provocar resultados inexactos y poco fiables. A fin de evitar la contaminación, use las siguientes mejores prácticas:
 - Use prácticas de laboratorio adecuadas e higiene de laboratorio.
 - Ejecute los pasos del flujo de trabajo en las áreas designadas de preamplificación o posamplificación.
 - Conserve los reactivos usados antes de limpiar las librerías en un área de preamplificación.
 - Separe los reactivos de preamplificación de los reactivos de posamplificación.
 - Asegúrese de que las áreas de preamplificación y posamplificación dispongan de equipos específicos, tales como pipetas, puntas de pipeta, mezclador vorticial y centrífuga.
- Evite la contaminación cruzada. Utilice puntas de pipeta nuevas entre muestras y dispensación de reactivos. El uso de puntas con filtro reduce el riesgo de arrastre de amplicones y de contaminación cruzada entre muestras.
 - Cuando añada o transfiera muestras o mezclas maestras de reactivos, cambie las puntas entre cada muestra.
 - Cuando añada adaptadores de índices con una pipeta multicanal, cambie las puntas entre cada fila o cada columna. Si usa una pipeta de canal único, cambie las puntas entre cada muestra.
 - Retire las placas de adaptadores de índices sin usar del área de trabajo.
- Use las siguientes mejores prácticas para los pasos de lavado con etanol:
 - Prepare siempre etanol nuevo al 80 %. El etanol puede absorber agua del aire, lo que puede afectar a los resultados.
 - Asegúrese de retirar todo el etanol del fondo de los pocillos durante los pasos de lavado. Los restos de etanol pueden afectar los resultados.
 - Cumpla el tiempo de secado especificado de los pasos relativos al soporte magnético para garantizar una evaporación completa. Los restos de etanol pueden afectar al rendimiento de las reacciones posteriores.
- Prepare siempre mezclas maestras antes del uso y nunca conserve las soluciones de trabajo combinadas.
- El rendimiento de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit no está garantizado si no se siguen los procedimientos indicados en las instrucciones de uso.
- No use los componentes del kit tras la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del kit.
- No intercambie los componentes del kit de diferentes kits de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Los kits se identifican en la etiqueta del kit.

Notas del procedimiento

Recomendaciones de entrada de ADN

El protocolo de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es compatible con entradas de ADN genómico (ADNg) bicatenario de alta calidad de 50-1000 ng.

Asegúrese de que la muestra de ADNg inicial no contenga EDTA >1 mM y esté libre de contaminantes orgánicos, tales como fenol y etanol. Estas sustancias pueden interferir con la reacción de tagmentación y dar como resultado un fallo en el ensayo.

Entrada de ADNg \geq 50 ng

En entradas de ADNg entre 50 y 1000 ng, no es necesario cuantificar y normalizar la muestra de ADNg inicial.

Entrada de ADNg \geq 50 ng

Se pueden usar entradas de ADN de 10-50 ng, con los siguientes ajustes:

- Si se usan 10-49 ng de entrada de ADNg, se recomienda cuantificar la muestra de ADNg inicial para determinar el número de ciclos de PCR necesarios después de la tagmentación. Use un método fluorométrico para cuantificar la entrada de ADNg bicatenario. Evite los métodos que midan el ácido nucleico total, tales como NanoDrop u otros métodos de absorbancia UV.
- Este protocolo no normaliza los rendimientos finales de las librerías preenriquecidas de 10-49 ng de ADNg y, por lo tanto, es necesario cuantificar y normalizar las librerías antes y después del enriquecimiento.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se ha caracterizado y verificado para entradas de ADN de 50-1000 ng. No se puede garantizar un rendimiento equivalente del producto para entradas de ADNg <50 ng.

Recomendaciones de entrada de sangre

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es compatible con el ADNg extraído de sangre completa periférica. Se puede usar cualquier método de extracción validado. Cuando se extrae ADNg de sangre completa, no es necesaria la cuantificación inicial del ADN de entrada e Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit produce rendimientos normalizados de librerías preenriquecidas.

Los siguientes factores pueden afectar negativamente a la cantidad de ADN obtenida de las muestras de sangre completa y, por lo tanto, a la normalización de librería:

- Tiempo de la muestra de sangre
- Condiciones de conservación
- Condiciones médicas subyacentes que afectan a los recuentos de glóbulos blancos

Recomendaciones de entrada de muestra de tejido FFPE

Use los siguientes criterios de calidad de ADN FFPE para determinar la entrada adecuada para una correcta preparación de librerías:

- En las muestras FFPE con un valor $\Delta Cq \leq 5$, la entrada de ADN recomendada es de 50-1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx no se recomienda para muestras FFPE de baja calidad con $\Delta Cq > 5$. El uso de muestras con $\Delta Cq > 5$ es posible, pero podría aumentar las posibilidades de fallo en la preparación de librerías o disminuir el rendimiento del ensayo.

Extracción de FFPE

Use un método de aislamiento de ácidos nucleicos que produzca altos rendimientos de recuperación, minimice el consumo de muestras y conserve la integridad de las mismas. Puede usar cualquier método validado para la extracción de ADN de muestras FFPE. En el ADNg extraído de tejido FFPE, se necesita una cuantificación inicial del ADN de entrada e Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit produce rendimientos normalizados de librerías preenriquecidas.

Calificación de ADN FFPE

El ADNg extraído del tejido FFPE deberá ser calificado antes de su uso. Para obtener un rendimiento óptimo, evalúe la calidad de la muestra de ADN usando un método de extracción validado para la calificación del ADN extraído de muestras FFPE. El protocolo de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es compatible con muestras de ADN FFPE con un valor de $\Delta Cq \leq 5$. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit no se recomienda para muestras FFPE de baja calidad con $\Delta Cq > 5$. El uso de muestras con $\Delta Cq > 5$ es posible, pero podría aumentar las posibilidades de fallo en la preparación de librerías o disminuir el rendimiento del ensayo.

[Opcional] Muestras de referencia FFPE

Use materiales de referencia caracterizados, tales como Horizon HD799 (ADN), como control positivo al realizar el protocolo. También se pueden usar como muestras de referencia los materiales FFPE calificados procedentes de xenoinjertos derivados de líneas celulares. Use un método fluorométrico para cuantificar los materiales de referencia antes de su uso.

NOTA Los experimentos con una muestra de referencia de control positivo o de control sin cadena molde (NTC, No-Template Control) consume reactivos y reduce el número total de muestras desconocidas que se pueden procesar.

Recomendaciones de entrada de muestras

Las recomendaciones de entrada de muestras para el Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 1 Recomendaciones de entrada de muestras

| Tipo de entrada de muestras | Cantidad de entrada de muestras | Cuantificación de ADN de entrada que se requiere | Calidad de entrada de ADN que se requiere | Rendimiento de librería preenriquecida normalizada |
|-----------------------------|---------------------------------|--|---|--|
| ADNg | 10-49 ng | Sí | Relación 260/280 de 1,8-2,0 | No |
| ADNg | 50-1000 ng | No | Relación 260/280 de 1,8-2,0 | Sí |
| ADNg de sangre | 50-1000 ng | No | Relación 260/280 de 1,8-2,0 | Sí |
| ADNg de FFPE | 50-1000 ng | Sí | Valor $\Delta Cq \leq 5$ | No |

Los ciclos de PCR recomendados para el programa de PCR de eBLTS se ajustan en función de la concentración y la calidad de entrada de muestras. Para obtener más información, consulte [Amplificación de ADN tagmentado en la página 30](#).

Sugerencias y técnicas

Procedimientos para evitar la contaminación cruzada

- Cuando añada o transfiera muestras, cambie las puntas entre *cada muestra*.
- Cuando añada adaptadores de índices con una pipeta multicanal, cambie las puntas entre *cada fila o cada columna*. Si usa una pipeta de canal único, cambie las puntas entre cada muestra.

Sellado de la placa

- Selle siempre la placa de 96 pocillos con un sello adhesivo nuevo usando un rodillo de caucho para cubrir la placa antes de los siguientes pasos del protocolo:
 - Pasos de agitación
 - Pasos de incubación. Si no se sella bien la placa, se puede producir una evaporación durante la incubación.
 - Pasos de centrifugado
 - Pasos de hibridación
- Asegúrese de que los bordes y los pocillos estén completamente sellados para reducir el riesgo de contaminación cruzada y evaporación.
 - Si se observa cualquier fluido o condensación en el sello o en los lados de los pocillos de las placas, centrifugue según sea necesario antes de que se retire el sello.
- Coloque la placa en una superficie plana antes de quitar lentamente el sello.

Manipulación de BLT de enriquecimiento pequeño (eBLTS)

- Conserve el tubo de reserva de eBLTS en posición vertical en el refrigerador para que las bolas estén siempre sumergidas en el tampón.
- Justo antes de su uso, agite en vórtice el tubo de reserva de eBLTS bien hasta que se resuspendan las bolas. A fin de evitar que se vuelvan a sedimentar las bolas, no se recomienda centrifugar antes de pipetear.
- Si las bolas se adhieren al lado o la parte superior de una placa de 96 pocillos, centrifugue a $280 \times g$ durante 3 segundos y, a continuación, pipetee para resuspender.
- Cuando lave el eBLTS:
 - Use el soporte magnético adecuado para su placa.
 - Mantenga la placa en el soporte magnético hasta que las instrucciones especifiquen que hay que retirarla.
 - Si se aspiran las bolas con las puntas de las pipetas, dispéñelas en la placa con el soporte magnético y espere hasta que el líquido se vuelva transparente (aproximadamente 2 minutos).

Flujo de trabajo de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

El siguiente diagrama ilustra el flujo de trabajo de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Los puntos de detención de seguridad se marcan entre los pasos. Las estimaciones de tiempo se basan en el procesamiento de 12 muestras con un enriquecimiento de 12 unidades de plexado.



Instrucciones de uso

En este capítulo se describe el protocolo de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Revise el flujo de trabajo de secuenciación completo planificado, desde la muestra hasta el análisis, para garantizar la compatibilidad de los productos y los parámetros del experimento.
- Antes de proceder, confirme el contenido del kit y asegúrese de que dispone de los componentes, equipos y materiales necesarios.
 - Las sondas con biotina de terceros deben cumplir los requisitos específicos. Consulte [Requisitos de panel de sonda de enriquecimiento en la página 11](#) para asegurarse de que sus sondas de terceros cumplen los requisitos.
- Siga los protocolos en el orden mostrado, con los volúmenes y los parámetros de incubación que se especifiquen.
- A menos que se haya especificado un punto de detención de seguridad en el protocolo, continúe inmediatamente con el siguiente paso.
- Cuando se crea una mezcla maestra, se incluye el exceso en los volúmenes proporcionados.
- Asegúrese de usar el soporte magnético adecuado para su tipo de placa.

Preparación para la agrupación

Este paso es necesario para garantizar una secuenciación correcta de las librerías enriquecidas. La agrupación de las librerías se puede producir antes del enriquecimiento y antes de la secuenciación.

Antes del enriquecimiento: las librerías amplificadas indexadas individuales se agrupan entre sí para el enriquecimiento con el panel de sonda seleccionado. Esto crea una agrupación multiplexada de librerías enriquecidas. En la entrada de muestras FFPE, el procesamiento se ha analizado y se recomienda exclusivamente para las reacciones de enriquecimiento de 1 unidad de plexado. En el ADN_g de alta calidad, se han analizado 12 unidades de plexado, pero son posibles de 2 unidades de plexado a 11 unidades de plexado.

Antes de la secuenciación: las librerías enriquecidas de 1 unidad de plexado o las librerías enriquecidas de multiplexado se agrupan entre sí antes de la secuenciación. El número de librerías enriquecidas que se puede secuenciar depende de la profundidad de la lectura objetivo para cada muestra en su sistema de secuenciación.

Indexado doble único

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit usa índices dobles únicos.

- Las librerías de doble índice añaden secuencias de Índice 1 (i7) y de Índice 2 (i5) para generar librerías con etiqueta única.
- Los índices UD tienen secuencias de índice distintas y no relacionadas para la lectura de índices i7 e i5. Los índices son de 10 bases de largo.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

La selección de adaptadores de índices con diversas secuencias para las librerías agrupadas optimiza el equilibrio de color para una correcta secuenciación y análisis de datos. Las agrupaciones de plexicidad que son ≥ 10 unidades de plexado están intrínsecamente equilibradas en color, por lo que puede usar cualquier combinación de adaptadores de índices. Durante su experimento de secuenciación, el módulo DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager ofrece opciones para las combinaciones de índices con equilibrio de color y le notifica si no hay suficiente diversidad en las combinaciones de índices seleccionadas.

Para obtener información sobre las secuencias de adaptadores de índices UD de Illumina y las disposiciones de placas, consulte [Apéndice: Secuencias de adaptadores de índices UD de Illumina en la página 63](#).

Plexicidades de enriquecimiento compatibles

Los reactivos de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se configuran y analizan con una plexicidad de enriquecimiento de 1 unidad de plexado y 12 unidades de plexado. Aunque son posibles otras plexicidades de enriquecimiento, algunas plexicidades requieren reactivos de panel de sonda para el enriquecimiento y la preparación de librerías de preenriquecimiento adicionales.

La obtención de un rendimiento de enriquecimiento adecuado para una plexicidad de enriquecimiento no estándar podría requerir una optimización adicional. No se garantizan resultados óptimos.

