

IN VITRO DIAGNOSTILISEKS KASUTAMISEKS
AINULT EKSPORDIKS

Kasutusotstarve

Komplekt Illumina[®] DNA Prep with Enrichment Dx on reaktiivide ja kulutarvikute komplekt, mida kasutatakse prooviteekide ettevalmistamiseks inimese rakkudest ja koest saadud genoomsest DNA-st. Kindlaid huvipakkuvaid genoomipiirkondi sihtivate teekide ettevalmistamiseks on vajalikud kasutaja hangitud sondipaneelid. Loodud prooviteegid on ette nähtud Illumina sekveneerimissüsteemides kasutamiseks.

Protseduuri põhimõtted

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on ette nähtud selliste DNA sekveneerimisteede ettevalmistamiseks, mis on rikastatud inimese rakkudest ja kudetest pärineva genoomse DNA sihtpiirkondade jaoks.

Sihtmärgi rikastamiseks on vaja kasutaja tarnitud biotinüülitud oligonukleotiidipaneele. Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ühildub erinevate paneelisuurustega, sealhulgas väikestest paneelidest (< 20 000 sondi) kuni suurte paneelideni (> 200 000 sondi). Loodud rikastatud teegid on ette nähtud Illumina sekveneerimissüsteemides sekveneerimiseks.

Komplektiga Illumina DNA Prep with Enrichment Dx seotud protseduur koosneb järgmistest etappidest.

- **Genoomse DNA märgistamine** – kasutab DNA sisendi märgistamiseks toodet Enrichment BLT Small (eBLTS). Märgistamise ajal fragmenteeritakse gDNA ja märgistatakse adapteritega ühes etapis. EBLTS-i küllastamiseks märgistamisreaktsioonis on vajalik minimaalselt 50 ng DNA sisend. Küllastumise korral fragmenteerib eBLTS teatud arvu DNA molekule, et luua järjepideva fragmendi suuruse jaotusega normaliseeritud teegid.
- **Märgistamisjärgne puhastus** – puhastab eBLTS-is adapteriga märgistatud DNA, et seda amplifitseerimisel kasutada.
- **Märgistatud DNA amplifitseerimine** – amplifitseerib märgistatud DNA-d, kasutades piiratud tsükliga PCR-programmi. DNA fragmentide otstesse lisatakse unikaalsed kahekordsed (UD) indeksid, mis võimaldavad DNA teekide kahekordset ainulaadset võotkudeerimist ja klasteri loomist sekveneerimise ajal.
- **Teekide puhastamine** – kasutab helmeste puhastamise protseduuri amplifitseeritud DNA teekide puhastamiseks ja nende suuruse valimiseks.
- **Teekide kogumine** – kombineerib ainulaadsete indeksitega DNA teegid üheks kuni 12 teegist koosnevaks kogumiks. Saate koguda teeke mahu või massi järgi.
- **Sondide hübriidatsioon** – koosneb hübriidatsioonireaktsioonist, mille käigus kaheaahelised DNA teegid denatureeritakse ja biotinüülitud DNA sondide paneel hübriidiseeritakse genoomsete sihtpiirkondadega.

- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ühildub mitme paneeliga. Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ei sisalda rikastuspaneeli. Sondipaneelid tarnib kasutaja ja need peavad vastama nõutavatele spetsifikatsioonidele. Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid ühilduvad nii Illumina kui ka kolmanda poole rikastamise DNA oligonukleotiidipaneelidega, mis vastavad nõutud spetsifikatsioonidele. Teavet kolmandate poolte paneelide nõutavate spetsifikatsioonide kohta vt jaotisest [Rikastussondi paneeli nõuded leheküljel 9](#).
- **Hübridiseeritud sondide sidumine** – kasutab sihitud huvipiirkondadele hübridiseeritud biotinüülitud sondide sidumiseks magnethelmeid Streptavidin Magnetic Beads (SMB3).
- **Rikastatud teekide amplifitseerimine** – kasutab rikastatud teekide amplifitseerimiseks PCR-i.
- **Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine** – sekvenerimiseks valmis rikastatud teekide puhastamiseks kasutatakse helmepuhastuse protseduuri.
- **Sekvenerimine** – rikastatud teekide sekvenerimine toimub sekvenerimissüsteemis MiSeqDx, NextSeq 550Dx või NovaSeq 6000Dx. Süsteemide MiSeqDx ja NextSeq 550Dx puhul kasutatakse rakenduse Local Run Manager integreeritud moodulit DNA GenerateFASTQ Dx sekvenerimiskäituse seadistamiseks, käituse jälgimiseks ja esmaseks analüüsiks (FASTQ loomine aluse nimetamistest). Süsteemi NovaSeq 6000Dx puhul kasutatakse rakendust DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx seadistuse ja teisese analüüsi käitamiseks mitme saadaoleva töövoos abil.

Protseduuri piirangud

- Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ühildub inimese rakkudest ja kudetest pärineva genoomse DNA-ga.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ühildub kaheaheelalise gDNA sisenditega 50–1000 ng. Nendest lävedest väljapoole jäävate sisendite puhul ei ole toimivus tagatud.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ei sisalda DNA eraldamiseks mõeldud reaktiive. Analüütiliste testimiste tulemused, sealhulgas segava mõju testid, mis on esitatud jaotises [Toimivusnäitajad leheküljel 55](#), on saadud täisverest ja FFPE-st kui representatiivsetest proovitüüpidest koos tüüpiliste DNA eraldamiskomplektidega. Kõik diagnostilised testid, mis on välja töötatud kasutamiseks koos komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiividega, nõuavad täielikku valideerimist kõigi valitud DNA eraldamiskomplekti toimivusaspektide jaoks.
- Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx ei ole soovitatud kasutamiseks kehva kvaliteediga FFPE proovide puhul, mille $\Delta Cq > 5$. Proovide, mille $\Delta Cq > 5$, kasutamine võib suurendada teegi ettevalmistamise nurjumise tõenäosust ja vähendada analüüsi toimivust.
- Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid on konfigureeritud ja testitud järgmises tabelis näidatud proovisisendi, rikastamisreaktsioonide ja kordsuse suhtes.

Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx	Proovisisend	Rikastamise reaktsioonid	Rikastamise kordsus
16 prooviga komplekt	Halb kvaliteet (FFPE)	16 reaktsiooni	1-kordne
96 prooviga komplekt	Hea kvaliteet (nt täisveri)	8 reaktsiooni	12-kordne

- FFPE sisendi töötlemist on testitud ja see on soovitatav ainult 1-kordsete rikastamisreaktsioonide jaoks 16 prooviga komplekti kasutamise korral.
- 96 prooviga komplekti puhul on võimalikud mittestandardised kordsused (2-kordsed kuni 11-kordsed), kuid neil on järgmised piirangud.
 - Proovide töötlemine 2-kordsetes kuni 11-kordsetes rikastamisreaktsioonides vähendab komplekti läbilaskevõimet.
 - Optimaalsed tulemused pole garanteeritud. Mittestandardsete kordsuste jaoks sobiva rikastussaagise saamine võib nõuda täiendavat optimeerimist.
 - Väikese kordsusega kogumisstrateegiate (2-kordne kuni 8-kordne) puhul on nõutav erinevate järjestustega indeksadapterite valimine, et optimeerida eduka sekveneerimise ja andmeanalüüsi jaoks värvi tasakaalu. Moodul DNA GenerateFASTQ Dx seadmetes MiSeqDx ja NextSeq 550Dx pakub käituse seadistamise ajal valikuid tasakaalustatud värvidega indeksikombinatsioonide jaoks. Lisateavet kogumismeetodite kohta vt jaotisest [Kogumismeetodid leheküljel 32](#).
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx piirdub rikastatud teekide edastamisega, mis on sekveneeritud ainult süsteemides MiSeqDx, NextSeq 550Dx ja NovaSeq 6000Dx. Teiste sekveneerimissüsteemide kasutamine nõuab kõigi toimivusaspektide täielikku valideerimist.
- Rikastuspaneelid ei kuulu selle toote hulka. Analüütiliste testimiste tulemused, mis on esitatud jaotises [Toimivusnäitajad leheküljel 55](#), on saadud tüüpiliste rikastuspaneelide abil ja esitatud ainult teavitamise eesmärgil. Analüütiliste toimivusnäitajate eesmärk on näitlikustada analüüsi üldisi võimeid ja need ei määra ühegi konkreetse analüüsi väitega seotud võimalusi ega sobivust. Kõik diagnostilised testid, mis on välja töötatud kasutamiseks koos nende reaktiividega, nõuavad täielikku valideerimist kõigi aspektide jaoks.
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ühildub nii Illumina kui ka kolmanda poole rikastuspaneelidega. Siiski ei ole toimivus kolmanda poole rikastuspaneelidega, mis ei vasta paneeli nõuetele, garanteeritud. Teavet paneeli nõuete kohta vt jaotisest [Rikastussondi paneeli nõuded leheküljel 9](#).
- Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kasutab 2-tunnist hübriidsatsiooniaega. Pikema hübriidsatsiooniaja kasutamine võib toimivusnäitajaid mõjutada.
- Moodulid DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager süsteemidele MiSeqDx ja NextSeq 550Dx esitavad ainult FASTQ-failid. Nende moodulite kasutamisel peate tegema teisese analüüsi valideerimise.

- Rakendus DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on saadaval süsteemile NovaSeq 6000Dx. Rakendus toetab mitut teisese analüüsi töövoogu, sh FASTQ loomine, FASTQ ja VCF-i loomine idutee variandi avastamiseks ning FASTQ ja VCF-i loomine somaatilise variandi avastamiseks. Kui kasutate rakendust VCF-i loomiseks, ei pea te teisese analüüsi valideerimist tegema.
- Rakenduse DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx piiranguid, kui seda kasutatakse süsteemiga NovaSeq 6000Dx, vt dokumendist *NovaSeq 6000Dx Instrument Package Insert (Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi infoleht) (dokument nr 200025276)*.

Toote komponendid

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx koosneb järgmistest komponentidest.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx UD-indeksite kogumiga A, katalooginr 20051354 (16 proovi) või nr 20051352 (96 proovi)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx UD-indeksite kogumiga B, katalooginr 20051355 (16 proovi) või nr 20051353 (96 proovi)
- Tarkvara Local Run Manager moodul DNA GenerateFASTQ Dx seadme NextSeq 550Dx jaoks, katalooginr 20063024
- Tarkvara Local Run Manager moodul DNA GenerateFASTQ Dx seadme MiSeqDx jaoks, katalooginr 20063022
- Rakendus DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx süsteemile NovaSeq 6000Dx, katalooginr 20074609

Komplekti kuuluvad reaktiivid

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on täielik, kui see hõlmab toodet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A või toodet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Saate läbi viia järgmise hulga teegi ettevalmistamise ja rikastamise reaktsioone, kasutades 16 proovi või 96 prooviga komplekti.

Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx	Proovisisend	Rikastamise reaktsioonid	Rikastamise kordsus
16 prooviga komplekt	Halb kvaliteet (FFPE)	16 reaktsiooni	1-kordne
96 prooviga komplekt	Hea kvaliteet (nt täisveri)	8 reaktsiooni	12-kordne

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

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, hoida temperatuuril 15 °C kuni 30 °C

Järgmisi reaktiive tarnitakse toatemperatuuril. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht		Korgi värv	Täidetud maht	Toimeained
	16 proovi (nr 20050020)	96 proovi (nr 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Punane	350 µl	Pesuaine lahus vees.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Roheline	41 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab pesuainet ja soola.
Cleanup Beads (CB)	1	Ei kohaldata*	Punane	10 ml	Tahke faasi paramagnetilised helmed puhverdatud vesilahuses.

* 96 prooviga komplekti puhul sisalduvad helmed Cleanup Beads komplektis Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (katalooginr 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 proovi), hoida temperatuuril 15 °C kuni 30 °C

96 prooviga komplekti puhul sisalduvad helmed Cleanup Beads komplektis Illumina Prep Dx Cleanup Beads (katalooginr 20050030). Järgmine reaktiiv tarnitakse toatemperatuuril. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril. 16 prooviga komplekti puhul sisalduvad helmed Cleanup Beads komplektis Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (katalooginr 20050020).

Reaktiivi nimi	Kogus	Korgi värv	Täidetud maht	Toimeained
Cleanup Beads (CB)	4	Punane	10 ml	Tahke faasi paramagnetilised helmed puhverdatud vesilahuses.

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, hoida temperatuuril 2 °C kuni 8 °C

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril. Hoidke eBLTS-i varulahuse katsutit püstises asendis, nii et helmed oleksid alati puhvrises sukeldatud.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht		Korgi värv	Täidetud maht		Toimeained
	16 proovi (nr 20050021)	96 proovi (nr 20050026)		16 proovi	96 proovi	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Kollane	200 µl	290 µl	Magnethelmed Streptavidin Magnetic Beads, mis on ühendatud transposoomidega puhverdatud vesilahuses, mis sisaldab glütserooli, EDTA-d, ditiotriooli, soola ja pesuainet.
Resuspensiooni-puhver (RSB)	1	4	Läbipaistev	1,8 ml	1,8 ml	Puhverdatud vesilahus.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, hoida temperatuuril –25 °C kuni –15 °C

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht		Korgi värv	Täidetud maht		Toimeained
	16 proovi (nr 20050022)	96 proovi (nr 20050027)		16 proovi	96 proovi	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Läbipaistev	290 µl	290 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab magneesiumsoola ja dimetüülformamiidi.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Läbipaistev	200 µl	610 µl	DNA polümeraas ja dNTP-d puhverdatud vesilahuses.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 proovi), hoida temperatuuril 2 °C kuni 8 °C

16 prooviga komplektide puhul on järgmised reaktiivid lisatud komplekti Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalooginr 20050023). 96 prooviga komplektide puhul on reaktiivid lisatud komplekti Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalooginr 20050028).