- **Plexicidad de enriquecimiento:** el número de librerías preenriquecidas (1-12) agrupadas entre sí en una reacción de enriquecimiento para la hibridación con los paneles de sonda de enriquecimiento. Por ejemplo, la combinación de 12 librerías preenriquecidas entre sí crea una agrupación de enriquecimiento de 12 unidades de plexado.
- **Reacción de enriquecimiento:** el número de preparaciones de reacción de enriquecimiento únicas, independientemente del número de librerías preenriquecidas agrupadas por reacción. Por ejemplo, una reacción de enriquecimiento individual puede preparar una agrupación de enriquecimiento de 1 unidad de plexado o 12 unidades de plexado.

A fin de calcular el número total de librerías poseenriquecidas, multiplique la plexicidad de enriquecimiento por reacción por el número de reacciones de enriquecimiento. Por ejemplo, una reacción de enriquecimiento única de una agrupación de enriquecimiento de 12 unidades de plexado produce una agrupación de 12 librerías poseenriquecidas.

Cuando se agrupan librerías preenriquecidas, los reactivos de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit admiten las siguientes reacciones y plexicidad de enriquecimiento.

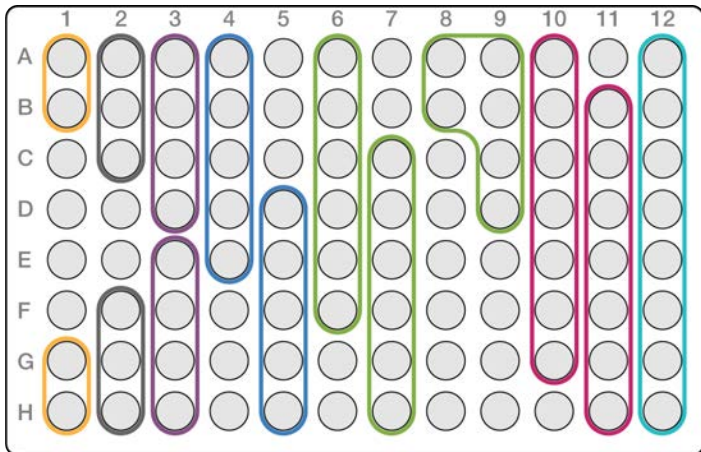
| Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Reagents | Reacciones de enriquecimiento | Plexicidad de enriquecimiento |
|---|-------------------------------|-------------------------------|
| Kit de 16 muestras | 16 reacciones | 1 unidad de plexado |
| Kit de 96 muestras | 8 reacciones | 12 unidades de plexado |

Estrategias de agrupación de dos a ocho unidades de plexado

En la siguiente tabla se muestran los adaptadores de índice (pocillos) que se pueden combinar en una agrupación de 2-8 unidades de plexado, mientras que, en la figura codificada por colores, se ilustra cada combinación.

Agrupe cualquier plexicidad ≥ 2 desde la parte superior o inferior de una columna. No agrupe en una fila.

| Plexicidad | Combinaciones | Color en la figura |
|------------|---|--------------------|
| 2 | Los dos primeros o los dos últimos pocillos de una columna: <ul style="list-style-type: none"> • A y B • G y H No se usan las filas C-F. | Naranja |
| 3 | Los tres primeros o los tres últimos pocillos de una columna: <ul style="list-style-type: none"> • A-C • F-H No se usan las filas D y E. | Gris |
| 4 | Los cuatro primeros o los cuatro últimos pocillos de una columna: <ul style="list-style-type: none"> • A-D • E-H | Violeta |
| 5 | Los cinco primeros o los cinco últimos pocillos de una columna: <ul style="list-style-type: none"> • A-E • D-H | Azul |
| 6 | [Opción 1] Los seis primeros o los seis últimos pocillos de una columna: <ul style="list-style-type: none"> • A-F • C-H [Opción 2] Los dos primeros pocillos (A y B) o los dos últimos pocillos (G y H) de una columna y cuatro pocillos cualesquiera de una columna adyacente. | Verde |
| 7 | Los siete primeros o los siete últimos pocillos de una columna: <ul style="list-style-type: none"> • A-G • B-H | Rosa |
| 8 | Toda la columna. | Turquesa |

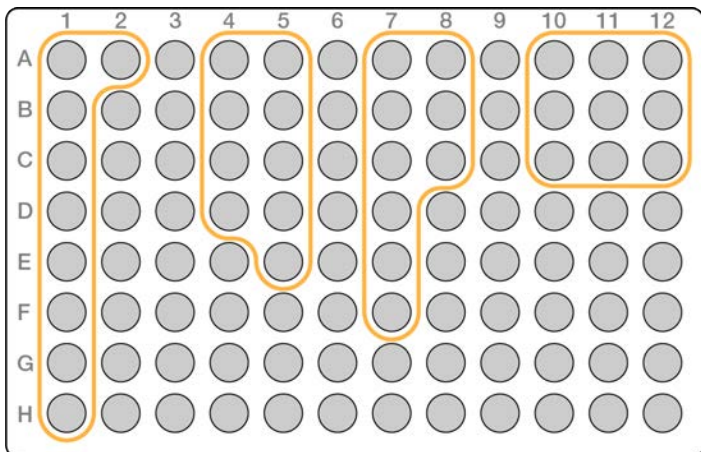


Estrategias de agrupación de nueve unidades de plexado

Use los adaptadores de índice de cualquier pocillo que optimice el equilibrio de color en un experimento de secuenciación, por ejemplo:

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

En la siguiente figura se representan los cuatro ejemplos.



Tagmentación de ADN genómico

En este paso, se usa el BLT de enriquecimiento pequeño (eBLTS) para tagmentar el ADN, que es un proceso que fragmenta y etiqueta el ADN con secuencias de adaptadores.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Consumibles

- eBLTS (BLT de enriquecimiento pequeño) (tapa de color amarillo)
- TB1 (Tampón de tagmentación 1)
- Agua sin nucleasas
- Placa de PCR de 96 pocillos
- Sello adhesivo
- Tubos de microcentrífuga de 1,7 ml
- Gradillas de 8 tubos
- Puntas de pipeta
 - Pipetas multicanal de 200 µl



PRECAUCIÓN

Este conjunto de reactivos contiene sustancias químicas potencialmente peligrosas. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos, puesto que puede provocar lesiones. Utilice un equipo de protección, incluidos gafas, guantes y batas de laboratorio adecuados para el riesgo de exposición. Manipule los reactivos usados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normativas y leyes regionales, nacionales y locales aplicables. Para obtener más información medioambiental, sanitaria y de seguridad, consulte la hoja de datos de seguridad (SDS, Safety Data Sheet) en support.illumina.com/sds.html.

Acerca de los reactivos

- El eBLTS se debe conservar a temperaturas entre 2 °C y 8 °C. No use el eBLTS que se ha conservado a una temperatura por debajo de 2 °C.
- No centrifugue el eBLTS.

Preparación

1. Prepare los siguientes consumibles:

| Elemento | Conservación | Instrucciones |
|--------------------------------|-----------------------|--|
| eBLTS (tapa de color amarillo) | Entre 2 °C y 8 °C | Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice justo antes de usarse para mezclar. No centrifugue antes de pipetear. |
| TB1 | Entre -25 °C y -15 °C | Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. |

2. Agite en vórtice o pipetee el ADN y, a continuación, centrifugue brevemente.
3. Guarde el siguiente programa de TAG en el ciclador térmico:
 - Seleccione la opción de tapa precalentada y establezca la temperatura a 100 °C.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- Establezca el volumen de la reacción en 50 µl.
- 55 °C durante 5 minutos.
- Mantenga la temperatura a 10 °C.

Procedimiento

1. Añada 2-30 µl de ADN a cada pocillo de una placa de PCR de 96 pocillos de modo que la cantidad de entrada total sea de 50-1000 ng.
Si el volumen de ADN es <30 µl, añada agua sin nucleasas a las muestras de ADN para enrasar volumen total hasta 30 µl.
2. Agite en vórtice el eBLTS bien hasta que las bolas se resuspendan por completo.
3. Combine los siguientes volúmenes en un tubo para preparar la mezcla maestra de tagmentación. Multiplique cada volumen por el número de muestras que se procesan.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)El exceso de reactivos se incluye en el volumen.
4. Pipetee la mezcla maestra de tagmentación exhaustivamente para mezclar.
5. Divida el volumen de la mezcla maestra de tagmentación por igual en una gradilla de 8 tubos.
6. Mediante el uso de una pipeta multicanal de 200 µl, transfiera 20 µl de mezcla maestra de tagmentación a cada pocillo de la placa de PCR que contiene una muestra. Use puntas nuevas para cada columna o fila de muestras.
7. Deseche la gradilla de 8 tubos una vez que haya dispensado la mezcla maestra de tagmentación.
8. Mediante el uso de una pipeta multicanal de 200 µl establecida en 40 µl, pipetee cada muestra 10 veces para mezclar. Use puntas nuevas para cada columna de muestras.
Como alternativa, selle la placa de PCR y use un agitador de placas a 1600 rpm durante 1 minuto.
9. Selle la placa y, a continuación, colóquela en el ciclador térmico preprogramado y ejecute el programa de TAG.
10. Espere hasta que el programa de TAG haya alcanzado la temperatura de mantenimiento de 10 °C y, a continuación, retire la placa inmediatamente.
11. Deje reposar la placa de PCR de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 2 minutos y, a continuación, pase al siguiente paso.

Limpieza tras la tagmentación

En este paso, se lava el ADN etiquetado con adaptadores en el eBLTS antes de la amplificación de PCR.

Consumibles

- ST2 (Tampón de tagmentación de parada 2)

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- TWB2 (Tampón de lavado de tagmentación 2)
- Soporte magnético de placa de PCR de 96 pocillos
- Sello adhesivo
- Gradillas de 8 tubos
- Puntas de pipeta
 - Pipetas multicanal de 20 µl
 - Pipetas multicanal de 200 µl
- Preparación para un procedimiento posterior:
 - EPM (Mezcla de PCR mejorada)
 - Placa de adaptadores de índices

Acerca de los reactivos

- Asegúrese de usar el soporte magnético adecuado para su placa. El uso de un soporte magnético de placa MIDI en una placa de PCR podría evitar que el TWB2 se adhiera a las bolas.
- Pipetee el TWB2 lentamente para minimizar la formación de espuma para evitar una aspiración de volumen incorrecta y un mezclado incompleto.

Preparación

1. Prepare los siguientes consumibles:

| Elemento | Conservación | Instrucciones |
|---------------------------------|-----------------------|---|
| EPM | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele en hielo durante 1 hora. Voltee para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente. |
| ST2 | Entre 15°C y 30°C | Si se observan precipitados, caliente a 37 °C durante 10 minutos y, a continuación, agite en vórtice hasta que se disuelvan los precipitados. Úselo a temperatura ambiente. |
| TWB2 | Entre 15°C y 30°C | Úselo a temperatura ambiente. |
| Placa de adaptadores de índices | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele a temperatura ambiente durante 30 minutos. |

Procedimiento

1. Añada 10 µl de ST2 a cada reacción de tagmentación. Si está usando una pipeta multicanal, pipetee ST2 en una gradilla de 8 tubos y, a continuación, transfiera los volúmenes adecuados a la placa de PCR. Use puntas nuevas para cada columna o fila de muestras.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

2. Mediante el uso de una pipeta de 200 µl ajustada a 50 µl, pipetee lentamente cada pocillo 10 veces para resuspender las bolas.
Como alternativa, selle la placa y agite a 1600 rpm durante 1 minuto. Repita según sea necesario.
3. Selle la placa y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante 10 segundos.
4. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Colóquela en el soporte magnético de la placa de PCR y espere hasta que el líquido esté transparente (3 minutos).
6. [≤48 muestras] Lave tres veces de la siguiente manera.
 - a. Mediante el uso de una pipeta multicanal de 200 µl establecida en 60 µl, retire y deseche el sobrenadante sin alterar el pellet de bolas.
 - b. Retírela del soporte magnético.
 - c. Justo después, añada lentamente 100 µl de TWB2 directamente en las bolas.
 - d. Pipetee lentamente hasta que las bolas se resuspendan por completo. Como alternativa, selle la placa y agite a 1600 rpm durante 1 minuto.
 - e. Si se producen salpicaduras, centrifugue a 280 × g durante 10 segundos.
 - f. Colóquela en el soporte magnético de placa de PCR y espere hasta que el líquido esté transparente (3 minutos).
Deje la placa en el soporte magnético y el TWB2 en los pocillos para evitar el secado excesivo al realizar el tercer lavado. Retire y deseche el sobrenadante una vez que haya preparado la mezcla maestra de PCR.
 - g. Mediante el uso de una pipeta multicanal de 200 µl establecida en 100 µl, retire y deseche el sobrenadante.
 - h. Repita los pasos c-f dos veces durante un total de tres lavados.
7. [>48 muestras] Lave tres veces de la siguiente manera.
 - a. Realice los pasos b y c en incrementos de 1 columna a 2 columnas hasta que se hayan procesado todas las columnas para evitar el secado excesivo.
 - b. Mediante el uso de una pipeta multicanal de 200 µl establecida en 60 µl, retire y deseche el sobrenadante.
 - c. Retírela del soporte magnético.
 - d. Justo después, dispense lentamente 100 µl de TWB2 directamente en las bolas.
 - e. Pipetee lentamente hasta que las bolas se resuspendan por completo. Como alternativa, selle la placa y agite a 1600 rpm durante 1 minuto.
 - f. Si se producen salpicaduras, centrifugue a 280 × g durante 10 segundos.
 - g. Colóquela en el soporte magnético de placa de PCR y espere hasta que el líquido esté transparente (3 minutos).
Deje la placa en el soporte magnético y el TWB2 en los pocillos para evitar el secado excesivo al realizar el tercer lavado. Retire y deseche el sobrenadante una vez que haya preparado la mezcla maestra de PCR.