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht	Korgi värv	Täidetud maht	Toimeained
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Läbipaistev	1,2 ml	Magnethelmed Streptavidin Magnetic Beads puhverdatud vesilahuses, mis sisaldab formamiidi, pesuainet ja soola.
Resuspensioonipuhver (RSB)	1	Läbipaistev	1,8 ml	Puhverdatud vesilahus.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Läbipaistev	200 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab pesuainet ja soola.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Läbipaistev	200 µl	Puhverdatud vesilahus.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 proovi), hoida temperatuuril 2 °C kuni 8 °C

96 prooviga komplektide puhul on komplekti Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalooginr 20050028) lisatud järgmised reaktiivid. 16 prooviga komplektide puhul on reaktiivid lisatud komplekti Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalooginr 20050023).

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht	Korgi värv	Täidetud maht	Toimeained
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Läbipaistev	1,2 ml	Magnethelmed Streptavidin Magnetic Beads puhverdatud vesilahuses, mis sisaldab formamiidi, pesuainet ja soola.
Resuspensioonipuhver (RSB)	4	Läbipaistev	1,8 ml	Puhverdatud vesilahus.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Läbipaistev	200 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab pesuainet ja soola.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Läbipaistev	200 µl	Puhverdatud vesilahus.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, hoida temperatuuril –25 °C kuni –15 °C

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril.

Reaktiivi nimi	Katsuti maht		Korgi värv	Täidetud maht	Toimeained
	16 proovi (nr 20050024)	96 proovi (nr 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Läbipaistev	580 µl	Pesuaine lahus vees.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Oranž	4,1 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli ja pesuainet.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Läbipaistev	320 µl	PCR-i praimerite (oligonukleotiidide) segu.
2N NaOH (HP3)	1	1	Läbipaistev	200 µl	2N naatriumhüdroksiidi (NaOH) lahus.
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Sinine	480 µl	Puhverdatud vesilahus koos Cot-1 DNA, väljatõrjuva aine ja formamiidiga.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Läbipaistev	200 µl	DNA polümeraas ja dNTP-d puhverdatud vesilahuses.

Komplekt Illumina Unique Dual Index Dx A/B, hoida temperatuuril –25 °C kuni –15 °C

Järgmised reaktiivid tarnitakse külmutatuna. Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange reaktiivid kohe hoiule näidatud temperatuuril. Teavet indeksite adapterijärjestuste kohta vt jaotisest [Lisa: Illumina UD-indeksite adapterijärjestused leheküljel 58](#).

Komponent	Kogus
Komplekt Illumina Unique Dual Index Dx A (96 indeksit), nr 20050038	1
Komplekt Illumina Unique Dual Index Dx B (96 indeksit), nr 20050039	1

Reaktiivid, mis ei kuulu komplekti

Vajalikud, kuid komplekti mittekuuluvad reaktiivid

- DNA eraldamise ja puhastamise reaktiivid
- DNA kvantifitseerimise reaktiivid
- Etanool (molekulaarbioloogia puhul 200 proof)
- Nukleaasivaba vesi
- 1M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- 1N NaOH lahus, molekulaarbioloogia klass
- Kui kasutate sekveneerimissüsteemi NextSeq 550Dx:
 - Reaktiivikomplekt NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) (katalooginr 20028871)
- Kui kasutate sekveneerimissüsteemi MiSeqDx:
 - Reaktiivikomplekt MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalooginr 20037124)
- Kui kasutate sekveneerimissüsteemi NextSeq 6000Dx:
 - Reaktiivikomplekt NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 tsükli) (katalooginr 20046931)
 - Reaktiivikomplekt NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 tsükli) (katalooginr 20046933)
 - Puhvrikassett NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalooginr 20062292)
 - Puhvrikassett NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalooginr 20062293)
 - Teegikatsuti NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalooginr 20062290)
 - Teegikatsuti NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 tk pakis (katalooginr 20062291)

Rikastussondi paneeli nõuded

Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid ühilduvad nii Illumina kui ka kolmanda poole rikastamise DNA oligonukleotiidipaneelidega. Kui kasutate kolmanda poole biotinüülitud DNA-sonde (fikseeritud või kohandatud paneele), veenduge, et need vastaksid nõutavatele spetsifikatsioonidele.

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on optimeeritud ja valideeritud järgmiste kolmanda poole paneelidespetsifikatsioonide abil. Spetsifikatsioonidele mittevastavate kolmanda poole paneelide kasutamise korral ei ole võrreldav toimivus tagatud.

- Sonni pikkus 80 bp või 120 bp
- 500 kuni 675 000 sonni
- Ühe- või kaheaahelaline DNA
- Sonni kogusisend ≥ 3 pmol 1-kordseks kuni 12-kordseks rikastamiseks.

Säilitamine ja käsitlemine

- Toatemperatuur tähendab temperatuurivahemikku 15 °C kuni 30 °C.
- Reaktiivid on stabiilsed kuni komplekti etiketidel märgitud aegumiskuupäevani, kui neid hoiustatakse ettenähtud viisil. Säilitustemperatuure vt jaotisest [Komplekti kuuluvad reaktiivid leheküljel 4](#).
- Külmutatud reaktiivid on stabiilsed maksimaalselt nelja külmutamis-sulatustsükli jooksul, mis toimuvad enne määratud aegumiskuupäeva.
- Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx protseduur sisaldab järgmisi ohutuid peatumispunkte.
 - Pärast [Märgistatud DNA amplifitseerimine leheküljel 27](#) on amplifitseeritud teegid stabiilsed kuni 30 päeva, kui neid hoitakse temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.
 - Pärast [Teekide puhastamine leheküljel 30](#) on puhastatud amplifitseeritud teegid stabiilsed kuni 30 päeva, kui neid hoitakse temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.
 - Pärast [Eelrikastatud teekide kogumine leheküljel 32](#) on kogutud teegid stabiilsed kuni 30 päeva, kui neid hoitakse temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.
 - Pärast [Rikastatud teekide amplifitseerimine leheküljel 42](#) võib rikastatud amplifitseeritud teekide plaat jääda termotsüklerisse kuni 24 tunniks. Teise võimalusena võib plaati hoida temperatuuril 2 °C kuni 8 °C kuni 48 tundi.
 - Lõplikult puhastatud rikastatud teegid on temperatuuril –25 °C kuni –15 °C säilitamise korral stabiilsed kuni 7 päeva.
- Kui mõni komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pakend või sisu on kahjustatud või rikutatud, võtke ühendust Illumina klienditeenindusega.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) võib moodustada nähtavaid sademeid või kristalle. Sademe täheldamise korral kuumutage 37 °C juures 10 minutit ja segage seejärel keerisseguril, kuni sade lahustub.
- Hübridisatsioonioligod (HYB) ja Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) tuleb eelsoojendada samale temperatuurile kui hübridisatsiooni hoidmistemperatuur, mis kehtib proovitüübi ja sondipaneeli kohta. Lisateavet NHB2 ja EEW käsitlemise kohta vt jaotisest [Protseduuriga seotud märkused leheküljel 15](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) ja HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) võivad moodustada kristalle ning tekitada hägusust. Kui täheldate kristalle ja hägusust, segage keerisseguril või pipettige segamiseks üles-alla, kuni lahus on selge. Enne pipettimist soojendage kindlasti NHB2.
- Helmeste Cleanup Beads (CB) käsitlemisel kasutage järgmisi parimaid tavasid.
 - Ärge kunagi külmutage helmeid.

- Segage helmeid vahetult enne kasutamist keerisseguril, kuni need on resuspendeerunud ja värvus on homogeenne.
- Toote Enrichment BLT Small (eBLTS) käsitlemisel kasutage järgmisi parimaid tavasid.
 - Hoidke eBLTS-i katsutit püstiasendis, nii et helmed oleksid alati puhvrisesse sukeldatud.
 - Segage eBLTS-i põhjalikult keerisseguril, kuni helmed on resuspendeerunud. Helmeste uuesti sadenemise vältimiseks ei ole tsentrifuugimine enne pipettimist soovitatav.
 - Kui helmed on kleepunud 96-süvendilise plaadi küljele või ülaosale, tsentrifuugige 280 × g juures 3 sekundit ja pipettige seejärel resuspendeerimiseks.
- Indeksadapteri plaatide käsitlemise korral kasutage järgmisi parimaid tavasid.
 - Ärge lisage indeksadapteri plaadile proove.
 - Iga indeksiplaadi süvend on ühekordseks kasutamiseks.

Vajalikud, kuid komplekti mittekuuluvad seadmed ja materjalid

Veenduge enne protokolliga alustamist, et teil oleksid peale komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx olemas vajalikud seadmed ja materjalid.

Seadmed

Enne protokolliga alustamist veenduge, et teil oleksid olemas vajalikud seadmed.

Protokoll on loetletud spetsifikatsioonidega toodete abil optimeeritud ja valideeritud. Seadmete kasutamise korral väljaspool spetsifikatsioone ei ole võrreldav toimivus tagatud.

Mõned tooted on vajalikud ainult konkreetsete töövoogude jaoks. Need tooted on esitatud eraldi tabelites.

- Termotsükler järgmiste spetsifikatsioonidega.
 - Soojendusega kaas
 - Minimaalne temperatuuri reguleerimise vahemik 10 °C kuni 98 °C
 - Minimaalne temperatuuri täpsus ±0,25 °C
 - Maksimaalne reaktsioonimaht 100 µl
 - Ühildub täisäärikuga 96 süvendiga PCR-plaatidega
- Järgmiste spetsifikatsioonidega mikroproovi inkubaator
 - Ümbritseva õhu temperatuurivahemik +5,0 °C kuni 99,0 °C
 - Ühildub 96 süvendiga MIDI-plaatidega
- 96 süvendiga MIDI-plaatidega ühilduvad mikroproovi inkubaatori siseosad
- Kiire mikroplaadi raputi segamiskiirusega 200–3000 p/min

- Magnetalus, mis ühildub 96 süvendiga PCR-plaatidega
- Magnetalus, mis ühildub 96 süvendiga MIDI-plaatidega
- Fluoromeeter, mis ühildub teie kvantifitseerimismeetodiga
- DNA fragmentide analüsaator
- Täppispipetid
 - 10 µl ühe- ja mitmekanalilised pipetid
 - 20 µl ühe- ja mitmekanalilised pipetid
 - 200 µl ühe- ja mitmekanalilised pipetid
 - 1000 µl ühekanalilised pipetid
 - Täppispipetid tagavad reaktiivi ja proovi täpse doseerimise. Ühe- või mitmekanalilisi pipette saab kasutada, kui neid kalibreeritakse regulaarselt ja nende täpsus on kuni 5% märgitud mahust.
- Mikroplaadi tsentrifuug
- Mikrotsentrifuug
- Üks järgmistest Illumina sekveneerimissüsteemidest
 - Seade MiSeqDx, katalooginr DX-410-1001
 - Seade NextSeq 550Dx, katalooginr 20005715
 - Seade NovaSeq 6000Dx, katalooginr 20068232
- [Valikuline] Vaakumkontsentraator
- [FFPE] Reaalajas PCR-i avastamise süsteem

Materjalid

Enne protokolliga alustamist veenduge, et teil oleksid olemas vajalikud materjalid.

Mõned tooted on vajalikud ainult konkreetsete töövoogude jaoks. Need tooted on esitatud eraldi tabelites.

Protokoll on loetletud toodete abil optimeeritud ja valideeritud. Alternatiivsete materjalide kasutamise korral ei ole võrreldav toimivus tagatud.

- Filtriga pipetiotsakud
- Koonilised tsentrifuugi katsutid, 15 ml või 50 ml
- 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutid
- RNAasi-/DNAasivabad mitmekanalilised reaktiivimahutid, ühekordselt kasutatavad
- RNAasi-/DNAasivabad 8 katsutiga ribad ja korgid
- Seroloogilised pipetid
- 96 süvendiga polüpropüleenist sügavate süvenditega hoiuplaat, 0,8 ml (MIDI-plaat)
- Hard-Shell 96 süvendiga täisäärikuga PCR-plaadid

- [FFPE] qPCR-i seadmega ühilduvad qPCR-plaadid
- Adhesiivtihendid 96 süvendiga plaatidele järgmiste spetsifikatsioonidega.
 - Kooritavad, läbipaistev polüester
 - Sobivad äärikuga PCR-plaatidele
 - Tugev adhesiiv, mis talub mitut temperatuurimuutust vahemikus –40 °C kuni 110 °C
 - DNAasi-/RNAasivaba
- Plastist kulumaterjalid, mis ühilduvad valitud kvantifitseerimismeetodiga
- Fluoromeetiline dsDNA kvantifitseerimiskomplekt, mis ühildub valitud kvantifitseerimissüsteemiga.
 - Eelrikastatud amplifitseeritud teekide kvantifitseerimiseks võib kasutada laiaulatuslikku kvantifitseerimiskomplekti.
 - Rikastatud teekide kvantifitseerimise puhul oleneb kvantifitseerimiskomplekti ulatus kasutatavast sondipaneelist.
- Fragmentide analüüsi komplekt teegi kvalifitseerimiseks valitud kvalifikatsioonisüsteemiga.
 - Eelrikastatud amplifitseeritud teekide kvalifitseerimiseks võib kasutada laiaulatuslikku komplekti.
 - Rikastatud teekide kvalifitseerimise puhul oleneb kvalifitseerimiskomplekti ulatus kasutatavast sondipaneelist.
- [Valikuline] Komplekt DNA eraldamiseks inimese rakkudest ja koest. Võite kasutada mis tahes valideeritud eraldamismeetodit.