- h. Mediante el uso de una pipeta multicanal de 200 µl establecida en 100 µl, retire y deseche el sobrenadante.
 - i. Retírela del soporte magnético y añada lentamente 100 µl de TWB2 directamente en las bolas.
 - j. Repita los pasos h e i en incrementos de 1 o 2 columnas hasta que se hayan procesado todas las columnas.
 - k. Repita los pasos e–h dos veces durante un total de tres lavados.
8. Manténgala en el soporte magnético hasta el paso 4 de la sección *Procedimiento en Amplificación de ADN tagmentado*.
- El TWB2 permanece en los pocillos para evitar el secado excesivo de las bolas.

Amplificación de ADN tagmentado

En este paso, se amplifica el ADN tagmentado mediante un programa de PCR de ciclos limitados. El paso de PCR añade adaptadores de índices 1 (i7), adaptadores de índices 2 (i5) y las secuencias necesarias para la generación de grupos de secuenciación.

Consumibles

- EPM (Mezcla de PCR mejorada, Enhanced PCR Mix)
- Placa de adaptadores de índices
- Placa de PCR de 96 pocillos
- Agua sin nucleasas
- Sello adhesivo
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- Puntas de pipeta
 - Pipetas multicanal de 20 µl
 - Pipetas multicanal de 200 µl

Acerca de los reactivos

- Placas de adaptadores de índices
 - Un pocillo puede contener >10 µl de adaptadores de índices.
 - No añada muestras a la placa de adaptadores de índices.
 - Cada pocillo de la placa de índices es de un solo uso.

Preparación

1. Prepare los siguientes consumibles:

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Elemento | Conservación | Instrucciones |
|---------------------------------|--------------------------|--|
| EPM | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele a 4 °C o en hielo durante 1 hora. Voltee para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente. |
| Placa de adaptadores de índices | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele a temperatura ambiente durante 30 minutos. |

2. Guarde el siguiente programa de PCR de eBLTS en un ciclador térmico usando el número adecuado de ciclos de PCR indicados en la siguiente tabla.
- Seleccione la opción de tapa precalentada y establezca la temperatura a 100 °C.
 - Establezca el volumen de la reacción en 50 µl.
 - 72 °C durante 3 minutos.
 - 98 °C durante 3 minutos.
 - X ciclos de:
 - 98 °C durante 20 segundos.
 - 60 °C durante 30 segundos.
 - 72 °C durante 1 minuto.
 - 72 °C durante 3 minutos.
 - Mantenga la temperatura a 10 °C.

La duración total de los experimentos es de ~38 minutos para 9 ciclos y ~46 minutos para 12 ciclos.

| Tipo de entrada de muestras | Número de ciclos de PCR (X) |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| 10-49 ng de ADNg | 12 |
| 50-1000 ng de ADNg | 9 |
| 50-1000 ng de ADNg extraído de FFPE | 12 |
| ADNg extraído de sangre | 9 |

Procedimiento

1. Combine lo siguiente para preparar la mezcla maestra de PCR. Multiplique cada volumen por el número de muestras que se procesan.
 - EPM (23 µl)
 - Agua sin nucleasas (23 µl)El exceso de reactivos se incluye en el volumen.
2. Pipetee la mezcla maestra de PCR 10 veces para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente.
3. Con la placa en el soporte magnético, use una pipeta multicanal de 200 µl para retirar y desechar el TWB2. La espuma que queda sobre las paredes del pocillo no afecta negativamente a la librería.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

4. Retírela del soporte magnético.
5. Añada inmediatamente 40 µl de mezcla maestra de PCR directamente en las bolas de cada pocillo.
6. Pipetee inmediatamente para mezclar hasta que se hayan resuspendido por completo las bolas. Como alternativa, selle la placa y agite a 1600 rpm durante 1 minuto.
7. Selle la placa de muestras y centrifugue a 280 × g durante 10 segundos.
8. Centrifugue la placa de adaptadores de índices a 1000 × g durante 1 minuto.
9. Prepare la placa de adaptadores de índices.
 - [<96 muestras] Perfore el cierre metálico de la placa de adaptadores de índices con una nueva punta de pipeta para cada pocillo solo para el número de muestras que se procesan.
 - [96 muestras] Alinee una nueva placa de PCR con semifaldón sobre la placa de adaptadores de índices y presione hacia abajo para perforar el cierre metálico. Deseche la placa de PCR usada para perforar el cierre metálico.
10. Mediante el uso de una nueva punta de pipeta, añada 10 µl de adaptadores de índices preemparejados a cada pocillo.
11. Mediante el uso de una pipeta ajustada a 40 µl, pipetee 10 veces para mezclar. Como alternativa, selle la placa y agite a 1600 rpm durante 1 minuto.
12. Selle la placa y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante 10 segundos.
13. Colóquela en el ciclador térmico y ejecute el programa de PCR de eBLTS.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, consérvela a una temperatura entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 30 días como máximo.

Limpieza de librerías

En este paso, se usa un procedimiento de purificación de bolas bilateral para purificar las librerías amplificadas.

Consumibles

- CB (Bolas de limpieza, Cleanup Beads)
- RSB (Tampón de resuspensión)
- Etanol al 80 % de nueva preparación (EtOH)
- Placa de conservación de pocillos profundos de polipropileno de 96 pocillos de 0,8 ml (placa MIDI)
- Placa de PCR de 96 pocillos
- Soporte magnético de placa MIDI
- Soporte magnético de placa de PCR
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- Agua sin nucleasas

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Acerca de los reactivos

- Bolas de limpieza
 - Agite en vórtice antes de cada uso.
 - Agite en vórtice frecuentemente para asegurarse de que las bolas están distribuidas de manera uniforme.
 - Aspire y dispense lentamente debido a la viscosidad de la solución.

Preparación

1. Prepare los siguientes consumibles:

| Elemento | Conservación | Instrucciones |
|----------|----------------------|--|
| CB | Temperatura ambiente | Agite en vórtice y voltee para mezclar hasta que el color del líquido sea homogéneo. |
| RSB | Entre 2 °C y 8 °C | Descongele durante 30 minutos a temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. |

Procedimiento

1. Agite la placa de PCR de 96 pocillos a 1800 rpm durante 1 minuto y, a continuación, centrifugue brevemente.
2. Colóquela en el soporte magnético de placa de PCR y espere hasta que el líquido esté transparente (1 minuto).
3. Agite en vórtice las CB 3 veces durante 10 segundos y, a continuación, voltee múltiples veces para resuspender.
4. En el caso del ADN_g de alta calidad, realice lo siguiente.
 - a. Añada 77 µl de agua sin nucleasas a cada pocillo de una placa MIDI nueva.
 - b. Añada 88 µl de CB a cada pocillo de la placa MIDI.
 - c. Transfiera 45 µl de sobrenadante de cada pocillo de la placa de PCR al pocillo correspondiente de la placa MIDI.
 - d. Deseche la placa de PCR.
 - e. Pipetee cada pocillo 10 veces para mezclar. Como alternativa, selle la placa y agite a 1800 rpm durante 1 minuto.
 - f. Selle la placa e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
 - g. Compruebe si hay burbujas de aire. Si se observan, centrifugue.
 - h. Colóquela en el soporte magnético de placa MIDI y espere hasta que el líquido esté transparente (5 minutos).
 - i. Durante la incubación, agite en vórtice exhaustivamente las CB y, a continuación, añada 20 µl a cada pocillo de una placa MIDI *nueva*.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- j. Transfiera 200 µl de sobrenadante de cada pocillo de la primera placa MIDI al pocillo correspondiente de la placa MIDI nueva (que contiene 20 µl de CB).
 - k. Deseche la primera placa MIDI.
 - l. Pipetee cada pocillo de la placa MIDI nueva 10 veces para mezclar. Como alternativa, selle la placa y agite a 1800 rpm durante 1 minuto.
5. En el caso del FFPE, realice lo siguiente.
 - a. Añada 81 µl de CB a cada pocillo de una placa MIDI nueva.
 - b. Transfiera 45 µl de sobrenadante de cada pocillo de la placa de PCR al pocillo correspondiente de la placa MIDI.
 - c. Deseche la placa de PCR.
 - d. Pipetee cada pocillo 10 veces para mezclar. Como alternativa, selle la placa y agite a 1800 rpm durante 1 minuto.
 6. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
 7. Compruebe si hay burbujas de aire. Si se observan, centrifugue.
 8. Colóquela en el soporte magnético de placa MIDI y espere hasta que el líquido esté transparente (5 minutos).
 9. Sin alterar las bolas, retire y deseche el sobrenadante.
 10. Lave las bolas de la siguiente manera.
 - a. Mientras permanece la placa en el soporte magnético, añada 200 µl de EtOH al 80 % nuevo sin mezclar.
 - b. Incube durante 30 segundos.
 - c. Sin alterar las bolas, retire y deseche el sobrenadante.
 11. Lave las bolas una **segunda** vez.
 12. Seque al aire en el soporte magnético durante 5 minutos.
 13. Al tiempo que se seca al aire, use se una pipeta de 20 µl para retirar y desechar el EtOH residual.
 14. Retírela del soporte magnético.
 15. Añada 17 µl de RSB a las bolas.
 16. Selle la placa y agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
 17. Incube a temperatura ambiente durante 2 minutos.
 18. Compruebe si hay burbujas de aire. Si se observan, centrifugue.
 19. Coloque la placa en el soporte magnético de placa MIDI y espere hasta que el líquido esté transparente (2 minutos).
 20. Transfiera 15 µl de sobrenadante a una placa de PCR de 96 pocillos.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, selle la placa y consérvela a una temperatura entre - 25°C y - 15°C durante un periodo de 30 días como máximo.

Agrupación de librerías preenriquecidas

Este paso combina librerías de ADN con índices únicos en una agrupación de hasta 12 librerías.

Métodos de agrupación

Puede agrupar en volumen o masa. Use la siguiente tabla para determinar el método adecuado para su entrada.

Tabla 2 Métodos de agrupación recomendados

| Entrada de muestras | Método de agrupación |
|-------------------------|----------------------|
| 10-49 ng de ADNg | Masa |
| 50-1000 ng de ADNg | Volumen |
| ADNg extraído de FFPE | Masa |
| ADNg extraído de sangre | Volumen |

- El enriquecimiento de una unidad de plexado no requiere la agrupación de librerías preenriquecidas. Sin embargo, podría resultar necesaria la adición de RSB.
- Después de la cuantificación de las librerías preenriquecidas, todos los tipos de muestras de entrada se pueden agrupar en masa para lograr un equilibrio óptimo del índice.
- El rendimiento final de las librerías preenriquecidas generadas en distintas preparaciones experimentales puede variar. Por lo tanto, se recomienda la agrupación en masa para lograr un equilibrio óptimo del índice.
- Use el enriquecimiento de 1 unidad de plexado en las siguientes situaciones.
 - 10-49 ng de ADNg
 - 50-1000 ng de ADNg extraído de FFPE
 - Detección de bajas frecuencias alélicas menores para la llamada de variantes somáticas.

Agrupación en masa

En las siguientes situaciones, cuantifique sus librerías para usar una masa de ADN por librería para el enriquecimiento especificado en [Agrupación de librerías preenriquecidas a una concentración igual en la página 36](#).

- 10-49 ng de entrada de muestra de ADNg.
- 50-1000 ng de entrada de muestra de ADNg extraído de FFPE.
- Detección de bajas frecuencias alélicas menores para la llamada de variantes somáticas.
- ADNg extraído de sangre para un equilibrio óptimo del índice.

Cuantificación de librerías preenriquecidas

1. Analice 1 µl de las librerías preenriquecidas usando su método de cuantificación basado en la fluorescencia preferido que use el colorante intercalado de ADN de doble cadena.
 - En 50-1000 ng de ADNg de alta calidad, se espera un rendimiento de librería preenriquecida de ≥ 500 ng.
 - En 50-1000 ng de ADNg extraído de FFPE, se espera un rendimiento de 500-6000 ng de librería preenriquecida, dependiendo de la calidad de la muestra inicial.

NOTA En los métodos de cuantificación con diferentes sesgos, califique el método de cuantificación para este flujo de trabajo. Los resultados de la concentración podrían diferir en función del método usado.

Agrupación de librerías preenriquecidas a una concentración igual

Use la siguiente tabla para determinar la masa de ADN por librería necesaria para el enriquecimiento, según el tipo de muestra y la plexicidad de enriquecimiento. No se garantizan los rendimientos óptimos de enriquecimiento ni el rendimiento del ensayo cuando se usan rendimientos de librerías preenriquecidas inferiores a los recomendados.