Proovimaterjalide kogumine, transportimine ja säilitamine



ETTEVAATUST!

Käsitsege kõiki proovimaterjale potentsiaalselt nakkusohtlikena.

- See analüüs ühildub inimese rakkudest ja kudedest pärineva genoomse DNA-ga.
- Kaubanduslikult saadaoleva puhastatud gDNA puhul veenduge, et proove oleks transporditud õigetes tingimustes ja säilitatud vastavalt tootja juhistele. Järgige gDNA säilitamise ja külmutamise-sulatamise tsüklite parimaid tavasid.
- Täisvere sisendi korral järgige valitud DNA eraldamismeetodi puhul kehtivaid vere kogumise, transportimise ja säilitamise nõudeid. Kasutada võib mis tahes valideeritud eraldamismeetodit. Täisvere transport peab vastama riigi, föderaal-, osariigi ja kohalikele eeskirjadele etioloogiliste ainete transportimise kohta.
- DNA eraldamiseks FFPE koest võib kasutada mis tahes valideeritud eraldamismeetodit. Järgige valitud eraldamismeetodi kohta kehtivaid juhiseid ja soovitusi järgmiste tavade kindlaksmääramiseks.

- Formaliinis fikseerimise ja parafiini sisestamise meetod kudedele, et tagada eraldatud DNA parim kvaliteet.
- FFPE proovide säilitamine.
- Lähtematerjali nõuded, näiteks FFPE lõikude arv ja paksus. Enamik puhastusmeetodeid soovitab kasutada värskelt lõigatud lõike.

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

- Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid sisaldavad potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Kandke isikukaitsevahendeid, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit, mis on kokkupuuteohuks sobilikud. Käideldge kasutatud reaktiive keemiliste jäätmetena ja kõrvaldage need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel. Keskkonna-, tervise- ja ohutusosalast lisateavet vaadake ohutuskardilt (Safety Data Sheets, SDS) veebilehel support.illumina.com/sds.html.
- Käsitsege kõiki vereproove inimese immuunpuudulikkuse viiruse (HIV), inimese B-hepatiidi viiruse (HBV) või muude verega edasikanduvate patogeeni suhtes nakkusohtlikena (universaalsed ettevaatusabinõud).
- Järgige labori ettevaatusabinõusid. Ärge pipeteerige suuga. Ärge sööge, jooge ega suitsetage töökambros. Proovide ja komplekti reaktiivide käsitsemisel kandke ühekordseid kindaid ja laborikitleid. Pärast proovide ja komplekti reaktiivide käsitsemist peske käed põhjalikult puhtaks.
- Proovi või reaktiivi lagunemise vältimiseks veenduge enne protokolliga käivitamist, et kõik puhastamise käigus tekkivad naatriumhüperkloriti aurud oleksid täielikult hajunud.
- Proovide saastumine teiste PCR-produktide/amplikonidega võib põhjustada ebatäpseid ja ebausaldusväärseid tulemusi. Saastumise vältimiseks kasutage järgmisi parimaid tavasid.
 - Kasutage õigeid laboritavasid ja laborihügieeni.
 - Viige töövoog etapid läbi selleks ette nähtud amplifitseerimiseelsetes või -järgsetes piirkondades.
 - Enne teekide puhastamist hoidke kasutatud reaktiive amplifitseerimiseelsetes piirkondades.
 - Eraldage amplifitseerimiseelset reaktiivide amplifitseerimisjärgsetest reaktiividest.
 - Veenduge, et amplifitseerimiseelsetes ja -järgsetes piirkondades oleks olemas vajalik varustus (nt pipetid, pipeti otsakud, keerissegisti ja tsentrifuug).
- Vältige ristsaastumist. Kasutage iga proovi jaoks ja iga reaktiivi väljutamise järel uusi pipetiotsakuid. Filtriga otsakute kasutamine vähendab amplikoni ülekandumise ja proovidevahelise ristsaastumise ohtu.
 - Proovide või reaktiivide põhisegude lisamise või ülekandmise korral vahetage kõigi proovide vahel otsakuid.
 - Mitmekanalilise pipetiga indeksadapterite lisamise korral vahetage otsakuid kõigi ridade või veergude vahel. Kui kasutate ühe kanaliga pipetti, vahetage kõigi proovide vahel otsakuid.
 - Eemaldage kasutamata indeksadapteri plaadid tööalast.
- Kasutage etanooliga pesemiseks järgmisi parimaid tavasid.

- Valmistage alati ette värske 80% etanool. Etanool võib absorbeerida õhust vett ja seeläbi tulemusi mõjutada.
- Veenduge, et kogu etanool oleks pesemisetappide käigus süvendite põhjast eemaldatud. Etanoolijääk võib tulemusi mõjutada.
- Täieliku aurustumise tagamiseks järgige magnetluse etappide jaoks ettenähtud kuivamisega. Etanooli jääk võib mõjutada järgmiste reaktsioonide toimivust.
- Valmistage alati enne kasutamist põhisedud ja ärge kunagi säilitage kombineeritud töölahuseid.
- Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx toimivus ei ole tagatud, kui ei järgita pakendi infolehes kirjeldatud protseduure.
- Ärge kasutage ühtki komplekti osa pärast katsuti etiketil märgitud aegumiskuupäeva.
- Ärge vahetage omavahel erinevate komplektide Illumina DNA Prep with Enrichment Dx osi. Komplektid on märgitud komplekti etiketil.

Protseduuriga seotud märkused

DNA sisendi soovitused

Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx protokoll ühildub kvaliteetsete kaheaheelalise genoomse DNA (gDNA) sisenditega 50–1000 ng.

Veenduge, et esialgne gDNA proov ei sisaldaks > 1 mM EDTA-d ega orgaanilisi saasteaineid, nagu fenool ja etanool. Need ained võivad segada märgistamisreaktsiooni ja põhjustada analüüsi ebaõnnestumise.

gDNA sisend \geq 50 ng

gDNA sisendite puhul vahemikus 50–1000 ng ei ole esialgse gDNA proovi kvantifitseerimine ja normaliseerimine vajalik.

gDNA sisend < 50 ng

Kasutada saab järgmiste kohandustega 10–50 ng DNA sisendeid.

- Kui kasutate 10–49 ng gDNA sisendit, on soovitatav esialgset gDNA proovi kvantifitseerida, et määrata pärast märgistamist vajalike PCR-tsüklite arv. Kasutage kaheaheelalise gDNA sisendi kvantifitseerimiseks fluoromeetrilist meetodit. Vältige meetodeid, mis mõõdavad kogu nukleiinhapet, nagu NanoDrop või muud UV-kiirguse neeldumise meetodid.
- See protokoll ei normaliseeri eelrikastatud teegi lõplikku saagist 10–49 ng gDNA-lt ja seetõttu on tarvis teeki enne ja pärast rikastamist kvantifitseerida ning normaliseerida.
- Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on iseloomustatud ja kontrollitud 50–1000 ng DNA sisendite jaoks. Toote samaväärset toimivust ei saa garanteerida gDNA sisendite puhul, mille suurus on < 50 ng.

Vere sisendi soovitus

Komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ühildub perifeersest täisverest eraldatud gDNA-ga. Kasutada võib mis tahes valideeritud eraldamismeetodit. Täisverest gDNA eraldamisel ei ole sisend-DNA esialgset kvantifitseerimist vaja ja komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx annab normaliseeritud eelrikastatud teegi saagiseid.

Järgmised tegurid võivad ebasoodsalt mõjutada täisvereproovidest saadud DNA kogust ja seega ka teegi normaliseerumist.

- Vereproovi vanus
- Säilitustingimused
- Valgevereliblede arvu mõjutavad haigusseisundid

FFPE koeproovi sisendi soovitus

Edukaks teegi ettevalmistamiseks sobiva sisendi määramiseks kasutage järgmisi FFPE DNA kvaliteedikriteeriume.

- FFPE proovide puhul, mille ΔCq väärtus on ≤ 5 , on soovitatav DNA sisend 50–1000 ng.
- Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx ei ole soovitatud kasutamiseks kehva kvaliteediga FFPE proovide puhul, mille $\Delta Cq > 5$. Proovide, mille $\Delta Cq > 5$, kasutamine on võimalik, kuid see võib suurendada teegi ettevalmistamise nurjumise tõenäosust ja vähendada analüüsi toimivust.

FFPE eraldamine

Kasutage nukleiinhappe eraldamise meetodit, mis annab kõrge saagise, minimeerib proovi kulu ja säilitab proovi terviklikkuse. Võite kasutada FFPE proovidest DNA eraldamiseks mis tahes valideeritud meetodit. FFPE koest gDNA eraldamiseks on nõutav DNA sisendi esialgne kvantifitseerimine ja komplekt Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ei anna normaliseeritud eelrikastatud teegi saagiseid.

FFPE DNA kvaliteedi määramine

FFPE koest eraldatud gDNA tuleb enne kasutamist kvalifitseerida. Optimaalse toimivuse tagamiseks hinnake DNA proovi kvaliteeti, kasutades FFPE proovidest eraldatud DNA kvaliteedi määramiseks valideeritud eraldamismeetodit. Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx protokoll ühildub FFPE DNA proovidega, mille ΔCq väärtus on ≤ 5 . Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx ei ole soovitatud kasutamiseks kehva kvaliteediga FFPE proovide puhul, mille $\Delta Cq > 5$. Proovide, mille $\Delta Cq > 5$, kasutamine on võimalik, kuid see võib suurendada teegi ettevalmistamise nurjumise tõenäosust ja vähendada analüüsi toimivust.

[Valikuline] FFPE võrdlusproovid

Kasutage protokollil läbiviimisel positiivse kontrollina iseloomustatud võrdlusmaterjale, nagu Horizon HD799 (DNA). Võrdlusproovidena võib kasutada ka kvalifitseeritud FFPE materjale, mis on pärit rakuliinist saadud ksenosiirikutest. Enne kasutamist kasutage võrdlusmaterjalide kvantifitseerimiseks fluoromeetrilist meetodit.

MÄRKUS. Positiivse kontrolli võrdlusproovi käivitamine või matriitsi kontrolli puudumine kulutab reaktiive ja vähendab töödeldavate tundmatute proovide koguarvu.

Proovisisendi soovitused

Järgmises tabelis on kokkuvõtlikud proovisisendi soovitused komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx jaoks.

Tabel 1 Proovisisendi soovitused

Proovisisendi tüüp	Proovisisendi kogus	Nõutav sisend-DNA kvantifitseerimine	Nõutav DNA-sisendi kvaliteet	Normaliseeritud eelrikastatud teegi saagis
gDNA	10–49 ng	Jah	260/280 määr 1,8–2,0	Ei
gDNA	50–1000 ng	Ei	260/280 määr 1,8–2,0	Jah
Verest ekstraheeritud gDNA	50–1000 ng	Ei	260/280 määr 1,8–2,0	Jah
FFPE-st ekstraheeritud gDNA	50–1000 ng	Jah	ΔCq väärtus ≤ 5	Ei

EBLTS PCR-programmi soovitatavad PCR-tsüklid on kohandatud proovi sisendkontsentratsiooni ja kvaliteedi alusel. Lisateavet vt jaotisest [Märgistatud DNA amplifitseerimine leheküljel 27](#).

Näpunäiteid ja tehnikaid

Ristsaastumise vältimine

- Proovide lisamise või ülekandmise korral vahetage *kõigi proovide vahel otsakuid*.
- Mitmekanalilise pipetiga indeksadapterite lisamise korral vahetage otsakuid *kõigi ridade või veergude vahel*. Kui kasutate ühe kanaliga pipetti, vahetage kõigi proovide vahel otsakuid.