La masa de ADN total en la reacción de enriquecimiento no debe exceder 6000 ng.

| Entrada de muestras | Plexicidad de enriquecimiento | Masa de ADN por librería (ng) | Masa de librería de ADN total (ng) |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| ADNg de alta calidad | 12 | 250-500 | 3000-6000 |
| ADNg extraído de FFPE | 1 | 200 | 200 |

1. Registre los índices de las librerías que planea agrupar en este paso.
2. Basándose en la concentración de cada librería, calcule el volumen que se debe añadir a la reacción de enriquecimiento para alcanzar la masa de ADN requerida.
 - ADNg de alta calidad: calcule el volumen de librería necesario para una entrada de 250-500 ng.
 - ADNg extraído de FFPE: calcule el volumen de librería necesario para una entrada de 200 ng.
3. Añada el volumen calculado para cada librería en el mismo pocillo de la placa de PCR.
4. Si usa ADNg de alta calidad, realice una de las siguientes operaciones en función del volumen total de librerías preenriquecidas agrupadas:
 - Si el volumen de librería preenriquecida es =30 µl, proceda a [Hibridación de sondas en la página 38](#).
 - Si el volumen de librería preenriquecida es <30 µl, añada RSB para alcanzar un volumen total de 30 µl.
 - Si el volumen de librería preenriquecida es >30 µl, use un método basado en bolas o un concentrador de vacío para concentrar la muestra agrupada. Añada RSB a la muestra agrupada concentrada para alcanzar un volumen total de 30 µl.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

5. Si usa ADNg extraído de FFPE, realice una de las siguientes operaciones en función del volumen total de librerías preenriquecidas agrupadas:
- Si el volumen de librería preenriquecida es =7,5 µl, proceda a [Hibridación de sondas en la página 38](#).
 - Si el volumen de librería preenriquecida es <7,5 µl, añada RSB para alcanzar un volumen total de 7,5 µl.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, selle la placa y consérvela a una temperatura entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 30 días como máximo.

Agrupación en volumen

Cuando la entrada es de 50-1000 ng de ADNg, no es necesario cuantificar y normalizar las librerías individuales generadas en el mismo experimento.

A fin de lograr un rendimiento óptimo, agrupe solo las muestras de librerías preenriquecidas preparadas por el mismo usuario, el lote de reactivos y la placa de adaptadores de índices.

1. Registre los índices de las librerías que planea agrupar en este paso.
2. Combine los siguientes volúmenes de librerías preenriquecidas y RSB para su plexicidad de enriquecimiento en el mismo pocillo de una placa de PCR nueva.
El volumen resultante es de 30 µl.

| Plexicidad de enriquecimiento * | Cada volumen de librería preenriquecida (µl) | Volumen de RSB (µl) |
|---------------------------------|--|---------------------|
| 1 unidad de plexado | 14 | 16 |
| 2 unidades de plexado | 14 | 2 |
| 3 unidades de plexado | 10 | 0 |
| 4 unidades de plexado | 7,5 | 0 |
| 5 unidades de plexado | 6 | 0 |
| 6 unidades de plexado | 5 | 0 |
| 7 unidades de plexado | 4,2 | 0,6 |
| 8 unidades de plexado | 3,7 | 0,4 |
| 9 unidades de plexado | 3,3 | 0,3 |
| 10 unidades de plexado | 3 | 0 |
| 11 unidades de plexado | 2,7 | 0,3 |
| 12 unidades de plexado | 2,5 | 0 |

*Para obtener información sobre las unidades de plexado no estándar (de 2 unidades de plexado a 11 unidades de plexado), consulte [Limitaciones del procedimiento en la página 2](#).

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, selle la placa y consérvela a una temperatura entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 30 días como máximo.

[Opcional] Calificación de librerías preenriquecidas

Si se agrupan en volumen, a fin de cuantificar las librerías preenriquecidas, use un método fluorométrico que use un colorante intercalado de ADN de cadena doble. A fin de calificar las librerías preenriquecidas, use un analizador de fragmentos de ADN con el kit de análisis de fragmentos adecuado.

Use 1 µl en total para la calificación de librerías. Las librerías preenriquecidas están lo suficientemente concentradas como para permitir pequeñas diluciones para la cuantificación o el análisis de fragmentos.

Hibridación de sondas

Este paso une las regiones objetivo del ADN con sondas de captura.

Los reactivos de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit son compatibles con los paneles de oligonucleótidos de ADN de enriquecimiento de Illumina y de terceros. Para obtener información sobre las especificaciones necesarias para los paneles de terceros, consulte [Requisitos de panel de sonda de enriquecimiento en la página 11](#).

Consumibles

- EHB2 (Tampón de hibridación de enriquecimiento 2)
- NHB2 (Tampón de hibridación 2 + bloqueadores NXT de IDT) (tapa de color azul)
- Panel de sonda de enriquecimiento
- Placa de PCR de 96 pocillos
- Sello adhesivo
- Preparación para un procedimiento posterior:
 - SMB3 (Bolas magnéticas de estreptavidina)
 - EEW (Tampón de lavado de enriquecimiento mejorado) (tapa de color ámbar)

Acerca de los reactivos

- El NHB2 se precipita y separa durante la conservación.
- El panel de sonda de enriquecimiento se refiere al panel de oligonucleótidos de enriquecimiento elegido de un proveedor de Illumina.

Preparación

1. Prepare los siguientes consumibles:

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Elemento | Conservación | Instrucciones |
|-----------------------------------|----------------------------------|--|
| EHB2 | Entre 2 °C y 8 °C | Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. Si se observan cristales y turbidez, repita la agitación en vórtice o bien pipetee hacia arriba y hacia abajo para mezclar hasta que la solución esté transparente. |
| Panel de sonda de enriquecimiento | Entre -25 °C y -15 °C (Illumina) | En los paneles tanto de Illumina como de terceros, deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. |
| NHB2 (tapa de color azul) | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele a temperatura ambiente. Cuando esté a temperatura ambiente, precaliente en una incubadora de micromuestras a la misma temperatura que la sonda que está usando durante 5 minutos. Agite en vórtice a máxima velocidad 3 veces durante 10 segundos cada una para resuspender. Centrifugue brevemente. Pipetee hacia arriba y hacia abajo desde el fondo del tubo. Si se observan cristales y turbidez, repita la agitación en vórtice o bien pipetee hacia arriba y hacia abajo para mezclar hasta que la solución esté transparente. Úselo mientras está caliente para evitar que se vuelvan a formar precipitados. |
| SMB3* | Entre 2 °C y 8 °C | Si va a proceder al siguiente procedimiento inmediatamente después del mantenimiento de 90 minutos en el programa de HYB, deje que alcance la temperatura ambiente al menos 2 horas antes de empezar el programa de HYB. |
| EEW *(tubo de color ámbar) | Entre -25 °C y -15 °C | Si va a proceder al siguiente procedimiento inmediatamente después del mantenimiento de 90 minutos en el programa de HYB, deje que alcance la temperatura ambiente al menos 2 horas antes de empezar el programa de HYB. Cuando esté a temperatura ambiente, precaliente en una incubadora de micromuestras hasta la temperatura de hibridación y captura aplicable durante 30 minutos antes de finalizar el programa de HYB. |

*Si se detiene antes del siguiente procedimiento, retrase la preparación de este reactivo hasta llegar a ese procedimiento.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

2. Guarde el siguiente programa de HYB en el ciclador térmico usando el número adecuado de ciclos, que se enumeran en la [Tabla 3](#).
 - Seleccione la opción de tapa precalentada y establezca la temperatura a 100 °C.
 - Establezca el volumen de reacción.
 - [ADNg de alta calidad] 100 µl
 - [ADNg extraído de FFPE] 25 µl
 - 98°C durante 5 minutos.
 - X ciclos de 1 minuto cada uno, empezando a una temperatura de 98 °C en el primer ciclo y disminuyendo, a continuación, 2 °C por ciclo.
 - Mantenga durante 90 minutos a la temperatura correspondiente:
 - [ADNg extraído de FFPE] 58 °C
 - [80 meros por panel de sonda] 58 °C
 - [Llamada de variantes somáticas] 58 °C
 - [Todos los demás] 62 °C

La duración total de los experimentos es de ~115 minutos.

Tabla 3 Número de ciclos por muestra o panel

| Tipo de muestra y panel | Número de ciclos (X) |
|--|----------------------|
| ADNg extraído de FFPE (independientemente del tipo de panel) | 20 |
| 80 meros por panel de sonda (independientemente del tipo de muestra) | 20 |
| Llamada de variantes somáticas | 20 |
| Todas las demás muestras y paneles | 18 |

Procedimiento

1. [ADNg de alta calidad] Añada los siguientes reactivos *en el orden enumerado* a cada librería agrupada en la placa de PCR.

No cree una mezcla maestra. La creación de una mezcla maestra de NHB2 y EHB2 afecta negativamente al rendimiento del enriquecimiento.

 - NHB2 (tapa de color azul) (50 µl)
 - Panel de sonda de enriquecimiento (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. [ADNg de alta calidad] Mediante el uso de una pipeta ajustada a 90 µl, pipetee cada pocillo 10 veces para mezclar.
3. [ADNg extraído de FFPE] Añada los siguientes reactivos *en el orden enumerado* a cada librería agrupada en la placa de PCR.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

No cree una mezcla maestra. La creación de una mezcla maestra de NHB2 y EHB2 afecta negativamente al rendimiento del enriquecimiento.

- NHB2 (tapa de color azul) (12,5 µl)
 - Panel de sonda de enriquecimiento (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[ADNg extraído de FFPE]** Mediante el uso de una pipeta establecida en 20 µl, pipetee cada pocillo 10 veces para mezclar.
 5. Selle la placa y centrifugue a 280 × g durante 10 segundos.
 6. Coloque la placa de muestras en el ciclador térmico preprogramado y ejecute el programa de HYB.
 7. Proceda inmediatamente al siguiente procedimiento cuando termine el tiempo de mantenimiento de la temperatura del programa de HYB.



PRECAUCIÓN

La precipitación se produce si la temperatura de la reacción de hibridación desciende por debajo de la temperatura ambiente.

Captura de sondas hibridadas

En este paso, se usan las bolas magnéticas de estreptavidina (SMB3, Streptavidin Magnetic Beads 3) para capturar sondas hibridadas en las regiones objetivo de interés.

Consumibles

- EEW (Tampón de lavado de enriquecimiento mejorado, Enhanced Enrichment Wash) (tapa de color ámbar)
- EE1 (Tampón de elución de enriquecimiento 1, Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Tampón de elución de objetivo 2, Elute Target Buffer 2)
- HP3 (NaOH 2 N)
- SMB3 (Bolas magnéticas de estreptavidina)
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml
- Placa MIDI de 96 pocillos
- Placa de PCR de 96 pocillos
- Sello adhesivo
- Soporte magnético de placa MIDI
- Preparación para un procedimiento posterior:
 - Mezcla de PCR mejorada (EPM)
 - Mezcla de cebadores de PCR (PPC)

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Acerca de los reactivos

- EEW
 - Asegúrese de que el EEW se ha descongelado a temperatura ambiente durante al menos 2 horas antes de precalentarlo en una incubadora de micromuestras.
 - Asegúrese de que el EEW se ha calentado en una incubadora de micromuestras durante 30 minutos antes de que finalice el programa de HYB.
 - Deje el EEW en una incubadora de micromuestras cuando no esté en uso. El EEW debe permanecer calentado a lo largo de todo el protocolo.
 - Puede estar turbio después de alcanzar la temperatura ambiente.
 - Puede aparecer de color amarillo.
- SMB3
 - Las SMB3 deben estar a temperatura ambiente antes de su uso.

Preparación

1. Prepare los siguientes consumibles.

| Elemento | Conservación | Instrucciones |
|---------------------------|-----------------------|---|
| SMB3 | Entre 2 °C y 8 °C | Deje reposar durante 2 horas hasta que alcance la temperatura ambiente. Voltee y, a continuación, agite en vórtice hasta la completa resuspensión. |
| EEW (tubo de color ámbar) | Entre -25 °C y -15 °C | Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, precaliente en una incubadora de micromuestras hasta la temperatura de hibridación y captura aplicable durante 30 minutos antes de finalizar el programa de HYB. |
| EE1 | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele a temperatura ambiente y, a continuación, agite en vórtice. |
| HP3 | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele a temperatura ambiente y, a continuación, agite en vórtice. |
| ET2 | Entre 2 °C y 8 °C | Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. |
| EPM | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele en hielo durante una hora. Invierta para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente. Déjela reposar en hielo. |
| PPC | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele en hielo durante una hora. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente. Déjela reposar en hielo. |

2. Precaliente una incubadora de micromuestras con un fragmento de bloque térmico MIDI para incubar la placa de muestras hasta una de las siguientes temperaturas. Se puede usar una segunda incubadora de micromuestras opcional para precalentar el EEW. Apoye el EEW en la parte superior del fragmento de bloque térmico MIDI.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- [FFPE] 58 °C
- [80 meros por panel de sonda] 58 °C
- [Llamada de variantes somáticas] 58 °C
- [Todos los demás] 62 °C