Plaadi sulgemine

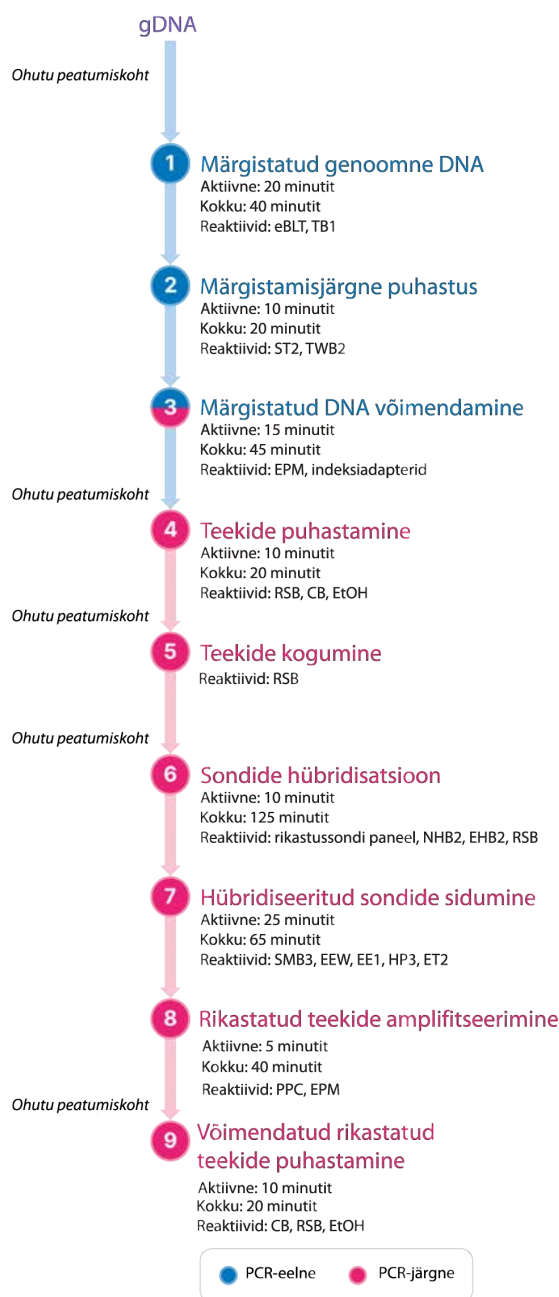
- Katke 96 süvendiga plaat alati uue kleepuva tihendiga, kasutades plaadi katmiseks kummirullikut, enne kui järgite järgmisi protokolliga etappe.
 - Raputamise etapid
 - Inkubatsiooni etapid. Kui plaati ei suleta ettenähtud viisil, võib see põhjustada inkubeerimise ajal aurustumise.
 - Tsentrifugimise etapid
 - Hübridisatsiooni etapid
- Veenduge, et servad ja süvendid oleksid tihedalt suletud, et vähendada ristsaastumise ning aurustumise ohtu.
 - Kui märkate tihendil või plaadi süvendite seintel vedelikku või kondensaati, tsentrifugige vajaduse korral enne tihendi eemaldamist.
- Asetage plaat tasasele pinnale, seejärel eemaldage tihend aeglaselt.

Toote Enrichment BLT Small (eBLTS) käsitlemine

- Hoidke eBLTS-i varulahuse katsutit külmikus püstises asendis, nii et helmed oleksid alati puhvrise sukeldatud.
- Segage eBLTS-i varulahuse katsutit vahetult enne kasutamist põhjalikult keerisseguri abil, kuni helmed on resuspendeerunud. Helmete uuesti sadenemise vältimiseks ei ole tsentrifugimine enne pipettimist soovitatav.
- Kui helmed on kleepunud 96-süvendilise plaadi küljele või ülaosale, tsentrifugige 280 × g juures 3 sekundit ja pipettige seejärel resuspendeerimiseks.
- Järgige eBLTS-i pesemise käigus alltoodud nõudeid.
 - Kasutage plaadi jaoks sobivat magnetlust.
 - Hoidke plaati magnetlusel, kuni see tuleb juhiste kohaselt eemaldada.
 - Kui helmed aspireeritakse pipetiotsakutesse, väljutage need tagasi magnetalusel olevale plaadile ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).

Komplekti Illumina DNA Prep With Enrichment Dx töövoog

Järgmine skeem illustreerib komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx töövoogu. Etappide vahele on märgitud ohutud peatumiskohtad. Ajahinnangud põhinevad 12 proovi töötlemisel 12-kordse rikastusega.



Kasutusjuhised

Selles peatükis kirjeldatakse komplekti Illumina DNA Prep With Enrichment Dx protokoll

- Toodete ja katseparameetrite ühilduvuse tagamiseks vaadake üle planeeritud täielik sekveneerimise töövoog alates proovist kuni analüüsini.
- Enne jätkamist kontrollige komplekti sisu ja veenduge, et teil oleksid vajalikud komponendid, seadmed ning materjalid.
 - Kolmanda poole biotinüülitud sondid peavad vastama konkreetsetele nõuetele. Veendumaks, et teie kolmanda poole sondid vastavad nõuetele, vt jaotist [Rikastussondi paneeli nõuded leheküljel 9](#).
- Järgige protokolle näidatud järjekorras, kasutades määratud mahte ja inkubatsiooni parameetreid.
- Kui protokollis pole peatumiskohta määratud, jätkake kohe järgmise etapiga.
- Põhisegu valmistamisel arvestatakse pakutavate mahtude hulka ülejääk.
- Kasutage kindlasti oma plaaditüübile sobivat magnetlust.

Kogumiseks ettevalmistamine

See etapp on vajalik rikastatud teekide eduka sekveneerimise tagamiseks. Teekide kogumine võib toimuda enne rikastamist ja enne sekveneerimist.

Enne rikastamist – üksikud indekseeritud amplifitseeritud teegid ühendatakse rikastamiseks valitud sondipaneeliga. See loob rikastatud teekide multipleksitud kogumi. FFPE proovisendi puhul on töötlemist testitud ja see on soovitatav ainult 1-kordsete rikastamisreaktsioonide jaoks. Kvaliteetse gDNA jaoks on testitud 12-kordseid teeke, kuid võimalikud on ka 2- kuni 11-kordsed teegid.

Enne sekveneerimist – 1-kordsed rikastatud teegid ja/või multipleksiga rikastatud teegid ühendatakse enne sekveneerimist. Nende rikastatud teekide arv, mida saab sekveneerida, sõltub sekveneerimissüsteemi iga proovi sihtlugemissügavusest.

Unikaalne topeltindekseerimine

Komplekt Illumina DNA Prep With Enrichment Dx kasutab unikaalseid topeltindekseid.

- Topeltindeksiga teegid lisavad indeksi 1 (i7) ja indeksi 2 (i5) järjestused, et luua unikaalselt märgistatud teeke.
- UD-indeksitel on i7 ja i5 indeksi lugemi jaoks erinevad, mitteseotud indeksijärjestused. Indeksid on 10 aluse pikkused.

Erinevate järjestustega indeksiaapterite valimine kogutud teekide jaoks optimeerib eduka järjestuse ja andmete analüüsi jaoks värvitasakaalu. Kordsuse kogumid, mis on ≥ 10 -kordsed, on oma olemuselt värvitasakaaluga, nii et saate kasutada mis tahes indeksiaapteri kombinatsiooni. Sekveneerimise käituse ajal pakub tarkvara Local Run Manager moodul DNA GenerateFASTQ Dx valikuid värvitasakaaluga indeksikombinatsioonide jaoks ja teavitab teid, kui valitud indeksikombinatsioonid ei ole piisavalt mitmekesised.

Teavet Illumina UD indeksiaadapteri järjestuste ja plaatide paigutuste kohta vt jaotisest [Lisa: Illumina UD-indeksite adapterijärjestused leheküljel 58](#).

Toetatud rikastamise kordsused

Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid on konfigureeritud ja testitud 1- ja 12-kordse rikastamise kordsusega. Kuigi on võimalikud ka muud rikastamise kordsused, nõuavad mõned kordsused täiendavaid rikastamiseelse teegi ettevalmistamise ja rikastussondi paneeli reaktiive.

Mittestandardse rikastamise kordsuse jaoks sobiva rikastusosa saamine võib nõuda täiendavat optimeerimist. Optimaalsed tulemused pole garanteeritud.

- **Rikastamise kordsus** – eelrikastatud teekide arv (1–12), mis on ühendatud ühes rikastamisreaktsioonis rikastussondi paneelidega hübriidiseerimiseks. Näiteks 12 eelrikastatud teegi ühendamine loob 12-kordse rikastuskogumi.
- **Rikastusreaktsioon** – ainulaadsete rikastusreaktsiooni preparaatide arv olenemata reaktsiooni kohta kogutud eelrikastatud teekide arvust. Näiteks võib ühe rikastamisreaktsiooniga valmistada 1-kordse või 12-kordse rikastuskogumi.

Järelrikastatud teekide koguarvu arvutamiseks korrutage rikastamise kordsus reaktsiooni kohta rikastamisreaktsioonide arvuga. Näiteks 12-kordse rikastuskogumi üks rikastamisreaktsioon annab 12 järelrikastatud teeki hõlmava kogumi.

Eelrikastatud teekide kogumise korral toetavad komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid järgmisi rikastamisreaktsioone ja kordsust.

Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid	Rikastamise reaktsioonid	Rikastamise kordsus
16 prooviga komplekt	16 reaktsiooni	1-kordne
96 prooviga komplekt	8 reaktsiooni	12-kordne

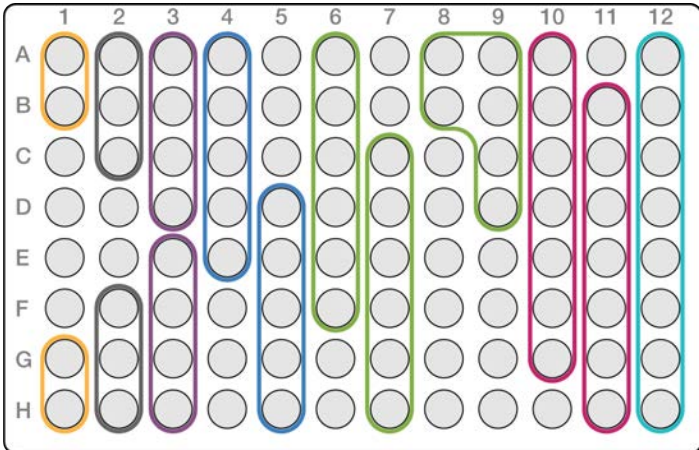
Kahe- kuni kaheksakordse kogumise strateegiad

Järgmises tabelis on toodud indeksiaadapterid (süvendid), mida saab kombineerida 2–8-kordses kogumis, samas kui värvikoodiga joonis illustreerib iga kombinatsiooni.

Koguge veeru üla- või alaosast mis tahes kordsus, mis on ≥ 2 . Ärge koguge realt.

Kordsus	Kombinatsioonid	Värv joonisel
2	Esimesed või viimased kaks süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none"> • A ja B • G ja H Ridu C–F ei kasutata.	Oranž

Kordsus	Kombinatsioonid	Värv joonisel
3	Esimesed või viimased kolm süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none">• A–C• F–H Ridu D ja E ei kasutata.	Hall
4	Esimesed või viimased neli süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none">• A–D• E–H	Lilla
5	Esimesed või viimased viis süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none">• A–E• D–H	Sinine
6	[1. valik] Esimesed või viimased kuus süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none">• A–F• C–H [2. valik] Esimesed kaks süvendit (A ja B) või kaks viimast süvendit (G ja H) ühes veerus ning mis tahes neli süvendit külgnevas veerus.	Roheline
7	Esimesed või viimased seitse süvendit veerus: <ul style="list-style-type: none">• A–G• B–H	Roosa
8	Kogu veerg.	Sinakasroheline

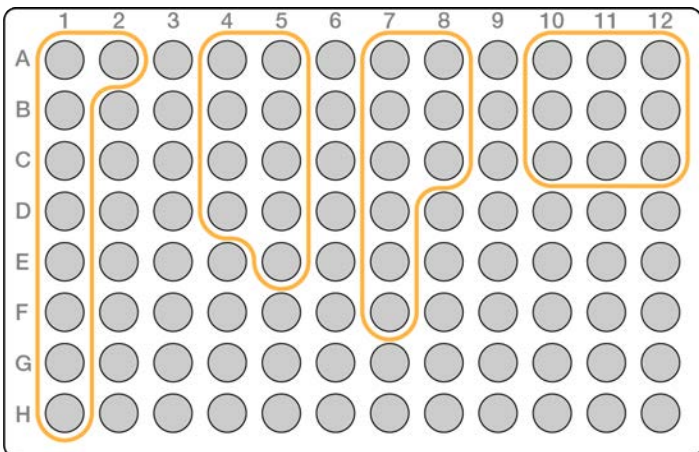


Üheksakordse kogumise strateegiad

Kasutage indeksadapteereid mis tahes süvenditest, mis optimeerivad sekveneerimiskäituse korral värvitasakaalu, näiteks:

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

Järgmisel joonisel on toodud kõik neli näidet.



Märgistatud genoomne DNA

Selles etapis kasutatakse DNA märgistamiseks toodet Enrichment BLT Small (eBLTS), mis fragmenteerib ja märgistab DNA adapterijärjestustega.

Kulutarvikud

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (kollane kork)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nukleaasivaba vesi
- 96 süvendiga PCR-plaat
- Kleepuv tihend
- 1,7 ml mikrotsentrifuugi katsutid
- 8 katsutiga riba
- Pipetiotsakud
 - 200 µl mitmekanalilised pipetid



ETTEVAATUST!

See reaktiivikomplekt sisaldab potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Kandke isikukaitsevahendeid, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit, mis on kokkupuuteohuks sobilikud. Käidelge kasutatud reaktiive keemiliste jäätmetena ja kõrvaldage need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel. Keskkonna-, tervise- ja ohutusosalast lisateavet vaadake ohutuskaardilt (Safety Data Sheets, SDS) veebilehel support.illumina.com/sds.html.

Teave reaktiivide kohta

- eBLTS-i tuleb säilitada temperatuuril 2 °C kuni 8 °C. Ärge kasutage eBLTS-i, mida on hoitud temperatuuril alla 2 °C.
- Ärge tsentrifugeerige eBLTS-i.

Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
eBLTS (kollane kork)	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile. Kasutage vahetult enne kasutamist segamiseks keerissegurit. Ärge tsentrifugeerige enne pipettimist.
TB1	-25 °C kuni -15 °C	Tooge toatemperatuurile. Kasutage segamiseks keerissegurit.

2. Keerutage või pipettige DNA ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
3. Salvastage termotsüklerisse järgmine TAG-programm.
 - Valige kaane eelsoojendus ja seadke see väärtusele 100 °C

- Määrake reaktsiooni maht väärtusele 50 µl
- 55 °C 5 minutit
- Hoida temperatuuril 10 °C

Protseduur

1. Lisage 2–30 µl DNA-d 96-süvendilise PCR-plaadi igasse süvendisse nii, et sisendkogus oleks 50–1000 ng. Kui DNA maht on < 30 µl, lisage DNA-proovidele nukleasivaba vett, et viia kogumaht 30 µl-ni.
2. Segage eBLTS-i põhjalikult keerisseguril, kuni helmed on täielikult resuspendeerunud.
3. Kombineerige märgistamise põhisegu valmistamiseks katsutis järgmisi mahte. Korrutage iga maht töödeldavate proovide arvuga.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Reaktiivi ülejääk sisaldub mahus.
4. Pipettige segamiseks põhjalikult märgistamise põhisegu.
5. Jagage märgistamise põhisegu maht võrdselt 8 katsutiga ribale.
6. Kasutades 200 µl mitmekanalilist pipetti, kandke 20 µl märgistamise põhisegu igasse proovi sisaldavasse PCR -plaadi süvendisse. Kasutage iga prooviveeru või -rea jaoks värskeid otsakuid.
7. Visake 8 katsutiga riba pärast märgistamise põhisegu väljastamist ära.
8. Pipettige väärtusele 40 µl määratud 200 µl multikanalilise pipeti abil segamiseks 10 korda. Kasutage iga prooviveeru jaoks värskeid otsakuid.
Teise võimalusena sulgege PCR-plaat ja kasutage plaadiraputit 1 minuti jooksul kiirusel 1600 p/min.
9. Sulgege plaat ja asetage see eelprogrammeeritud termotsüklerisse ning käivitage TAG-programm.
10. Oodake, kuni TAG-programm on saavutanud hoidmistemperatuuri 10 °C, seejärel eemaldage plaat viivitamatult.
11. Laske 96 süvendiga PCR-plaadil seista 2 minutit toatemperatuuril, seejärel jätkake järgmise etapiga.

Märgistamisjärgne puhastus

Selles etapis pestakse adapteriga märgistatud DNA-d eBLTS-is enne PCR-i võimendust.

Kulutarvikud

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96-süvendiline PCR-plaadi magnetalus
- Kleepuv tihend
- 8 katsutiga riba

- Pipetiotsakud
 - 20 µl mitmekanalilised pipetid
 - 200 µl mitmekanalilised pipetid
- Valmistage ette hilisemaks protseduuriks.
 - EPM (Enhanced PCR Mix (Täiustatud PCR-i segu))
 - Indeksiaadapteri plaat

Teave reaktiivide kohta

- Kasutage kindlasti oma plaaditüübile sobivat magnetlust. MIDI-plaadi magnetluse kasutamine PCR-plaadi puhul võib takistada TWB2 kleepumist helmestele.
- Pipettige TWB2 aeglaselt, et minimeerida vahutamist vältimaks mahu valet aspiratsiooni ja mittetäielikku segamist.

Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
EPM	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage 1 tunni jooksul jää peal. Segamiseks pöörake ümber ja kasutage seejärel lühidalt tsentrifuugi.
ST2	15 °C kuni 30 °C	Sademe täheldamise korral kuumutage 37 °C juures 10 minutit ja segage seejärel keerisseguril, kuni sade lahustub. Kasutage toatemperatuuril.
TWB2	15 °C kuni 30 °C	Kasutage toatemperatuuril.
Indeksiadapteri plaat	–25 °C kuni –15 °C	Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada.

Protseduur

1. Lisage igale märgistamisreaktsioonile 10 µl ST2. Kui kasutate mitmekanalilist pipetti, pipettige ST2 8 katsutiga ribale ja kandke seejärel sobivad kogused PCR-plaadile. Kasutage iga prooviveeru või -rea jaoks värsked otsakuid.
2. Kasutades 200 µl pipetti, mis on seatud 50 µl peale, pipettige helmeste resuspendeerimiseks aeglaselt igas süvendis 10 korda. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1600 p/min. Vajaduse korral korrake toimingut.
3. Sulgege plaat ja tsentrifugeerige seejärel 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
4. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.

5. Asetage plaat PCR-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (3 minutit).
6. [≤ 48 proovi] Peske kolm korda järgmiselt.
 - a. Eemaldage tasemele 60 µl seatud 200 µl mitmekanalilise pipeti abil kogu supernatant ja visake see ära, häirimata seejuures helmegraanulit.
 - b. Eemaldage plaat magnetaluselt.
 - c. Vahetult pärast seda lisage aeglaselt 100 µl TWB2 otse helmestele.
 - d. Pipettige aeglaselt, kuni helmed on täielikult resuspendeeritud. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1600 p/min.
 - e. Pritsimise korral tsentrifuugige 280 × g juures 10 sekundit.
 - f. Asetage plaat PCR-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (3 minutit).
Jätke plaat magnetalusel ja TWB2 süvenditesse, et vältida ülekuivamist kolmanda pesemise ajal.
Pärast PCR-i põhisegu valmistamist eemaldage supernatant ja visake see ära.
 - g. Eemaldage tasemele 100 µl seatud 200 µl mitmekanalilise pipeti abil kogu supernatant ja visake see ära.
 - h. Korrake etappe c–f kaks korda kokku kolme pesu jaoks.
7. [> 48 proovi] Peske kolm korda järgmiselt.
 - a. Järgige etappe b ja c 1- või 2-veerulise sammuga, kuni kõik veerud on ülekuivamise vältimiseks töödeldud.
 - b. Eemaldage tasemele 60 µl seatud 200 µl mitmekanalilise pipeti abil kogu supernatant ja visake see ära.
 - c. Eemaldage plaat magnetaluselt.
 - d. Vahetult pärast seda lisage aeglaselt 100 µl TWB2 otse helmestele.
 - e. Pipettige aeglaselt, kuni helmed on täielikult resuspendeeritud. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1600 p/min.
 - f. Pritsimise korral tsentrifuugige 280 × g juures 10 sekundit.
 - g. Asetage plaat PCR-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (3 minutit).
Jätke plaat magnetalusel ja TWB2 süvenditesse, et vältida ülekuivamist kolmanda pesemise ajal.
Pärast PCR-i põhisegu valmistamist eemaldage supernatant ja visake see ära.
 - h. Eemaldage tasemele 100 µl seatud 200 µl mitmekanalilise pipeti abil kogu supernatant ja visake see ära.
 - i. Eemaldage plaat magnetaluselt ja lisage aeglaselt 100 µl TWB2 otse helmestele.
 - j. Korrake etappe h ja i 1- või 2-veerulise sammuga, kuni kõik veerud on töödeldud.
 - k. Korrake etappe e–h kaks korda kokku kolme pesu jaoks.
8. Hoidke plaati magnetalusel kuni etapini 4 jaotises *Protseduur* peatükis *Märgistatud DNA amplifitseerimine*. TWB2 jääb süvenditesse, et vältida helmeste ülekuivamist.

Märgistatud DNA amplifitseerimine

See etapp amplifitseerib märgistatud DNA-d, kasutades piiratud tsükliga PCR-programmi. PCR-etapp lisab indeksi 1 (i7) adapterid, indeksi 2 (i5) adapterid ja järjestused, mis on vajalikud klastri loomise sekveneerimiseks.

Kulutarvikud

- EPM (Enhanced PCR Mix (Täiustatud PCR-i segu))
- Indeksiaadapteri plaat
- 96 süvendiga PCR-plaat
- Nukleaasivaba vesi
- Kleepuv tihend
- 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutid
- Pipetiotsakud
 - 20 µl mitmekanalilised pipetid
 - 200 µl mitmekanalilised pipetid

Teave reaktiivide kohta

- Indeksiaadapteri plaadid
 - Süvend võib sisaldada > 10 µl indeksiaadaptereid.
 - Ärge lisage indeksiaadapteri plaadile proove.
 - Iga indeksiplaadi süvend on ühekordseks kasutamiseks.

Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
EPM	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage 4 °C juures või jää peal 1 tund. Segamiseks pöörake ümber ja kasutage seejärel lühidalt tsentrifuugi.
Indeksiaadapteri plaat	–25 °C kuni –15 °C	Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada.

2. Salvestage järgmine eBLTS PCR-i programm termotsüklerisse, kasutades allolevas tabelis näidatud sobivat arvu PCR-tsükleid.
 - Valige kaane eelsoojendus ja seadke see väärtusele 100 °C
 - Määrake reaktsiooni maht väärtusele 50 µl
 - 72 °C, 3 minutit
 - 98°C, 3 minutit
 - X tsükli järgmistest:
 - 98°C, 20 sekundit
 - 60 °C, 30 sekundit
 - 72 °C, 1 minut

- 72 °C, 3 minutit
- Hoida temperatuuril 10 °C

Kogu tööaeg on 9 tsükli puhul ~38 minutit ja 12 tsükli puhul ~46 minutit.

Proovisendi tüüp	PCR-tsüklite arv (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1000 ng gDNA	9
FFPE-st eraldatud 50–1000 ng gDNA-d	12
Verest eraldatud gDNA	9

Protseduur

- Kombineerige PCR-põhisegu valmistamiseks järgmised. Korrutage iga maht töödeldavate proovide arvuga.
 - EPM (23 µl)
 - Nukleaasivaba vesi (23 µl)
 Reaktiivi ülejääk sisaldub mahus.
- Pipettige PCR-põhisegu segamiseks aeglaselt 10 korda ja tsentrifugeerige seejärel lühidalt.
- Kui plaat on magnetalusel, kasutage TWB2 eemaldamiseks ja äraviskamiseks 200 µl mitmekanalilist pipetti. Süvendi seintele jääv vaht ei avalda teegile negatiivset mõju.
- Eemaldage plaat magnetaluselt.
- Lisage kohe 40 µl PCR-põhisegu otse igas süvendis olevatele helmestele.
- Pipettige kohe segamiseks, kuni helmed on täielikult resuspendeerunud. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1600 p/min.
- Sulgege prooviplaat ja tsentrifugeerige 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
- Tsentrifugeerige indeksadapteri plaati 1 minuti jooksul 1000 × g juures.
- Valmistage ette indeksadapteri plaat.
 - [< 96 proovi] Torgake iga süvendi jaoks uue pipetiotsakuga indeksadapteri plaadi fooliumtihendisse auk ainult vastavalt töödeldavate proovide arvule.
 - [96 proovi] Joondage uus pooläärrikuga PCR-plaat indeksadapteri plaadi kohale ja vajutage fooliumtihendi läbitorkamiseks alla. Visake PCR-plaat, mida kasutati fooliumtihendi läbitorkamiseks, minema.
- Kasutades uut pipetiotsakut, lisage igasse süvendisse 10 µl eelpaaristatud indeksadaptereid.
- Pipettige 40 µl pipeti abil segamiseks 10 korda. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1600 p/min.
- Sulgege plaat ja tsentrifugeerige seejärel 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
- Asetage termotsüklerisse ja käivitage eBLTS PCR-i programm.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral hoidke toodet kuni 30 päeva temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.

Teekide puhastamine

Selles etapis kasutatakse amplifitseeritud teekide puhastamiseks kahepoolset helmeste puhastamise protseduuri.

Kulutarvikud

- CB (Cleanup Beads (Puhastushelmed))
- RSB (Resuspension Buffer (Resuspensioonipuhver))
- Värskest valmistatud 80% etanool (EtOH)
- 96 süvendiga 0,8 ml polüpropüleenist sügavate süvenditega hoiuplaat (MIDI-plaat)
- 96 süvendiga PCR-plaat
- MIDI-plaadi magnetalus
- PCR-plaadi magnetalus
- 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsutid
- Nukleaasivaba vesi

Teave reaktiivide kohta

- Cleanup Beads (Puhastushelmed)
 - Segage enne igat kasutuskorda keerisseguril.
 - Segage keerisseguril sageli, et helmed oleksid ühtlaselt jaotunud.
 - Lahuse viskoossuse tõttu aspireerige ja doseerige aeglaselt.

Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
CB	Toatemperatuur	Segage keerisseguril ja pöörake ümber, et segada, kuni vedeliku värvus on homogeenne.
RSB	2 °C kuni 8 °C	Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada. Kasutage segamiseks keerissegurit.

Protseduur

1. Raputage 96 süvendiga PCR-plaati 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min ja tsentrifuugige seejärel lühidalt.