Procedimiento

Captura

1. Añada las SMB3 al pocillo correspondiente de una placa MIDI nueva de la siguiente manera.
 - [ADNg de alta calidad] Añada 250 µl de SMB3.
 - [ADNg extraído de FFPE] Añada 62,5 µl de SMB3.
2. Mediante el uso de una pipeta ajustada a 100 µl para ADNg de alta calidad o 25 µl para FFPE, transfiera cada librería agrupada de la placa de PCR de 96 pocillos al pocillo correspondiente de la placa MIDI nueva.
3. Selle la placa y agite a 1200 rpm durante 4 minutos.
4. Si se producen salpicaduras, centrifugue la placa brevemente.
5. Coloque la placa de librerías agrupadas en el fragmento de bloque térmico MIDI en la incubadora de micromuestras, con el tubo de EEW, cierre la tapa y, a continuación, incube durante 15 minutos a la temperatura aplicable:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 meros por panel de sonda] 58 °C
 - [Llamada de variantes somáticas] 58 °C
 - [Todos los demás] 62 °C
6. Retire la placa de librerías agrupadas y centrifugue a 280 × g durante 30 segundos.
7. Colóquela inmediatamente en un soporte magnético de placa MIDI y espere hasta que el líquido esté transparente (2 minutos).
8. [ADNg de alta calidad] Mediante el uso de una pipeta establecida en 200 µl, retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo sin alterar el pellet de bolas.
9. [ADNg extraído de FFPE] Mediante el uso de una pipeta establecida en 90 µl, retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo sin alterar el pellet de bolas.
10. Retire y deseche todo el sobrenadante residual.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Lavado

1. Retírela del soporte magnético.
2. **[ADNg de alta calidad]** Retire rápidamente el EEW de la incubadora de micromuestras y añada 200 µl a cada pocillo.
3. **[ADNg extraído de FFPE]** Retire rápidamente el EEW de la incubadora de micromuestras y añada 50 µl a cada pocillo.
4. Devuelva el EEW no usado a la incubadora de micromuestras y manténgalo calentado.
5. Selle y agite a 1800 rpm durante 4 minutos.
6. Coloque la placa de muestras en el fragmento de bloque térmico MIDI en la incubadora de micromuestras, con el tubo de EEW, cierre la tapa y, a continuación, incube durante 5 minutos a la temperatura aplicable:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 meros por panel de sonda] 58 °C
 - [Llamada de variantes somáticas] 58 °C
 - [Todos los demás paneles] 62 °C
7. Colóquela inmediatamente en un soporte magnético de placa MIDI y espere hasta que el líquido esté transparente (2 minutos).
8. Mediante el uso de una pipeta ajustada a 200 µl para ADNg de alta calidad o 50 µl para FFPE, retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo.
9. Repita los pasos 1-8 dos veces durante un total de tres lavados.

Lavado por transferencia

1. Retírela del soporte magnético.
2. **[ADNg de alta calidad]** Retire rápidamente el EEW de la incubadora de micromuestras y añada 200 µl a cada pocillo.
3. **[ADNg extraído de FFPE]** Retire rápidamente el EEW de la incubadora de micromuestras y añada 50 µl a cada pocillo.
4. Selle y agite a 1800 rpm durante 4 minutos. Si se producen salpicaduras, reduzca la velocidad a 1600 rpm.
5. Transfiera la solución de bolas resuspendidas a una placa MIDI nueva.
Podría permanecer alguna muestra en los pocillos.



PRECAUCIÓN

La transferencia del reactivo minimiza el arrastre de reactivos residuales que pueden inhibir la PCR posterior.

6. Coloque la placa de muestras en el fragmento de bloque térmico MIDI en la incubadora de micromuestras, cierre la tapa y, a continuación, incube durante 5 minutos a la temperatura correspondiente:
 - [FFPE] 58 °C

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- [80 meros por panel de sonda] 58 °C
 - [Llamada de variantes somáticas] 58 °C
 - [Todos los demás] 62 °C
7. Colóquela inmediatamente en un soporte magnético de placa MIDI y espere hasta que el líquido esté transparente (2 minutos).
 8. Mediante el uso de una pipeta ajustada a 200 µl para ADN_g de alta calidad o 50 µl para FFPE, retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo.
 9. Centrifugue la placa a 280 × g durante 30 segundos.
 10. Colóquela en un soporte magnético de placa MIDI durante 10 segundos.
 11. Use una pipeta de 20 µl para retirar y desechar el líquido residual de cada pocillo.
 12. Pase inmediatamente al paso de [Elución en la página 45](#) para prevenir el secado excesivo de las bolas y la pérdida de rendimiento de las librerías.

Elución

1. Combine los siguientes volúmenes para preparar una mezcla maestra de elución. Multiplique cada volumen por el número de librerías agrupadas que se procesan.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)El exceso de reactivos adicionales se incluye en el volumen.
2. Agite en vórtice y, a continuación, centrifugue brevemente.
3. Retire la placa MIDI del soporte magnético.
4. Añada 23 µl de mezcla maestra de elución a cada pocillo.
5. Selle la placa y agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
6. Incube la placa a temperatura ambiente durante 2 minutos.
7. Centrifugue a 280 × g durante 30 segundos.
8. Colóquela en un soporte magnético de placa MIDI y espere hasta que el líquido esté transparente (2 minutos).
9. Transfiera 21 µl de sobrenadante de la placa MIDI al pocillo correspondiente de una placa de PCR de 96 pocillos nueva.
10. Deseche la placa MIDI.
11. Añada 4 µl de ET2 a cada pocillo que contiene 21 µl de sobrenadante.
12. Ajuste la pipeta a 20 µl y pipetee lentamente cada pocillo 10 veces para mezclar.
13. Selle la placa y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante 10 segundos.
14. Incube la placa durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Amplificación de las librerías enriquecidas

En este paso, se usa la PCR para amplificar la librería enriquecida.

Consumibles

- EPM (Mezcla de PCR mejorada)
- PPC (Mezcla de cebadores de PCR, PCR Primer Cocktail)
- Sello adhesivo

Preparación

1. Prepare los siguientes consumibles:

| Elemento | Conservación | Instrucciones |
|----------|--------------------------|--|
| EPM | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele a 4 °C o en hielo durante una hora. Invierta para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente. Déjela reposar en hielo. |
| PPC | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele a 4 °C en hielo durante una hora. Agite en vórtice para mezclar y, a continuación, centrifugue brevemente. Déjela reposar en hielo. |

2. Guarde el siguiente programa de AMP en el ciclador térmico usando el número adecuado de ciclos de PCR, que se enumeran en la siguiente tabla.

- Seleccione la opción de tapa precalentada y establezca la temperatura a 100 °C.
- Establezca el volumen de la reacción en 50 µl.
- 98 °C durante 45 segundos.
- (X) ciclos de:
 - 98 °C durante 30 segundos.
 - 60 °C durante 30 segundos.
 - 72°C durante 30 segundos.
- 72 °C durante 5 minutos.
- Mantenga la temperatura a 10 °C.

La duración total de los experimentos es de ~35 minutos.

| Tipo de muestra y panel | (X) Ciclos |
|--|------------|
| FPPE | 14 |
| Illumina Exome Panel (CEX) para ADNg de alta calidad | 10 |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Tipo de muestra y panel | (X) Ciclos |
|--------------------------------------|--------------------|
| Illumina Exome Panel (CEX) para FFPE | 12 |
| Todas las demás muestras y paneles | 12 ¹²³⁴ |

¹ Se puede ajustar hasta 15 ciclos para paneles pequeños de terceros mediante la optimización posterior. Si se usa FFPE, el número de ciclos se puede ajustar hasta 17.

² Se puede ajustar hasta 17 ciclos para paneles de terceros que solo tienen 500 sondas. Si se usa FFPE, el número de ciclos se puede ajustar hasta 19.

³ Se puede ajustar hasta 14 ciclos para muestras FFPE.

⁴ El aumento del número de ciclos de PCR podría dar como resultado una mayor tasa de duplicados y menores tamaños de fragmento para muestras FFPE.

Procedimiento

1. Añada 5 µl de PPC a cada pocillo.
2. Añada 20 µl de EPM a cada pocillo.
3. Selle la placa y agite a 1200 rpm durante 1 minuto.
4. Centrifugue la placa a 280 × g durante 10 segundos.
5. Colóquela en el ciclador térmico preprogramado y ejecute el programa de AMP.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, consérvela a una temperatura entre 2 °C y 8 °C durante un periodo de dos días como máximo. Como alternativa, déjela en el ciclador térmico durante un periodo de 24 horas como máximo.

Limpieza de las librerías enriquecidas amplificadas

En este paso, se usan bolas de limpieza para purificar la librería enriquecida y retirar los productos no deseados.

Consumibles

- CB (Bolas de limpieza)
- RSB (Tampón de resuspensión)
- Etanol al 80 % recién preparado (EtOH)
- Sellos adhesivos
- Placa MIDI de 96 pocillos
- Placa de PCR de 96 pocillos
- Soporte magnético de placa MIDI

Acerca de los reactivos

- Bolas de limpieza
 - Agite en vórtice antes de cada uso.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- Agite en vórtice frecuentemente para asegurarse de que las bolas están distribuidas de manera uniforme.
- Aspire y dispense lentamente debido a la viscosidad de la solución.

Preparación

1. Prepare los siguientes consumibles.

| Elemento | Conservación | Instrucciones |
|----------|----------------------|--|
| CB | Temperatura ambiente | Agite en vórtice y voltee para mezclar hasta que el color del líquido sea homogéneo. |
| RSB | Entre 2 °C y 8 °C | Deje que alcance la temperatura ambiente. Agite en vórtice para mezclar. |

2. Prepare EtOH al 80 % nuevo a partir de etanol absoluto.

Procedimiento

1. Centrifugue la placa de PCR a 280 × g durante 10 segundos.
2. Agite en vórtice las CB 3 veces durante 10 segundos y, a continuación, voltee.
3. Añada 40,5 µl de CB a cada pocillo de una placa **MIDI** nueva.
4. Transfiera 45 µl de cada pocillo de la placa de PCR al pocillo correspondiente de la placa MIDI.
5. Selle la placa y agite a 1800 rpm durante 1 minuto.
6. Incube la placa MIDI a temperatura ambiente durante 5 minutos.
7. Centrifugue a 280 × g durante 10 segundos.
8. Colóquela en un soporte magnético de placa MIDI y espere hasta que el líquido esté transparente (5 minutos).
9. Mediante el uso de una pipeta ajustada a 95 µl, retire y deseche todo el sobrenadante de cada pocillo.
10. Lave dos veces de la siguiente manera.
 - a. Mientras permanece la placa en el soporte magnético, añada 200 µl de EtOH al 80 % nuevo sin mezclar.
 - b. Incube durante 30 segundos.
 - c. Sin alterar las bolas, retire y deseche el sobrenadante.
11. Seque al aire en el soporte magnético durante 5 minutos.
12. Al tiempo que se seca al aire, use una pipeta de 20 µl para retirar y desechar el EtOH residual de cada pocillo.
13. Retírela del soporte magnético y añada 32 µl de RSB a cada pocillo.
14. Selle la placa y agite a 1800 rpm durante 1 minuto.
15. Incube la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos.
16. Centrifugue a 280 × g durante 10 segundos.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

17. Colóquela en un soporte magnético de placa MIDI y espere hasta que el líquido esté transparente (2 minutos).
18. Transfiera 30 µl de sobrenadante de la placa MIDI de 96 pocillos al pocillo correspondiente de una placa de PCR nueva.
19. Deseche la placa MIDI.

PUNTO DE DETENCIÓN DE SEGURIDAD

Si va a detener el proceso, selle la placa y almacénela a una temperatura comprendida entre -25 °C y -15 °C durante un periodo de 7 días como máximo.

Comprobación de librerías enriquecidas

A fin de cuantificar la entrada de ADNg bicatenario, use un método basado en fluorescencia que use colorante intercalado. Evite los métodos que midan el ácido nucleico total, tales como NanoDrop u otros métodos de absorbancia UV.

1. Analice 1 µl de las librerías enriquecidas usando su método de cuantificación.

NOTA La molaridad total de la sonda influye proporcionalmente en el rendimiento de la librería tras el enriquecimiento.

Se prevé un tamaño de fragmento medio de 125-235 pb y una distribución de los fragmentos de ADN con un intervalo de tamaño de ~200 bp a ~1000 pb.

Dilución de librerías hasta la concentración de partida

En este paso, se diluyen las librerías hasta la concentración de partida para su sistema de secuenciación y es el primer paso de una dilución en serie. Después de diluir hasta la concentración de partida, las librerías están listas para ser desnaturalizadas y diluidas hasta la concentración de carga final.

En la secuenciación, independientemente del panel de sonda de enriquecimiento que esté usando, Illumina recomienda la configuración de un experimento "paired-end" con 151 ciclos por lectura (2 × 151) y 10 ciclos por lectura del índice. Si desea menos lecturas superpuestas o menos cobertura sin procesar, puede secuenciar hasta 2 × 126 o 2 × 101.

1. Calcule el valor de molaridad de la librería o de las librerías agrupadas mediante la siguiente fórmula.
 - En las librerías calificadas en un analizador de fragmentos de ADN, use el tamaño promedio obtenido para la librería.
 - En todos los demás métodos de calificación, use 350 pb como tamaño de librería promedio.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{tamaño de librería promedio (pb)}} = \text{Molaridad (nM)}$$

Por ejemplo, si su concentración de librería es de 20 ng/μl y el tamaño promedio es de 350 pb, el valor de molaridad resultante es de 86,58 nM.

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

2. Mediante el uso del valor de molaridad, calcule los volúmenes de RSB y de librería que se necesitan para diluir las librerías hasta la concentración de partida en su sistema.

| Sistema de secuenciación | Volumen de librería requerido mínimo (μl) | Concentración de partida (nM) | Concentración de carga final (pM) |
|--------------------------|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| NextSeq 550Dx | 10 | 2 | 1,2 |
| MiSeqDx | 5 | 4 | 11 |
| NovaSeq 6000Dx | 150 (S2) o 310 (S4) | 1,75 | 350 |

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM es la concentración de partida para una concentración de carga final de 350 pM. Si es necesario, ajuste la concentración de carga final usando la siguiente tabla.

| Concentración de carga final (pM) | Concentración de librerías agrupadas (nM) |
|-----------------------------------|---|
| 100 | 0,50 |
| 150 | 0,75 |
| 200 | 1 |

| Concentración de carga final (pM) | Concentración de librerías agrupadas (nM) |
|-----------------------------------|---|
| 250 | 1,25 |
| 300 | 1,50 |
| 350 | 1,75 |
| 400 | 2 |
| 450 | 2,25 |
| 500 | 2,50 |

- Diluya las librerías usando RSB:
 - Librerías cuantificadas como agrupación de librerías multiplexadas:** diluya la agrupación hasta la concentración de partida en su sistema.
 - Librerías cuantificadas individualmente:** diluya cada librería hasta la concentración de partida en su sistema. Añada 10 µl de cada librería diluida a un tubo para crear una agrupación de librerías multiplexadas.
- Siga las instrucciones de desnaturalización y dilución para que su sistema diluya hasta la concentración de carga final.
 - Para obtener información sobre NextSeq 550Dx System, consulte la [Preparación de secuenciación de NextSeq 550Dx en la página 51](#).
 - Para obtener información sobre MiSeqDx System, consulte la [Preparación de secuenciación de MiSeqDx en la página 53](#).
 - Para obtener información sobre NovaSeq 6000Dx System, consulte la [Preparación de secuenciación de NovaSeq 6000Dx en la página 54](#).

Las concentraciones de carga finales son una guía general y de punto de partida. Optimice las concentraciones para su flujo de trabajo y su método de cuantificación en sucesivos experimentos de secuenciación o mediante la titulación de la celda de flujo.

Preparación de secuenciación de NextSeq 550Dx

Use las siguientes instrucciones para desnaturalizar y diluir las librerías para la secuenciación en el sistema de secuenciación de NextSeq 550Dx.

Consumibles

- HT1 (Tampón de hibridación)
- NaOH 1 N
- Tris-HCl 200 mM, a pH 7,0

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Preparación

Prepare una dilución *nueva* de NaOH 0,2 N para desnaturalizar las librerías para la secuenciación. Para evitar que pequeños errores de pipeteado afecten a la concentración final de NaOH, se preparará un volumen mayor.



PRECAUCIÓN

El NaOH 0,2 N recién diluido es fundamental para el proceso de desnaturalización. La desnaturalización inadecuada puede reducir el rendimiento.

1. Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrífuga para diluir NaOH 1 N a NaOH 0,2 N:

1. Prepare los siguientes consumibles.

| Elemento | Conservación | Instrucciones |
|----------|--------------------------|--|
| HT1 | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele a temperatura ambiente. Conserve a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta que esté listo para diluir las librerías desnaturalizadas. |

2. Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrífuga para preparar una dilución nueva de NaOH:

- Agua de laboratorio (800 µl)
- NaOH 1N (200 µl)

El resultado es 1 ml de NaOH 0,2 N.

3. Invierta el tubo varias veces para mezclar.

4. Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrífuga para preparar Tris-HCl 200 mM, a pH 7,0.

- Agua de laboratorio (800 µl)
- Tris-HCl 1 M, a pH 7,0 (200 µl)

El resultado es 1 ml de Tris-HCl 200 mM, a pH 7,0.

NOTA Mantenga el tubo tapado. Use la dilución nueva antes de que transcurran **12 horas**.

Desnaturalización de librerías

1. Combine los siguientes volúmenes de librería y NaOH 0,2 N de nueva dilución en un tubo de microcentrífuga.

- 10 µl de librería
- 10 µl de NaOH 0,2 N

2. Agite en vórtice brevemente y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.

3. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.

4. Añada 10 µl de Tris-HCl 200 mM, a pH 7.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Dilución de librerías desnaturalizadas hasta 20 pM

1. Añada 970 µl de HT1 enfriado previamente en el tubo de librerías desnaturalizadas.
El resultado es una librería desnaturalizada 20 pM.
2. Agite en vórtice brevemente y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
3. Coloque las librerías 20 pM en hielo hasta que esté listo para proceder a la dilución final.

Dilución de librerías hasta la concentración de carga

1. Añada los siguientes volúmenes para diluir la solución de librería 20 pM desnaturalizada hasta 1,2 pM.
 - Solución de librería desnaturalizada (78 µl)
 - HT1 enfriado previamente (1222 µl)El volumen total es 1,3 ml a 1,2 pM.
2. Invierta para mezclar y, a continuación, realice un centrifugado.
3. Proceda a realizar la secuenciación. Para obtener instrucciones, consulte la *Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (n.º de documento 100000009513)*.

Preparación de secuenciación de MiSeqDx

Use las siguientes instrucciones para desnaturalizar y diluir las librerías para la secuenciación en el sistema de secuenciación de MiSeqDx.

Consumibles

- HT1 (Tampón de hibridación)
- NaOH 1 N

Preparación

Prepare una dilución *nueva* de NaOH 0,2 N para desnaturalizar las librerías para la secuenciación. Para evitar que pequeños errores de pipeteado afecten a la concentración final de NaOH, se preparará un volumen mayor.



PRECAUCIÓN

El NaOH 0,2 N recién diluido es fundamental para el proceso de desnaturalización. La desnaturalización inadecuada puede reducir el rendimiento.

1. Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrífuga para diluir NaOH 1 N a NaOH 0,2 N:
 1. Prepare los siguientes consumibles.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Elemento | Conservación | Instrucciones |
|----------|-----------------------|--|
| HT1 | Entre -25 °C y -15 °C | Descongele a temperatura ambiente. Conserve a una temperatura entre 2 °C y 8 °C hasta que esté listo para diluir las librerías desnaturalizadas. |

2. Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrífuga para preparar una dilución nueva de NaOH:

- Agua de laboratorio (800 µl)
- NaOH 1N (200 µl)

El resultado es 1 ml de NaOH 0,2 N.

NOTA Mantenga el tubo tapado. Use la dilución nueva antes de que transcurran **12 horas**.

Desnaturalización de una librería 4 nM

1. Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrífuga.
 - Librería 4 nM (5 µl)
 - NaOH 0,2 N (5 µl)
2. Agite en vórtice brevemente y, a continuación, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
3. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Añada 990 µl de HT1 enfriado previamente en el tubo que contiene la librería desnaturalizada.
El resultado es 1 ml de librería desnaturalizada 20 pM.

Dilución de una librería 20 pM desnaturalizada

1. Diluya hasta la concentración deseada usando los siguientes volúmenes.

| Concentración | 6 pM | 8 pM | 10 pM | 11 pM | 12 pM | 15 pM | 20 pM |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Librería 20 pM | 180 µl | 240 µl | 300 µl | 330 µl | 360 µl | 450 µl | 600 µl |
| HT1 enfriado previamente | 420 µl | 360 µl | 300 µl | 270 µl | 240 µl | 150 µl | 0 µl |

2. Invierta para mezclar y, a continuación, realice un centrifugado.
3. Proceda a realizar la secuenciación. Para obtener instrucciones, consulte la *Guía de referencia de MiSeqDx Instrument para MOS v4 (n.º de documento 1000000157953)*.

Preparación de secuenciación de NovaSeq 6000Dx

Use las siguientes instrucciones para desnaturalizar y diluir las librerías para la secuenciación en el sistema de secuenciación de NovaSeq 6000Dx.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Consumibles

- HP3 (NaOH 2 N)
- RSB (Tampón de resuspensión)
- NaOH 1 N
- Tris-HCl 10 mM, pH 8,5
- Tris-HCl 400 mM, pH 8,0
- Tubo de librerías de NovaSeq 6000Dx

Preparación

Prepare una dilución *nueva* de NaOH 0,2 N para desnaturalizar las librerías para la secuenciación. Para evitar que pequeños errores de pipeteado afecten a la concentración final de NaOH, se preparará un volumen mayor.



PRECAUCIÓN

El NaOH 0,2 N recién diluido es fundamental para el proceso de desnaturalización. La desnaturalización inadecuada puede reducir el rendimiento.

1. Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrífuga para diluir NaOH 1 N a NaOH 0,2 N:

Tabla 4 Modo S2

| Reactivo | Volumen para una celda de flujo (µl) | Volumen para dos celdas de flujo (µl) |
|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Agua de laboratorio | 40 | 80 |
| Preparado de NaOH 1 N | 10 | 20 |

Estos volúmenes producen 50 µl de NaOH 0,2 N para una celda de flujo o 100 µl de NaOH 0,2 N para dos celdas de flujo.

Tabla 5 Modo S4

| Reactivo | Volumen para una celda de flujo (µl) | Volumen para dos celdas de flujo (µl) |
|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Agua de laboratorio | 80 | 160 |
| Preparado de NaOH 1 N | 20 | 40 |

Estos volúmenes producen 100 µl de NaOH 0,2 N para una celda de flujo o 200 µl de NaOH 0,2 N para dos celdas de flujo.

2. Invierta varias veces para mezclar o agite en vórtice bien.

NOTA Mantenga el tubo tapado. Use la dilución nueva antes de que transcurran **12 horas**.

Creación de un grupo de librerías normalizadas

La concentración de carga puede variar en función de los métodos de preparación, cuantificación y normalización de librerías.

Use las siguientes instrucciones para normalizar librerías a la concentración adecuada y, después, agruparlas. Las librerías secuenciadas en la misma celda de flujo deben combinarse en un solo grupo normalizado.

NOTA El número máximo de muestras que se pueden ejecutar por carril con Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit es de 192. Este límite se debe al número total de índices UD en el conjunto A y B.

Normalización de librerías para agruparlas

- Determine la concentración necesaria de librerías agrupadas conforme a la concentración de carga final deseada.
 - Para una concentración de carga final de 350 pM, la concentración de librerías agrupadas requerida es de 1,75 nM.
 - Para determinar la concentración de librerías agrupadas para una concentración de carga final diferente, consulte [Dilución de librerías hasta la concentración de partida en la página 50](#).
- Normalice las librerías hasta la concentración deseada para librerías agrupadas con Tris-HCl 10 mM, a pH 8,5.
Para obtener ayuda sobre la dilución de librerías hasta la concentración adecuada, consulte la [Calculadora de agrupación](#) en el sitio web de Illumina.

Concentraciones de carga recomendadas

La concentración de carga de ADN óptima depende del tipo de librería y el tamaño del fragmento. Para librerías >450 pb, podrían ser necesarias concentraciones de carga más altas.

Agrupación de librerías normalizadas y adición de control PhiX opcional

- Combine el volumen adecuado de cada librería normalizada en un tubo de microcentrífuga nuevo para generar uno de los siguientes volúmenes finales:

| Modo | Volumen final (µl) |
|------|--------------------|
| S2 | 150 |
| S4 | 310 |

- [Opcional]** Enriquezca con el 1 % de PhiX> no desnaturalizado como se indica a continuación.
 - Diluya PhiX 10 nM a 2,5 nM con Tris-HCl 10 mM, a pH 8,5.

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- b. Añada el volumen adecuado de PhiX 2,5 nM no desnaturalizado al tubo del grupo de librerías no desnaturalizadas.

| Modo | PhiX 2,5 nM no desnaturalizado (µl) | Grupo de librerías no desnaturalizadas (µl) |
|------|-------------------------------------|---|
| S2 | 0,9 | 150 |
| S4 | 1,9 | 310 |

Cuando enriquece con PhiX, el 1 % es la cantidad recomendada para lograr librerías bien equilibradas. Es posible que las librerías de baja diversidad necesiten más. Para usar un control PhiX con librerías de baja diversidad, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para que le orienten.

Desnaturalización de grupos de librerías y control PhiX opcional

1. Añada NaOH 0,2 N al tubo del grupo de librerías no desnaturalizadas y un control PhiX opcional, tal como se describe a continuación.

| Celda de flujo | NaOH 0,2N | Grupo de librerías no desnaturalizadas (µl) | Volumen resultante |
|----------------|-----------|---|----------------------------|
| S2 | 37 | 150 | 187 µl o 187,9 µl con PhiX |
| S4 | 77 | 310 | 387 µl o 388,9 µl con PhiX |

2. Tape y agite en vórtice brevemente.
3. Centrifugue a 280 × g durante 1 minuto como máximo.
4. Incube a temperatura ambiente durante 8 minutos para desnaturalizar.
5. Añada Tris-HCl 400 mM, a pH 8,0 tal como se describe a continuación, para neutralizar.

| Modo | Tris-HCl 400 mM, a pH 8 (µl) | Volumen resultante |
|------|------------------------------|----------------------------|
| S2 | 38 | 225 µl o 225,9 µl con PhiX |
| S4 | 78 | 465 µl o 466,9 µl con PhiX |

6. Tape y agite en vórtice brevemente.
7. Centrifugue a 280 × g durante 1 minuto como máximo.
8. Transfiera todo el volumen de librerías desnaturalizadas o librerías desnaturalizadas y PhiX al tubo de librerías NovaSeq 6000Dx.
9. Proceda a realizar la secuenciación. Para obtener instrucciones, consulte la *Documentación de patente de NovaSeq 6000Dx Instrument (n.º de documento 200010105)*.