2. Asetage plaat PCR-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (1 minut).
3. Uuesti suspendeerimiseks segage CB-d 10 sekundi jooksul 3 korda keerisseguril ja pöörake seejärel mitu korda ümber.
4. Kvaliteetse gDNA puhul toimige järgmiselt.
 - a. Lisage uue MIDI-plaadi igasse süvendisse 77 µl nukleasivaba vett.
 - b. Lisage 88 µl CB-d igasse uue MIDI-plaadi süvendisse.
 - c. Kandke 45 µl supernatanti igast PCR-plaadi süvendist vastavasse MIDI-plaadi süvendisse.
 - d. Visake PCR-plaat ära.
 - e. Pipettige igat süvendit segamiseks 10 korda. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
 - f. Sulgege plaat ja inkubeerige plaati 5 minutit toatemperatuuril.
 - g. Veenduge, et poleks õhumulle. Kui märkate mulle, tsentrifuugige vedelik põhja.
 - h. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (5 minutit).
 - i. Inkubeerimise ajal segage CB-d põhjalikult keerisseguril ja lisage seejärel 20 µl uue MIDI-plaadi igasse süvendisse.
 - j. Kandke 200 µl supernatanti igast MIDI-plaadi süvendist vastavasse uue MIDI-plaadi süvendisse (mis sisaldab 20 µl CB-d).
 - k. Visake esimene MIDI-plaat ära.
 - l. Pipettige igat uue MIDI-plaadi süvendit segamiseks 10 korda. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
5. Eraldatud FFPE puhul toimige järgmiselt.
 - a. Lisage 81 µl CB-d igasse uue MIDI-plaadi süvendisse.
 - b. Kandke 45 µl supernatanti igast PCR-plaadi süvendist vastavasse MIDI-plaadi süvendisse.
 - c. Visake PCR-plaat ära.
 - d. Pipettige igat süvendit segamiseks 10 korda. Teise võimalusena sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
6. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
7. Veenduge, et poleks õhumulle. Kui märkate mulle, tsentrifuugige vedelik põhja.
8. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (5 minutit).
9. Eemaldage supernatant helmeid häirimata ja visake see ära.
10. Peske kerakesi järgmiselt.
 - a. Kui plaat on magnetalusel, lisage ilma segamata 200 µl värsket 80% EtOH-d.
 - b. Inkubeerige 30 sekundit.
 - c. Eemaldage supernatant helmeid häirimata ja visake see ära.
11. Peske kerakesi **teist** korda.
12. Kuivatage plaati 5 minutit magnetalusel õhu käes.

13. Õhkuivatamise ajal eemaldage järelejäänud EtOH 20 µl pipeti abil ja visake ära.
14. Eemaldage plaat magnetaluselt.
15. Lisage helmestele 17 µl RSB-d.
16. Sulgege plaat ja raputage 2 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
17. Inkubeerige 2 minutit toatemperatuuril.
18. Veenduge, et poleks õhumulle. Kui märkate mulle, tsentrifugeerige vedelik põhja.
19. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
20. Kandke 15 µl supernatanti uuele 96 süvendiga PCR-plaadile.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral sulgege plaat ja hoidke toodet kuni 30 päeva temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.

Eelrikastatud teekide kogumine

Selles etapis ühendatakse ainulaadsete indeksitega DNA teegid üheks kuni 12 teegist koosnevaks kogumiks.

Kogumismeetodid

Saate koguda mahu või massi järgi. Kasutage oma sisendi jaoks sobiva meetodi määramiseks järgmist tabelit.

Tabel 2 Soovitavad kogumismeetodid

Proovisisend	Kogumismeetod
10–49 ng gDNA	Mass
50–1000 ng gDNA	Maht
FFPE-st eraldatud gDNA	Mass
Verest eraldatud gDNA	Maht

- Ühekordne rikastamine ei nõua eelrikastatud teekide kogumist. Siiski võib osutada vajalikuks RSB lisamine.
- Pärast teegi eelrikastatud kvantifitseerimist saab optimaalse indeksi tasakaalu saavutamiseks kõiki proovisisendite tüüpe massi järgi koguda.
- Eraldi eksperimentaalsetes preparaatides loodud eelrikastatud teekide lõplik saagis võib varieeruda. Seetõttu on optimaalse indeksitasakaalu saavutamiseks soovitatav koguda massi järgi.
- Kasutage 1-kordset rikastamist järgmistes olukordades.
 - 10–49 ng gDNA
 - FFPE-st eraldatud 50–1000 ng gDNA-d
 - Madala väiksema alleeli sageduse avastamine somaatilise variandi kutsumiseks.

Massi põhjal kogumine

Järgmistes olukordades kvantifitseerige teegid, et kasutada rikastamiseks DNA massi teegi kohta, mis on määratletud jaotises [Eelrikastatud teekide kogumine võrdses kontsentratsioonis leheküljel 33](#).

- 10–49 ng gDNA proovisisend
- FFPE proovisisendist eraldatud 50–1000 ng gDNA-d
- Madala väiksema alleeli sageduse avastamine somaatilise variandi kutsumiseks
- Verest eraldatud gDNA optimaalse indeksitasakaalu saavutamiseks

[Valikuline] Eelrikastatud teekide kvantifitseerimine

1. Käitage 1 µl eelrikastatud teekidest, kasutades eelistatud fluorestsentsipõhist kvantifitseerimismeetodit, mis kasutab dsDNA interkalatsioonivärvi.
 - 50–1000 ng kvaliteetse gDNA puhul eeldage ≥ 500 ng eelrikastatud teegi saagisest.
 - FFPE-st eraldatud 50–1000 ng gDNA puhul eeldage 500–6000 ng eelrikastatud teegi saagisest olenevalt esialgse proovi kvaliteedist.

MÄRKUS. Erinevate lävedega kvantifitseerimismeetodite puhul kvalifitseerige selle töövoos jaoks kvantifitseerimismeetod. Kontsentratsiooni tulemused võivad olenevalt kasutatud meetodist erineda.

Eelrikastatud teekide kogumine võrdses kontsentratsioonis

Kasutage järgmist tabelit, et määrata rikastamiseks vajalik DNA mass teegi kohta vastavalt proovi tüübile ja rikastamise kordsusele. Soovitatust madalama eelrikastatud teegi saagise kasutamisel ei ole optimaalne rikastussaagis ja analüüsi toimivus garanteeritud.

Rikastusreaktsiooni DNA kogumass ei tohiks ületada 6000 ng.

Proovisisend	Rikastamise kordsus	DNA mass teegi kohta (ng)	Kogu DNA teegi mass (ng)
Kvaliteetne gDNA	12	250–500	3000–6000
FFPE-st eraldatud gDNA	1	200	200

1. Salvestage nende teekide indeksid, mida kavatsete selles etapis koguda.
2. Arvutage iga teegi kontsentratsiooni põhjal välja maht, mis tuleb vajaliku DNA massi saavutamiseks rikastamisreaktsioonile lisada.
 - Kvaliteetne gDNA: arvutage 250–500 ng sisendi jaoks vajaliku teegi maht.
 - FFPE-st eraldatud gDNA: arvutage 200 ng sisendi jaoks vajaliku teegi maht.

- Lisage iga teegi puhul arvutatud maht PCR-plaadi samasse süvendisse.
- Kvaliteetse gDNA kasutamise korral tehke üht järgmistest toimingutest, võttes aluseks kogutud eelrikastatud teekide kogumahu.
 - Kui eelrikastatud teegi maht = 30 µl, jätkake jaotisega [Sondide hübridisatsioon leheküljel 35](#).
 - Kui eelrikastatud teegi maht on < 30 µl, lisage RSB, et saavutada kogumaht 30 µl.
 - Kui eelrikastatud teegi maht on > 30 µl, kasutage kogutud proovi kontsentreerimiseks helmepõhist meetodit või vaakumkontsentraatorit. Lisage kontsentreeritud kogutud proovile RSB, et saavutada kogumaht 30 µl.
- FFPE-st eraldatud gDNA kasutamise korral tehke üht järgmistest toimingutest, võttes aluseks kogutud eelrikastatud teekide kogumahu.
 - Kui eelrikastatud teegi maht = 7,5 µl, jätkake jaotisega [Sondide hübridisatsioon leheküljel 35](#).
 - Kui eelrikastatud teegi maht on < 7,5 µl, lisage RSB, et saavutada kogumaht 7,5 µl.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral sulgege plaat ja hoidke toodet kuni 30 päeva temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.

Mahu põhjal kogumine

Kui sisend on 50–1000 ng DNA-d, ei ole samas katses loodud üksikute teekide kvantifitseerimine ja normaliseerimine vajalik.

Optimaalse toimivuse saavutamiseks ühendage ainult sama kasutaja ettevalmistatud eelrikastatud teegi kogumise proovid, reaktiivipartii ja indeksadapteri plaat.

- Salvestage nende teekide indeksid, mida kavatsete selles etapis koguda.
- Kombineerige järgmised eelrikastatud teegi ja RSB mahud rikastamise kordsuse tagamiseks uue PCR-plaadi samasse süvendisse.
Saadud maht on 30 µl.

Rikastamise kordsus *	Iga eelrikastatud teegi maht (µl)	RSB maht (µl)
1-kordne	14	16
2-kordne	14	2
3-kordne	10	0
4-kordne	7,5	0
5-kordne	6	0
6-kordne	5	0
7-kordne	4,2	0,6
8-kordne	3,7	0,4

Rikastamise kordsus *	Iga eelrikastatud teegi maht (µl)	RSB maht (µl)
9-kordne	3,3	0,3
10-kordne	3	0
11-kordne	2,7	0,3
12-kordne	2,5	0

* Mittestandardsete kordsuste (2- kuni 11-kordne) kohta teabe saamiseks vt jaotist [Protseduuri piirangud leheküljel 2](#).

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral sulgege plaat ja hoidke toodet kuni 30 päeva temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.

[Valikuline] Eelrikastatud teekide kvalifitseerimine

Kui koondatakse mahu järgi, kasutage eelrikastatud teekide kvantifitseerimiseks fluoromeetrist meetodit, mis kasutab dsDNA interkalatsioonivärvi. Eelrikastatud teekide kvalifitseerimiseks kasutage DNA fragmentide analüsaatorit koos sobiva fragmendianalüüsi komplektiga.

Kasutage teegi kvalifitseerimiseks kokku 1 µl. Eelrikastatud teegid on piisavalt kontsentreeritud, et võimaldada väikeseid lahjendusi kvantifitseerimiseks või fragmentide analüüsiks.

Sondide hübridisatsioon

See etapp seob DNA sihitud piirkonnad sidumissondidega.

Komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx reaktiivid ühilduvad nii Illumina kui ka kolmanda poole rikastamise DNA oligonukleotiidipaneelidega. Teavet kolmandate poolte paneelide nõutavate spetsifikatsioonide kohta vt jaotisest [Rikastussondi paneeli nõuded leheküljel 9](#).

Kulutarvikud

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (sinine kork)
- Rikastussondi paneel
- 96 süvendiga PCR-plaat
- Kleepuv tihend
- Valmistage ette hilisemaks protseduuriks.
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads (Streptavidiini magnethelmed))
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (oranž kork)

Teave reaktiivide kohta

- NHB2 sadestub ja eraldub säilitamise ajal.

- Rikastussondi paneel viitab Illumina tarnija valitud rikastamise oligonukleotiidipaneelile.

Ettevalmistamine

- Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
EHB2	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile. Kasutage segamiseks keerissegurit. Kui täheldate kristalle ja hägusust, korrake keerisseguril segamist või pipettige segamiseks üles-alla, kuni lahus on selge.
Rikastussondi paneel	-25 °C kuni -15 °C (Illumina)	Nii Illumina kui ka muude tootjate paneelide puhul soojendage toatemperatuurini. Kasutage segamiseks keerissegurit.
NHB2 (sinine kork)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuuril. Kui see on toatemperatuuril, eelsoojendage mikroproovi inkubaatoris 5 minuti jooksul kasutatava sondiga samale temperatuurile. Resuspendeerimiseks segage keerisseguril maksimaalsel kiirusel 10 sekundi jooksul 3 korda. Tsentrifugeerige lühidalt. Pipettige katsuti põhjast üles ja alla. Kui täheldate kristalle ja hägusust, korrake keerisseguril segamist või pipettige segamiseks üles-alla, kuni lahus on selge. Kasutage soojana, et vältida sademete tekkimist.
SMB3*	2 °C kuni 8 °C	Kui jätkate järgmise protseduuriga kohe pärast HYB-programmi 90-minutilist ooteaega, soojendage toode toatemperatuurile vähemalt 2 tundi enne HYB-programmi käivitamist.
EEW * (oranž katsuti)	-25 °C kuni -15 °C	Kui jätkate järgmise protseduuriga kohe pärast HYB-programmi 90-minutilist ooteaega, soojendage toode toatemperatuurile vähemalt 2 tundi enne HYB-programmi käivitamist. Eelsoojendage toatemperatuuril mikroproovi inkubaatoris sobiva hübridisatsiooni- ja sidumistemperatuurini 30 minutit enne HYB-programmi lõppu.

* Kui lõpetate enne järgmist protseduuri, lükake selle reaktiivi ettevalmistamine edasi, kuni jõuate selle protseduurini.

- Salvestage järgmine HYB-programm termotsüklerisse, kasutades [Tabel 3](#) loetletud sobivat arvu tsükleid.

- Valige kaane eelsoojendus ja seadke see väärtusele 100 °C
- Määrake reaktsiooni maht
 - [Kvaliteetne gDNA] 100 µl
 - [FFPE-st eraldatud gDNA] 25 µl
- 98 °C, 5 minutit
- X 1-minutilist tsüklit, alustades esimese tsükli puhul temperatuuril 98 °C, seejärel langetades temperatuuri 2 °C tsükli kohta
- Hoidke toodet 90 minutit sobival temperatuuril.
 - [FFPE-st eraldatud gDNA] 58 °C
 - [80-meer sondi paneelid] 58 °C
 - [Somaatilise variandi nimetamine] 58 °C
 - [Kõik muu] 62 °C

Kogu käitusaeg on ~115 minutit.