Solución de problemas

Use la siguiente tabla para solucionar los problemas que surjan durante el flujo de trabajo. Si un experimento de secuenciación o la preparación de librerías para una muestra falla dos veces, puede ser necesaria una resolución de problemas adicional. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

| Observación | Causa posible | Acción recomendada |
|--|---|---|
| El experimento de secuenciación no supera las especificaciones del control de calidad del experimento | Error en el usuario o en el equipo de laboratorio en el flujo de trabajo del ensayo | <p>Califique las librerías enriquecidas para garantizar un rendimiento de librería y una distribución del tamaño de los fragmentos adecuados. Repita la preparación de librerías desde uno de los siguientes pasos según dónde se haya producido el supuesto error de uso o de equipo. Si se desconoce o se producen otros errores, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para iniciar la solución de problemas en su experimento.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Resequencie las librerías. Consulte Preparación de secuenciación de NextSeq 550Dx en la página 51, Preparación de secuenciación de MiSeqDx en la página 53 o Preparación de secuenciación de NovaSeq 6000Dx en la página 54. • Reenriquezca las librerías. Consulte Hibridación de sondas en la página 38. • Inicie la preparación de librerías desde el comienzo del flujo de trabajo. Consulte Instrucciones de uso en la página 22. |
| | Problemas con el instrumento | Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. |
| Error con la generación de FASTQ o error de sistema de secuenciación general (por ejemplo, error en la red, errores en la carga/descarga de reactivos, etc.) | Problemas con el software o el instrumento | <p>Consulte la <i>Guía de software de Local Run Manager (n.º de documento 100000002702)</i> para obtener ayuda con la generación FASTQ o consulte la <i>Guía de referencia de NextSeq 550Dx Instrument (n.º de documento 1000000009513)</i>, la <i>Guía de referencia de MiSeqDx Instrument para MOS v4 (n.º de documento 1000000157953)</i> o la <i>Documentación de producto de NovaSeq 6000Dx Instrument (n.º de documento 200010105)</i>.</p> <p>Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para obtener asistencia adicional.</p> |

| Observación | Causa posible | Acción recomendada |
|--|--|---|
| La librería de ADN no genera un rendimiento suficiente para la carga de la secuenciación | No se han cumplido los requisitos de entrada de muestras | Asegure la entrada de muestras adecuada y repita la preparación de librerías. Consulte Recomendaciones de entrada de muestras en la página 18 . |
| | Error en el uso o en el equipo laboratorio en el flujo de trabajo del ensayo | Repita la preparación de librerías desde uno de los siguientes pasos según dónde se haya producido el supuesto error de uso o de equipo. Si se desconoce o se producen otros errores, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para iniciar la solución de problemas en su experimento. <ul style="list-style-type: none"> • Resequencie las librerías. Consulte Preparación de secuenciación de NextSeq 550Dx en la página 51, Preparación de secuenciación de MiSeqDx en la página 53 o Preparación de secuenciación de NovaSeq 6000Dx en la página 54. • Reenriquezca las librerías. Consulte Hibridación de sondas en la página 38. • Inicie la preparación de librerías desde el comienzo del flujo de trabajo. Consulte Instrucciones de uso en la página 22. |
| | No se cumplieron los requisitos del panel de sondas de enriquecimiento | Asegure el panel de sonda de enriquecimiento adecuado y repita la preparación de librerías. Consulte Requisitos de panel de sonda de enriquecimiento en la página 11 . |

Características de rendimiento

Las características de rendimiento de DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application para NovaSeq 6000Dx se proporcionan en las *Instrucciones de uso de NovaSeq 6000Dx Instrument (n.º de documento 200025276)*.

Rendimiento con paneles de exoma completo

El rendimiento del panel de exoma se analizó usando la entrada más baja (50 ng) y la más alta (1000 ng) recomendada del ADNg de la línea celular de Coriell NA12878, con un conjunto de verdad conocido para la detección de variantes germinales (genoma Coriell Platinum). El panel de exoma 1 (45 Mb) y el panel de exoma 2 (36,8 Mb) se usaron como paneles representativos. Se analizaron 24 réplicas técnicas mediante el ensayo de

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx usando el panel de exoma 1 (45 Mb) en dos reacciones de enriquecimiento de 12 unidades de plexado. Se analizaron 12 réplicas técnicas mediante el ensayo de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx usando el panel de exoma 2 (36,8 Mb) en una reacción de enriquecimiento individual de 12 unidades de plexado. Las librerías enriquecidas se secuenciaron en el sistema de secuenciación NextSeq 550Dx con el módulo DNA GenerateFASTQ Dx de Local Run Manager.

En la siguiente tabla se muestran los valores medios de los criterios de medición de rendimiento de secuenciación secundaria y de llamada de variantes para las réplicas técnicas analizadas con cada panel.

Tabla 6 Rendimiento de ensayo con dos paneles de exoma completo

| Panel | Enriquecimiento de lectura única completado | Uniformidad de cobertura | Mediana de longitud de fragmento | Exhaustividad de SNV ¹ | Precisión de SNV ² | Exhaustividad de indel ¹ | Precisión de indel ² |
|----------------------------|---|--------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Panel de exoma 1 (45 Mb) | 80 % | 96 % | 186 pb | 96 % | 99 % | 90 % | 89 % |
| Panel de exoma 2 (36,8 Mb) | 93 % | 98 % | 188 pb | 96 % | 99 % | 92 % | 93 % |

¹Exhaustividad=positivos/(positivos verdaderos + falsos negativos)

²Precisión=positivos verdaderos/(positivos verdaderos + falsos positivos)

Límite de detección

Se usó el estándar de referencia de ADN Horizon HD799 para comprobar el límite de detección. El HD799 consiste en ADN tratado con formol moderadamente comprometido con SNV conocidas en frecuencias alélicas que varían entre el 1 % y el 24,5 %. Se usó la entrada de ADN más baja recomendada (50 ng) y se evaluó la tasa de detección de SNV con $\geq 5,0$ % de frecuencia alélica variantes (VAF, Variant Allele Frequency). Se analizaron 16 réplicas técnicas mediante el ensayo Illumina DNA Prep with Enrichment Dx usando el flujo de trabajo FFPE, enriquecidas con un panel de enriquecimiento de todos los cánceres (1,94 Mb) en 16 enriquecimientos (1 unidad de plexado), y, a continuación, se secuenciaron en un instrumento NextSeq 550Dx con el módulo DNA GenerateFASTQ Dx.

Todas las muestras superaron los requisitos de rendimiento de las muestras específicas del panel que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7 Rendimiento de las muestras para el límite de detección

| Panel | Tasa de detección de variantes de SNV de $\geq 5,0$ % de VAF | Promedio Uniformidad de cobertura |
|---|--|-----------------------------------|
| Panel de enriquecimiento de todos los cánceres (1,94 Mb, 523 genes) | 100 % | 99 % |

Sustancias interferentes

Se evaluó el impacto de los interferentes potenciales en Illumina DNA Prep with Enrichment Dx mediante la evaluación del rendimiento del ensayo en presencia de sustancias interferentes.

Interferencia con la sangre completa

El paracetamol (compuesto exógeno, fármaco), la creatinina y los triglicéridos (metabolitos endógenos) se analizaron añadiéndolos a muestras de sangre humana completa antes de la extracción del ADN. A fin de evaluar la interferencia resultante de la extracción de sangre (extracción breve), se añadió también EDTA a las muestras de sangre completa. Además, a fin de evaluar la interferencia resultante de la preparación de muestras, se añadió etanol de calidad molecular al ADN extraído de la sangre completa.

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de prueba por interferente.

Tabla 8 Sustancias potencialmente interferentes y concentraciones analizadas en sangre completa

| Sustancia de prueba | Concentración de prueba |
|-----------------------------|---|
| Paracetamol | 15,6 mg/dl* Tres veces la mayor concentración esperada tras una dosis terapéutica del fármaco. |
| Creatinina | 15 mg/dl* La mayor concentración observada en la población. |
| Triglicéridos | 1,5 g/dl* La mayor concentración observada en la población. |
| EDTA | 6 mg/ml Tres veces la concentración esperada en sangre, extraída en tubos de EDTA. |
| Etanol de calidad molecular | 15 % en v/v En el eluido posterior a la extracción de ADN. |

*Según el CLSI EP37-ED1:2018

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Por cada sustancia interferente, se analizaron 12 réplicas técnicas mediante el ensayo de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, enriquecidas con un panel de exoma 1 (45 Mb) en un enriquecimiento individual (12 unidades de plexado), y se secuenciaron, a continuación, en un instrumento NextSeq 550Dx con el módulo DNA GenerateFASTQ Dx.

En las sustancias analizadas, las 12 muestras cumplieron los requisitos de rendimiento de la muestra y no se observó ninguna interferencia en el rendimiento del ensayo.

Interferencia en tejido FFPE

Se analizaron dos muestras FFPE colorrectales en presencia y ausencia de hemoglobina a 0,1 mg por 10 µm de sección FFPE para representar la situación más desfavorable de contaminación del 50 % de la muestra de tejido FFPE por sangre con alto nivel de hemoglobina. Las muestras se analizaron mediante el ensayo de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx usando el panel de enriquecimiento de todos los cánceres 1 (1,94 Mb) como panel representativo en los enriquecimientos de plexado sencillo. A continuación, se secuenciaron las librerías enriquecidas en un instrumento NextSeq 550Dx con el módulo DNA GenerateFASTQ Dx. Todas las muestras cumplieron los requisitos de rendimiento de la muestra y se demostró que la hemoglobina no interfiere en el rendimiento del ensayo.

A fin de evaluar la interferencia resultante de la preparación de muestras, se añadieron dos compuestos exógenos en el ADN extraído de una muestra de tejido FFPE de cáncer de vejiga. Las sustancias exógenas analizadas son soluciones de extracción usadas habitualmente durante el proceso de extracción de ADN y se enumeran con las cantidades analizadas en la siguiente tabla.

Las soluciones de sustancias de prueba están disponibles de fuentes comerciales en kits de aislamiento de ADN basados en columna.

Tabla 9 Sustancias exógenas potencialmente interferentes y concentraciones analizadas en FFPE

| Sustancia de prueba | Concentración de prueba (µl/30 µl de eluido) |
|------------------------------------|--|
| Solución para eliminar la parafina | 113×10^{-6} |
| Tampón de lavado AW2 | 0,417 |

Por cada sustancia interferente, se analizaron ocho réplicas técnicas mediante el ensayo Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, enriquecidas con un panel de enriquecimiento de todos los cánceres (1,94 Mb) en los enriquecimientos de plexado sencillo, y a continuación se secuenciaron en un instrumento NextSeq 550Dx con el módulo DNA GenerateFASTQ Dx.

En ambas sustancias analizadas, las ocho muestras cumplieron los requisitos de rendimiento de la muestra y no se observó ninguna interferencia en el rendimiento del ensayo.

Contaminación cruzada

El ADN_g de la línea celular de Coriell NA12878 (femenina, 10 muestras), el ADN_g de la línea celular de Coriell NA12877 (masculina, 12 muestras) y los controles sin cadena molde (NTC [No Template Controls], 2 muestras) se analizaron mediante el ensayo de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en una disposición de placa en dámetro. En todas las muestras se usó la recomendación de entrada de ADN_g más alta (1000 ng) como condición más estricta para evaluar la contaminación cruzada de las muestras. Las pruebas fueron realizadas dos veces por dos operarios distintos. El panel de exoma 1 (45 Mb) se usó en reacciones de enriquecimiento de 12 unidades de plexado. Se secuenciaron las librerías enriquecidas en NextSeq 550Dx con DNA GenerateFASTQ Dx. La evaluación se realizó valorando la cobertura del cromosoma Y específico masculino en las muestras femeninas mediante la comparación con los niveles de fondo de una placa completa de muestras femeninas, así como la representación del índice de las muestras sin cadena molde (NTC).

Tabla 10 Resultados de la contaminación cruzada

| Muestras femeninas con cobertura del cromosoma Y masculino en <3x el ruido de fondo | Representación de índice en muestras sin cadena molde |
|---|---|
| 100 % | <0,0005 % |

Apéndice: Secuencias de adaptadores de índices UD de Illumina

Estos adaptadores de índice doble único (UD) están dispuestos en la placa para aplicar la estrategia de emparejamiento recomendada. Los adaptadores de índices son de 10 bases de largo, en lugar de las típicas ocho bases.

Adaptadores de Índice 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Adaptadores de Índice 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

La siguiente secuencia se usa para el recorte de adaptadores de Lectura 1 y Lectura 2.