Tabel 3 Tsüklite arv proovi või paneeli kohta

Proovi ja paneeli tüüp	Tsüklite arv (X)
FFPE-st eraldatud gDNA (olenemata paneeli tüübist)	20
80-meer sondi paneelid (olenemata proovi tüübist)	20
Somaatilise variandi nimetamine	20
Kõik muud proovid ja paneelid	18

Protseduur

1. [Kvaliteetne gDNA] Lisage järgmised reaktiivid *loetletud järjekorras* igale PCR-plaadi kogutud teegile. Ärge valmistage põhisegu. NHB2 ja EHB2 põhisegu valmistamine mõjutab rikastamise toimivust negatiivselt.
 - NHB2 (sinine kork) (50 µl)
 - Rikastussondi paneel (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. [Kvaliteetne gDNA] Kasutades pipetti, mis on seatud väärtusele 90 µl, pipettige segamiseks igas süvendis 10 korda.
3. [FFPE-st eraldatud gDNA] Lisage järgmised reaktiivid *loetletud järjekorras* igale PCR-plaadi kogutud teegile. Ärge valmistage põhisegu. NHB2 ja EHB2 põhisegu valmistamine mõjutab rikastamise toimivust negatiivselt.
 - NHB2 (sinine kork) (12,5 µl)
 - Rikastussondi paneel (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)

4. [FFPE-st eraldatud gDNA] Kasutades pipetti, mis on seatud väärtusele 20 µl, pipettige segamiseks igas süvendis 10 korda.
5. Sulgege plaat ja tsentrifugeerige 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
6. Asetage prooviplaat eelprogrammeeritud termotsüklerisse ja käivitage HYB-programm.
7. Kui HYB-programmi temperatuuri säilitamise aeg lõpeb, jätkake kohe järgmise protseduuriga.



ETTEVAATUST!

Kui hübridisatsiooni reaktsiooni temperatuur langeb alla toatemperatuuri, tekib sade.

Hübridiseeritud sondide sidumine

Selles etapis kasutatakse sihitud huvipiirkondadele hübridiseeritud sondide sidumiseks magnethelmeid Streptavidin Magnetic Beads (SMB3).

Kulutarvikud

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (oranž kork)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1 (Rikastamise elueerimispuhver 1))
- ET2 (Elute Target Buffer 2 (Elueerimise sihtpuhver 2))
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads (Streptavidiini magnethelmed))
- 1,5 ml mikrotsentrifuugi katsuti
- 96 süvendiga MIDI-plaat
- 96 süvendiga PCR-plaat
- Kleepuv tihend
- MIDI-plaadi magnetalus
- Valmistage ette hilisemaks protseduuriks.
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Teave reaktiivide kohta

- EEW
 - Veenduge, et EEW oleks enne mikroproovi inkubaatoris eelkuumutamist vähemalt 2 tundi toatemperatuuril sulanud.
 - Veenduge, et EEW-d oleks mikroproovi inkubaatoris kuumutatud 30 minutit enne HYB-programmi lõppu.

- Jätke EEW mikroproovi inkubaatorisse, kui seda ei kasutata. EEW peaks jääma kuumutatuks kogu protokollil vältel.
- Pärast toatemperatuurile jõudmist võib olla hägune.
- Võib tunduda kollane.
- SMB3
 - SMB3 peab olema enne kasutamist toatemperatuuril.

Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
SMB3	2 °C kuni 8 °C	Laske 2 tundi seista ja toatemperatuurile soojeneda. Pöörake ümber ja segage seejärel keerisseguril, kuni toode on täielikult resuspendeeritud.
EEW (oranž katsuti)	–25 °C kuni –15 °C	Pärast 2-tunnist inkubeerimist toatemperatuuril eelsoojendage mikroproovi inkubaatoris sobiva hübriidisatsiooni- ja sidumistemperatuurini 30 minutit enne HYB-programmi lõppu.
EE1	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage toatemperatuurile ja segage seejärel keerisseguril.
HP3	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage toatemperatuurile ja segage seejärel keerisseguril.
ET2	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile. Kasutage segamiseks keerissegurit.
EPM	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage ühe tunni jooksul jää peal. Segamiseks pöörake ümber ja tsentrifugeerige seejärel lühidalt. Tõstke kõrvale jää peale.
PPC	–25 °C kuni –15 °C	Sulatage ühe tunni jooksul jää peal. Keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt. Tõstke kõrvale jää peale.

2. Eelsoojendage ühte mikroproovi inkubaatorit MIDI soojendusploki siseosaga, et inkubeerida prooviplaati ühel järgmistest temperatuuridest. Valikulist teist mikroproovi inkubaatorit saab kasutada EEW eelsoojendamiseks. Asetage EEW MIDI soojendusploki siseosa peale.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-meer sondi paneelide kohta] 58 °C
 - [Somaatilise variandi nimetamine] 58 °C
 - [Kõik muu] 62 °C

Protseduur

Sidumine

1. Lisage SMB3 uue MIDI-plaadi vastavasse süvendisse järgmiselt.
 - **[Kvaliteetne gDNA]** Lisage 250 µl SMB3.
 - **[FFPE-st eraldatud gDNA]** Lisage 62,5 µl SMB3.
2. Kasutades pipetti, mis on seatud väärtusele 100 µl kvaliteetse gDNA puhul või 25 µl FFPE puhul, kandke iga kogutud teek 96 süvendiga PCR-plaadilt uue MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
3. Sulgege plaat ja raputage 4 minuti jooksul kiirusel 1200 p/min.
4. Pritsimise korral tsentrifugeerige lühidalt plaati.
5. Asetage kogutud teekide plaat mikroproovi inkubaatoris MIDI-soojendusploki siseosale EEW katsuti alla, sulgege kaas ja inkubeerige seejärel 15 minutit sobival temperatuuril.
 - **[FFPE]** 58 °C
 - **[80-meer sondi paneel]** 58 °C
 - **[Somaatilise variandi nimetamine]** 58 °C
 - **[Kõik muu]** 62 °C
6. Eemaldage kogutud teekide plaat ja tsentrifugeerige 30 sekundi jooksul 280 × g juures.
7. Asetage plaat kohe MIDI-plaadi magnetilisele ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
8. **[Kvaliteetne gDNA]** Eemaldage tasemele 200 µl seatud pipeti abil kõigist süvenditest kogu supernatant, häirimata helmegraanulit, ja visake supernatant ära.
9. **[FFPE-st eraldatud gDNA]** Eemaldage 90 µl peale seatud pipeti abil kõigist süvenditest kogu supernatant, häirimata helmegraanulit, ja visake supernatant ära.
10. Eemaldage kogu järelejäänud supernatant ja visake see ära.

Pesemine

1. Eemaldage plaat magnetilisel viisil.
2. **[Kvaliteetne gDNA]** Eemaldage EEW kiiresti mikroproovi inkubaatorist ja lisage igasse süvendisse 200 µl.
3. **[FFPE-st eraldatud gDNA]** Eemaldage EEW kiiresti mikroproovi inkubaatorist ja lisage 50 µl igasse süvendisse.
4. Viige kasutamata EEW tagasi mikroproovi inkubaatorisse ja hoidke soojendatuna.
5. Sulgege plaat ja raputage 4 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
6. Asetage prooviplaat mikroproovi inkubaatoris MIDI-soojendusploki siseosale EEW katsuti alla, sulgege kaas ja inkubeerige seejärel 5 minutit sobival temperatuuril.
 - **[FFPE]** 58 °C
 - **[80-meer sondi paneelid]** 58 °C

- [Somaatilise variandi nimetamine] 58 °C
 - [Kõik muud paneelid] 62 °C
7. Asetage plaat kohe MIDI-plaadi magnetlusele ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
 8. Eemaldage kvaliteetse gDNA puhul väärtusele 200 µl ja FFPE puhul väärtusele 50 µl seatud pipeti abil kõigist süvenditest kogu supernatant ning visake see ära.
 9. Korrake etappe 1–8 kaks korda kokku kolme pesu jooksul.

Pesemise ülekandmine

1. Eemaldage plaat magnetlusest.
2. [Kvaliteetne gDNA] Eemaldage EEW kiiresti mikroproovi inkubaatorist ja lisage igasse süvendisse 200 µl.
3. [FFPE-st eraldatud gDNA] Eemaldage EEW kiiresti mikroproovi inkubaatorist ja lisage 50 µl igasse süvendisse.
4. Sulgege plaat ja raputage 4 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min. Pritsimise korral vähendage kiirust väärtuseni 1600 p/min.
5. Viige resuspendeeritud helmeste lahus uuele MIDI-plaadile üle.
Osa proovi võib jääda süvenditesse.



ETTEVAATUST!

Reaktiivi ülekandmine minimeerib reaktiivide jääkide ülekandumist, mis võivad pärssida allavoolu PCR-i.

6. Asetage prooviplaat mikroproovi inkubaatoris MIDI-soojendusploki siseosale, sulgege kaas ja inkubeerige seejärel 5 minutit sobival temperatuuril.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-meer sondi paneelid] 58 °C
 - [Somaatilise variandi nimetamine] 58 °C
 - [Kõik muu] 62 °C
7. Asetage plaat kohe MIDI-plaadi magnetlusele ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
8. Eemaldage kvaliteetse gDNA puhul väärtusele 200 µl ja FFPE puhul väärtusele 50 µl seatud pipeti abil kõigist süvenditest kogu supernatant ning visake see ära.
9. Tsentrifuugige plaati 30 sekundi jooksul 280 × g juures.
10. Asetage MIDI-plaat 10 sekundiks magnetlusele.
11. Kasutage 20 µl pipetti, et eemaldada igast süvendist järelejäänud vedelik ja see ära visata.
12. Jätkake viivitamatult jaotisega [Elueerimine leheküljel 42](#), et vältida helmeste liigset kuivamist ja teegi saagise vähenemist.

Elueerimine

1. Elueerimise põhisegu valmistamiseks ühendage järgmised mahud. Korrutage iga maht töödeldavate kogutud teekide arvuga.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Täiendav reaktiivi ülejääk sisaldub mahus.
2. Segage keerisseguril ja tsentrifuugige seejärel lühidalt.
3. Eemaldage MIDI-plaat magnetaluselt.
4. Lisage igasse süvendisse 23 µl elueerimise põhisegu.
5. Sulgege plaat ja raputage 2 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
6. Inkubeerige plaati 2 minutit toatemperatuuril.
7. Tsentrifugeerige plaati 30 sekundi jooksul 280 × g juures.
8. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
9. Kandke 21 µl supernatanti MIDI-plaadilt vastavasse uue 96 süvendiga PCR-plaadi süvendisse.
10. Visake MIDI-plaat ära.
11. Lisage 4 µl ET2 igasse süvendisse, mis sisaldab 21 µl supernatanti.
12. Seadke pipett väärtusele 20 µl ja pipettige segamiseks aeglaselt igat süvendit 10 korda.
13. Sulgege plaat ja tsentrifuugige seejärel 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
14. Inkubeerige plaati 1 minuti jooksul toatemperatuuril.

Rikastatud teekide amplifitseerimine

Selles etapis kasutatakse rikastatud teegi amplifitseerimiseks PCR-i.

Kulutarvikud

- EPM (Enhanced PCR Mix (Täiustatud PCR-i segu))
- PPC (PCR Primer Cocktail (PCR-i praimerisegu))
- Kleepuv tihend

Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
EPM	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage ühe tunni jooksul 4 °C juures või jää peal. Segamiseks pöörake ümber ja tsentrifugeerige seejärel lühidalt. Tõstke kõrvale jää peale.
PPC	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage ühe tunni jooksul 4 °C juures jää peal. Keerutage segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt. Tõstke kõrvale jää peale.

2. Salvstage järgmine AMP-programm termotsüklerisse, kasutades järgmises tabelis loetletud sobivat arvu PCR-tsükleid.

- Valige kaane eelsoojendus ja seadke see väärtusele 100 °C
- Määrake reaktsiooni maht väärtusele 50 µl
- 98 °C, 45 sekundit
- (X) tsükli järgmistest:
 - 98 °C, 30 sekundit
 - 60 °C, 30 sekundit
 - 72°C, 30 sekundit
- 72°C, 5 minutit
- Hoida temperatuuril 10 °C

Kogu käitusaeg on ~35 minutit.

Proovi ja paneeli tüüp	(X) tsükli
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) kvaliteetse gDNA jaoks	10
Illumina Exome Panel (CEX) FPPE jaoks	12
Kõik muud proovid ja paneelid	12 ¹²³⁴

¹ Saab reguleerida kuni 15 tsükli väikeste kolmanda osapoole paneelide jaoks hilisema optimeerimise kaudu. Kui kasutate FPPE-d, saab tsükli arvu reguleerida kuni 17-ni.

² Saab reguleerida kuni 17 tsükli kolmandate poolte paneelide jaoks, millel on ainult 500 sondi. Kui kasutate FPPE-d, saab tsükli arvu reguleerida kuni 19-ni.

³ FPPE proovide jaoks saab reguleerida kuni 14 tsükli.

⁴ PCR-tsükli arvu suurendamine võib põhjustada FPPE proovide suuremat dubleerimissagedust ja väiksemaid fragmentide suurusi.