CTGTCTCTTATACACATCT

Placa A/Conjunto 1 de adaptadores de índice

| Nombre de índice | Bases de i7 en el adaptador | Bases de i5 en el adaptador |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| UDP0001 | CGCTCAGTTC | TCGTGGAGCG |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Nombre de índice | Bases de i7 en el adaptador | Bases de i5 en el adaptador |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| UDP0002 | TATCTGACCT | CTACAAGATA |
| UDP0003 | ATATGAGACG | TATAGTAGCT |
| UDP0004 | CTTATGGAAT | TGCCTGGTGG |
| UDP0005 | TAATCTCGTC | ACATTATCCT |
| UDP0006 | GCGCGATGTT | GTCCACTTGT |
| UDP0007 | AGAGCACTAG | TGGAACAGTA |
| UDP0008 | TGCCTTGATC | CCTTGTTAAT |
| UDP0009 | CTACTCAGTC | GTTGATAGTG |
| UDP0010 | TCGTCTGACT | ACCAGCGACA |
| UDP0011 | GAACATACGG | CATACACTGT |
| UDP0012 | CCTATGACTC | GTGTGGCGCT |
| UDP0013 | TAATGGCAAG | ATCACGAAGG |
| UDP0014 | GTGCCGCTTC | CGGCTCTACT |
| UDP0015 | CGGCAATGGA | GAATGCACGA |
| UDP0016 | GCCGTAACCG | AAGACTATAG |
| UDP0017 | AACCATTCTC | TCGGCAGCAA |
| UDP0018 | GGTTGCCTCT | CTAATGATGG |
| UDP0019 | CTAATGATGG | GGTTGCCTCT |
| UDP0020 | TCGGCCTATC | CGCACATGGC |
| UDP0021 | AGTCAACCAT | GGCCTGTCCT |
| UDP0022 | GAGCGCAATA | CTGTGTTAGG |
| UDP0023 | AACAAGGCGT | TAAGGAACGT |
| UDP0024 | GTATGTAGAA | CTAACTGTAA |
| UDP0025 | TTCTATGGTT | GGCGAGATGG |
| UDP0026 | CCTCGCAACC | AATAGAGCAA |
| UDP0027 | TGGATGCTTA | TCAATCCATT |
| UDP0028 | ATGTCGTGGT | TCGTATGCGG |
| UDP0029 | AGAGTGCGGC | TCCGACCTCG |
| UDP0030 | TGCCTGGTGG | CTTATGGAAT |
| UDP0031 | TGCGTGTAC | GCTTACGGAC |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Nombre de índice | Bases de i7 en el adaptador | Bases de i5 en el adaptador |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 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 | GACAACGTAA |
| 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 | ACAGTTCCAG |
| UDP0061 | TGATTAGCCA | AGGCATGTAG |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Nombre de índice | Bases de i7 en el adaptador | Bases de i5 en el adaptador |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| UDP0062 | TAACAGTGTT | GCAAGTCTCA |
| UDP0063 | ACCGCGCAAT | TTGGCTCCGC |
| UDP0064 | GTTTCGCGCCA | AACTGATACT |
| UDP0065 | AGACACATTA | GTAAGGCATA |
| UDP0066 | GCGTTGGTAT | AATTGCTGCG |
| UDP0067 | AGCACATCCT | TTACAATTCC |
| UDP0068 | TTGTTCCGTG | AACCTAGCAC |
| UDP0069 | AAGTACTCCA | TCTGTGTGGA |
| UDP0070 | ACGTCAATAC | GGAATTCCAA |
| UDP0071 | GGTGTACAAG | AAGCGCGCTT |
| UDP0072 | CCACCTGTGT | TGAGCGTTGT |
| UDP0073 | GTTCCGCAGG | ATCATAGGCT |
| UDP0074 | ACCTTATGAA | TGTTAGAAGG |
| UDP0075 | CGCTGCAGAG | GATGGATGTA |
| UDP0076 | GTAGAGTCAG | ACGGCCGTCA |
| UDP0077 | GGATACCAGA | CGTTGCTTAC |
| UDP0078 | CGCACTAATG | TGACTACATA |
| UDP0079 | TCCTGACCGT | CGGCCTCGTT |
| UDP0080 | CTGGCTTGCC | CAAGCATCCG |
| UDP0081 | ACCAGCGACA | TCGTCTGACT |
| UDP0082 | TTGTAACGGT | CTCATAGCGA |
| UDP0083 | GTAAGGCATA | AGACACATTA |
| UDP0084 | GTCCACTTGT | GCGCGATGTT |
| UDP0085 | TTAGGTACCA | CATGAGTACT |
| UDP0086 | GGAATTCCAA | ACGTCAATAC |
| UDP0087 | CATGTAGAGG | GATACCTCCT |
| UDP0088 | TACACGCTCC | ATCCGTAAGT |
| UDP0089 | GCTTACGGAC | CGTGTATCTT |
| UDP0090 | CGCTTGAAGT | GAACCATGAA |
| UDP0091 | CGCCTTCTGA | GGCCATCATA |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Nombre de índice | Bases de i7 en el adaptador | Bases de i5 en el adaptador |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| UDP0092 | ATACCAACGC | ACATACTTCC |
| UDP0093 | CTGGATATGT | TATGTGCAAT |
| UDP0094 | CAATCTATGA | GATTAAGGTG |
| UDP0095 | GGTGAATAAC | ATGTAGACAA |
| UDP0096 | TGGACGGAGG | CACATCGGTG |

Placa B/Conjunto 2 de adaptadores de índice

| Nombre de índice | Bases de i7 en el adaptador | Bases de i5 en el adaptador |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| UDP0097 | CTGACCGGCA | CCTGATACAA |
| UDP0098 | GAATTGAGTG | TTAAGTTGTG |
| UDP0099 | GCGTGTGAGA | CGGACAGTGA |
| UDP0100 | TCTCCATTGA | GCACTACAAC |
| UDP0101 | ACATGCATAT | TGGTGCCTGG |
| UDP0102 | CAGGCGCCAT | TCCACGGCCT |
| UDP0103 | ACATAACGGA | TTGTAGTGTA |
| UDP0104 | TTAATAGACC | CCACGACACG |
| UDP0105 | ACGATTGCTG | TGTGATGTAT |
| UDP0106 | TTCTACAGAA | GAGCGCAATA |
| UDP0107 | TATTGCGTTC | ATCTTACTGT |
| UDP0108 | CATGAGTACT | ATGTCTGTGGT |
| UDP0109 | TAATTCTACC | GTAGCCATCA |
| UDP0110 | ACGCTAATTA | TGGTTAAGAA |
| UDP0111 | CCTTGTTAAT | TGTTGTTCGT |
| UDP0112 | GTAGCCATCA | CCAACAACAT |
| UDP0113 | CTTGTAATTC | ACCGGCTCAG |
| UDP0114 | TCCAATTCTA | GTTAATCTGA |
| UDP0115 | AGAGCTGCCT | CGGCTAACGT |
| UDP0116 | CTTCGCCGAT | TCCAAGAATT |
| UDP0117 | TCGGTCACGG | CCGAACGTTG |
| UDP0118 | GAACAAGTAT | TAACCGCCGA |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Nombre de índice | Bases de i7 en el adaptador | Bases de i5 en el adaptador |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| UDP0119 | AATTGGCGGA | CTCCGTGCTG |
| UDP0120 | GGCCTGTCCT | CATTCCAGCT |
| UDP0121 | TAGGTTCTCT | GGTTATGCTA |
| UDP0122 | ACACAATATC | ACCACACGGT |
| UDP0123 | TTCCTGTACG | TAGGTTCTCT |
| UDP0124 | GGTAACGCAG | TATGGCTCGA |
| UDP0125 | TCCACGGCCT | CTCGTGCGTT |
| UDP0126 | GATACCTCCT | CCAGTTGGCA |
| UDP0127 | CAACGTCAGC | TGTTTCGCATT |
| UDP0128 | CGGTTATTAG | AACCGCATCG |
| UDP0129 | CGCGCCTAGA | CGAAGGTAA |
| UDP0130 | TCTTGGCTAT | AGTGCCACTG |
| UDP0131 | TCACACCGAA | GAACAAGTAT |
| UDP0132 | AACGTTACAT | ACGATTGCTG |
| UDP0133 | CGGCCTCGTT | ATACCTGGAT |
| UDP0134 | CATAACACCA | TCCAATTCTA |
| UDP0135 | ACAGAGGCCA | TGAGACAGCG |
| UDP0136 | TGGTGCCTGG | ACGCTAATTA |
| UDP0137 | TAGGAACCGG | TATATTTCGAG |
| UDP0138 | AATATTGGCC | CGGTCCGATA |
| UDP0139 | ATAGGTATTC | ACAATAGAGT |
| UDP0140 | CCTTCACGTA | CGGTTATTAG |
| UDP0141 | GGCCAATAAG | GATAACAAGT |
| UDP0142 | CAGTAGTTGT | AGTTATCACA |
| UDP0143 | TTCATCCAAC | TTCCAGGTAA |
| UDP0144 | CAATTGGATT | CATGTAGAGG |
| UDP0145 | GGCCATCATA | GATTGTCATA |
| UDP0146 | AATTGCTGCG | ATTCCGCTAT |
| UDP0147 | TAAGGAACGT | GACCGCTGTG |
| UDP0148 | CTATACGCGG | TAGGAACCGG |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Nombre de índice | Bases de i7 en el adaptador | Bases de i5 en el adaptador |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| UDP0149 | ATTCAGAATC | AGCGGTGGAC |
| UDP0150 | GTATTCTCTA | TATAGATTTCG |
| UDP0151 | CCTGATACAA | ACAGAGGCCA |
| UDP0152 | GACCGCTGTG | ATTCTTATTG |
| UDP0153 | TTCAGCGTGG | TATTCCTCAG |
| UDP0154 | AACTCCGAAC | CGCCTTCTGA |
| UDP0155 | ATTCCGCTAT | GCGCAGAGTA |
| UDP0156 | TGAATATTGC | GGCGCCAATT |
| UDP0157 | CGCAATCTAG | AGATATGGCG |
| UDP0158 | AACCGCATCG | CCTGCTTGGT |
| UDP0159 | CTAGTCCGGA | GACGAACAAT |
| UDP0160 | GCTCCGTCAC | TGGCGGTCCA |
| UDP0161 | AGATGGAATT | CTTCAGTTAC |
| UDP0162 | ACACCGTTAA | TCCTGACCGT |
| UDP0163 | GATAACAAGT | CGCGCCTAGA |
| UDP0164 | CTGGTACACG | AGGATAAGTT |
| UDP0165 | CGAAGGTAA | AGGCCAGACA |
| UDP0166 | ATCGCATATG | CCTTGAACGG |
| UDP0167 | ATCATAGGCT | CACCACCTAC |
| UDP0168 | GATTGTCATA | TTGCTTGTAT |
| UDP0169 | CCAACAACAT | CAATCTATGA |
| UDP0170 | TTGGTGGTGC | TGGTACTGAT |
| UDP0171 | GCGAACGCCT | TTCATCCAAC |
| UDP0172 | CAACCGGAGG | CATAACACCA |
| UDP0173 | AGCGGTGGAC | TCCTATTAGC |
| UDP0174 | GACGAACAAT | TCTCTAGATT |
| UDP0175 | CCACTGGTCC | CGCGAGCCTA |
| UDP0176 | TGTTAGAAGG | GATAAGCTCT |
| UDP0177 | TATATTCGAG | GAGATGTCGA |
| UDP0178 | CGCGACGATC | CTGGATATGT |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

| Nombre de índice | Bases de i7 en el adaptador | Bases de i5 en el adaptador |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| UDP0179 | GCCTCGGATA | GGCCAATAAG |
| UDP0180 | TGAGACAGCG | ATTACTCACC |
| UDP0181 | TGTTTCGCATT | AATTGGCGGA |
| UDP0182 | TCCAAGAATT | TTGTCAACTT |
| UDP0183 | GCTGTAGGAA | GGCGAATTCT |
| UDP0184 | ATACCTGGAT | CAACGTCAGC |
| UDP0185 | GTTGGACCGT | TCTTACATCA |
| UDP0186 | ACCAAGTTAC | CGCCATACCT |
| UDP0187 | GTGTGGCGCT | CTAATGTCTT |
| UDP0188 | GGCAGTAGCA | CAACCGGAGG |
| UDP0189 | TGCGGTGTTG | GGCAGTAGCA |
| UDP0190 | GATTAAGGTG | TTAGGATAGA |
| UDP0191 | CAACATTCAA | CGCAATCTAG |
| UDP0192 | GTGTTACCGG | GAGTTGTACTION |

Historial de revisiones

| Documento | Fecha | Descripción del cambio |
|--------------------------------|--------------------|---|
| N.º de documento 200019584 v02 | Septiembre de 2022 | Se ha añadido contenido para soportar la secuenciación en NovaSeq 6000Dx Instrument. |
| N.º de documento 200019584 v01 | Mayo de 2022 | Se han añadido los nombres del sistema de secuenciación y los números de catálogo. Se ha eliminado la información de índices dobles únicos para las librerías de índice único. |
| N.º de documento 200019584 v00 | Mayo de 2022 | Publicación inicial. |

Instrucciones de uso de Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Patentes y marcas comerciales

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina") y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor o similares derechos de terceros.

Para asegurar el uso correcto y seguro de los productos descritos en este documento, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir las instrucciones incluidas en este de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEE COMPLETAMENTE EL DOCUMENTO Y NO SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES DESCRITAS EN ESTE, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES PERSONALES, INCLUIDOS LOS USUARIOS U OTRAS PERSONAS Y DAÑOS EN OTROS BIENES Y QUEDARÁ ANULADA TODA GARANTÍA APLICABLE AL PRODUCTO.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA DERIVADA DEL USO INCORRECTO DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS O EL SOFTWARE).

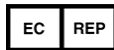
© 2022 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Todas las marcas comerciales pertenecen a Illumina, Inc. o a sus respectivos propietarios. Para obtener información específica sobre las marcas comerciales, consulte www.illumina.com/company/legal.html.

Información de contacto



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 (EE. UU.)
+1 800 809 ILMN (4566)
+ 1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Países Bajos

Patrocinador australiano

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

Etiquetado de productos

Para obtener una información detallada sobre los símbolos que aparecen en las etiquetas o en el embalaje del producto, consulte la leyenda que se ofrece en support.illumina.com en la ficha *Documentation* (Documentación) del kit.