Protseduur

1. Lisage igasse süvendisse 5 µl PPC-d.
2. Lisage igasse süvendisse 20 µl EPM-i.
3. Sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1200 p/min.
4. Tsentrifugeerige plaati 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
5. Asetage see eelprogrammeeritud termotsüklerisse ja käivitage AMP-programm.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral hoidke toodet kuni kaks päeva temperatuuril 2 °C kuni 8 °C. Teise võimalusena jätke toode kuni 24 tunniks termotsüklerisse.

Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine

Selles etapis kasutatakse puhastushelmeid Cleanup Beads rikastatud teegi puhastamiseks ja soovimatute saaduste eemaldamiseks.

Kulutarvikud

- CB (Cleanup Beads (Puhastushelmed))
- RSB (Resuspension Buffer (Resuspensioonipuhver))
- Värskest valmistatud 80% etanool (EtOH)
- Kleepuvad tihendid
- 96 süvendiga MIDI-plaat
- 96 süvendiga PCR-plaat
- MIDI-plaadi magnetalus

Teave reaktiivide kohta

- Cleanup Beads (Puhastushelmed)
 - Segage enne igat kasutuskorda keerisseguril.
 - Segage keerisseguril sageli, et helmed oleksid ühtlaselt jaotunud.
 - Lahuse viskoossuse tõttu aspireerige ja doseerige aeglaselt.

Ettevalmistamine

1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
CB	Toatemperatuur	Segage keerisseguril ja pöörake ümber, et segada, kuni vedeliku värvus on homogeenne.
RSB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toatemperatuurile. Kasutage segamiseks keerissegurit.

2. Valmistage absoluutetanoolist värsket 80% EtOH.

Protseduur

1. Tsentrifugeerige PCR-plaati 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
2. Segage CB-d 10 sekundi jooksul 3 korda keerisseguril ja pöörake seejärel ümber.
3. Lisage 40,5 µl CB-d igasse uue **MIDI-plaadi** süvendisse.
4. Kandke 45 µl igast PCR-plaadi süvendist vastavasse MIDI-plaadi süvendisse.
5. Sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
6. Inkubeerige MIDI-plaati 5 minutit toatemperatuuril.
7. Tsentrifugeerige plaati 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
8. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (5 minutit).
9. Eemaldage 95 µl peale seatud pipeti abil kõigist süvenditest kogu supernatant ja visake see ära.
10. Peske kaks korda järgmiselt.
 - a. Kui plaat on magnetalusel, lisage ilma segamata 200 µl värsket 80% EtOH-d.
 - b. Inkubeerige 30 sekundit.
 - c. Eemaldage supernatant helmeid häirimata ja visake see ära.
11. Kuivatage plaati 5 minutit magnetalusel õhu käes.
12. Õhkuivatamise ajal eemaldage järelejäänud EtOH 20 µl pipeti abil ja visake ära.
13. Eemaldage plaat magnetaluselt ja lisage igasse süvendisse 32 µl RSB-d.
14. Sulgege plaat ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
15. Inkubeerige plaati 5 minutit toatemperatuuril.
16. Tsentrifugeerige plaati 10 sekundi jooksul 280 × g juures.
17. Asetage plaat MIDI-plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
18. Kandke 30 µl supernatanti 96 süvendiga MIDI-plaadilt vastavasse uue PCR-plaadi süvendisse.
19. Visake MIDI-plaat ära.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral sulgege plaat ja hoidke toodet kuni 7 päeva temperatuuril –25 °C kuni –15 °C.

Rikastatud teekide kontrollimine

Kaheaheelalise gDNA sisendi kvantifitseerimiseks kasutage fluorestsentsil põhinevat meetodit, mis kasutab interkalatsioonivärvi. Vältige meetodeid, mis mõõdavad kogu nukleiinhapet, nagu NanoDrop või muud UV-kiirguse neeldumise meetodid.

1. Käitage 1 µl rikastatud teeki, kasutades oma kvantifitseerimismeetodit.

MÄRKUS. Sondi kogumolaarsus mõjutab proportsionaalselt rikastamisjärgset teegi saagist.

Eeldatakse, et fragmendi keskmine suurus on 125–235 bp ja DNA fragmentide jaotus suurusvahemikus ~200 bp kuni ~1000 bp.

Teekide lahjendamine lähtekontsentratsioonini

Selles etapis lahjendatakse teegid sekveneerimissüsteemi lähtekontsentratsioonini ja see on seerialahjenduse esimene samm. Pärast lähtekontsentratsioonini lahjendamist on teegid valmis denatureerimiseks ja lõpliku laadimiskontsentratsioonini lahjendamiseks.

Sekveneerimiseks olenemata kasutatavast rikastussondi paneelist soovib Illumina seadistada paarisotsalise käituse 151 tsükliga lugemi (2 × 151) ja 10 tsükliga indeksi lugemi kohta. Kui soovite vähem kattuvaid lugemeid või vähem töötlemata katvust, saate järjestada kuni väärtuseni 2 × 126 või 2 × 101.

1. Arvutage teegi või kogutud teekide molaarsuse väärtus järgmise valemi abil.
 - DNA fragmentide analüsaatoriga kvalifitseeritud teekide puhul kasutage teegi jaoks saadud keskmist suurus.
 - Kõigi muude kvalifitseerimismeetodite puhul kasutage teegi keskmise suurusena väärtust 350 bp.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{keskmine teegi suurus (bp)}} = \text{molaarsus (nM)}$$

Näiteks kui teegi kontsentratsioon on 20 ng/µl ja keskmine suurus on 350 bp, on saadud molaarsuse väärtus 86,58 nM.

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

2. Kasutades molaarsuse väärtust, arvutage RSB ja teegi mahud, mis on vajalikud teekide lahjendamiseks süsteemi algkontsentratsioonini.

Sekveneerimissüsteem	Minimaalne nõutav teegi maht (µl)	Lähtekontsentratsioon (nM)	Lõplik laadimiskontsentratsioon (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2

Sekvenerimissüsteem	Minimaalne nõutav teegi maht (µl)	Lähtekontsentratsioon (nM)	Lõplik laadimiskontsentratsioon (pM)
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) või 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] Lõpliku laadimiskontsentratsiooni 350 pM saamiseks on vajalik lähtekontsentratsioon 1,75 nM. Vajaduse korral reguleerige lõplikku laadimiskontsentratsiooni järgmise tabeli abil.

Lõplik laadimiskontsentratsioon (pM)	Kogutud teekide kontsentratsioon (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Teekide lahjendamine RSB abil

- **Multipleksitud teegikogumina kvantifitseeritud teegid** – lahjendage kogumit oma süsteemi lähtekontsentratsioonini.
- **Individuaalselt kvantifitseeritud teegid** – lahjendage igat teeki oma süsteemi lähtekontsentratsioonini. Multipleksitud teegikogumi loomiseks lisage katsutisse igast lahjendatud teegist 10 µl.

4. Järgige oma süsteemi denatureerimise ja lahjendamise juhiseid, et lahjendada lõpliku laadimiskontsentratsioonini.

- Süsteemi NextSeq 550Dx puhul vt teavet jaotisest [Süsteemi NextSeq 550Dx sekvenerimiseks ettevalmistamine leheküljel 48](#).
- Süsteemi MiSeqDx puhul vt teavet jaotisest [Süsteemi MiSeqDx sekvenerimiseks ettevalmistamine leheküljel 49](#).

- Süsteemi NovaSeq 6000Dx puhul vt teavet jaotisest [Süsteemi NovaSeq 6000Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine](#) leheküljel 51.

Lõplikud laadimiskontsentratsioonid on lähtepunktiks ja üldiseks juhiseks. Optimeerige kontsentratsioone oma töövoos ja kvantifitseerimismeetodi jaoks järgnevate järjestuste või läbivooluraku tiitrimise abil.

Süsteemi NextSeq 550Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine

Järgige järgmisi juhiseid teekide denatureerimiseks ja lahjendamiseks sekveneerimise jaoks sekveneerimissüsteemis NextSeq 550Dx.

Kulutarvikud

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

Ettevalmistamine

Sekveneerimise jaoks teekide denatureerimiseks valmistage ette 0,2 N NaOH *värske* lahus. Selleks et väikesed pipettimisvead ei mõjutaks NaOH lõplikku kontsentratsiooni, tuleb ette valmistada lisamaht.



ETTEVAATUST!

Värskelt lahjendatud 0,2 N NaOH on denatureerimisprotsessi jaoks oluline. Sobimatu denatureerimine võib vähendada saagist.

1. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et lahjendada 1 N NaOH kontsentratsioonile 0,2 N NaOH.
1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
HT1	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuuril. Hoidke temperatuuril 2 °C kuni 8 °C, kuni olete valmis denatureeritud teekide lahjendamiseks.

2. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et valmistada ette värske NaOH lahendus.
 - Laborikvaliteediga vesi (800 µl)
 - 1 N NaOH (200 µl)
 Tulemus on 1 ml 0,2 N NaOH.
3. Pöörake katsutit segamiseks mitu korda.

4. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et valmistada ette 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.
 - Laborikvaliteediga vesi (800 µl)
 - 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)Tulemus on 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

MÄRKUS. Hoidke kork suletud. Kasutage värsket lahjendust **12 tunni** jooksul.

Teekide denatureerimine

1. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised teekide mahud ja värskelt lahjendatud 0,2 N NaOH.
 - 10 µl teek
 - 10 µl 0,2 N NaOH
2. Segage lühidalt keerisseguril ja seejärel tsentrifuugige 280 × g juures 1 minuti jooksul.
3. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
4. Lisage 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Denatureeritud teekide lahjendamine 20 pM-ni

1. Lisage denatureeritud teeke sisaldavasse katsutisse 970 µl eeljahutatud HT1.
Tulemus on 20 pM denatureeritud teek.
2. Segage lühidalt keerisseguril ja seejärel tsentrifuugige 280 × g juures 1 minuti jooksul.
3. Asetage 20 pM teegid jääle, kuni olete valmis jätkama lõplikku lahjendamist.

Teekide lahjendamine laadimiskontsentratsioonini

1. Lisage järgmised mahud, et lahjendada denatureeritud 20 pM teegilahus kontsentratsioonini 1,2 pM.
 - Denatureeritud teegi lahus (78 µl)
 - Eeljahutatud HT1 (1222 µl)Kogumaht on 1,3 ml 1,2 pM juures.
2. Segamiseks pöörake ümber ja kasutage seejärel impulsstsentrifuugi.
3. Jätkake sekveneerimisega. Juhiseid vt dokumendist *Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend (dokument nr 1000000009513)*.

Süsteemi MiSeqDx sekveneerimiseks ettevalmistamine

Järgige järgmisi juhiseid teekide denatureerimiseks ja lahjendamiseks sekveneerimise jaoks MiSeqDx sekveneerimissüsteemis.

Kulutarvikud

- HT1 (Hybridization Buffer (Hübridisatsioonipuhver))
- 1N NaOH

Ettevalmistamine

Sekveneerimise jaoks teekide denatureerimiseks valmistage ette 0,2 N NaOH *värske* lahus. Selleks et väikesed pipettimisvead ei mõjutaks NaOH lõplikku kontsentratsiooni, tuleb ette valmistada lisamaht.

**ETTEVAATUST!**

Värskelt lahjendatud 0,2 N NaOH on denatureerimisprotsessi jaoks oluline. Sobimatu denatureerimine võib vähendada saagist.

1. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et lahjendada 1 N NaOH kontsentratsioonile 0,2 N NaOH.
1. Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

Toode	Säilitamine	Juhised
HT1	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuuril. Hoidke temperatuuril 2 °C kuni 8 °C, kuni olete valmis denatureeritud teeki lahjendada.

2. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et valmistada ette värske NaOH lahendus.
 - Laborikvaliteediga vesi (800 µl)
 - 1 N NaOH (200 µl)
 Tulemus on 1 ml 0,2 N NaOH.

MÄRKUS. Hoidke kork suletud. Kasutage värsket lahjendust **12 tunni** jooksul.

Denatureerige 4 nM teek

1. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud.
 - 4 nM teek (5 µl)
 - 0,2N NaOH (5 µl)
2. Segage lühidalt keerisseguril ja seejärel tsentrifuugige 280 × g juures 1 minuti jooksul.
3. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
4. Lisage denatureeritud teeki sisaldavasse katsutisse 990 µl eeljahutatud HT1.
Tulemus on 1 ml 20 pM denatureeritud teek.

Denatureeritud 20 pM teegi lahjendamine

1. Lahjendage soovitud kontsentratsioonini järgmiste mahtude abil.

Kontsentratsioon	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM teek	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Eeljahutatud HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Segamiseks pöörake ümber ja kasutage seejärel impulsstsentrifuugi.
3. Jätkake sekveneerimisega. Juhiseid vt dokumendist *MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4* (Seadme *MiSeqDx Instrument* viitejuhend *MOS v4* jaoks) (dokument nr 1000000157953).

Süsteemi NovaSeq 6000Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine

Järgige järgmisi juhiseid teekide denatureerimiseks ja lahjendamiseks sekveneerimissüsteemis NextSeq 6000Dx sekveneerimisel.

Kulutarvikud

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

Ettevalmistamine

Sekveneerimise jaoks teekide denatureerimiseks valmistage ette 0,2 N NaOH värsket lahust. Selleks et väikesed pipettimisvead ei mõjutaks NaOH lõplikku kontsentratsiooni, tuleb ette valmistada lisamaht.



ETTEVAATUST!

Värskelt lahjendatud 0,2 N NaOH on denatureerimisprotsessi jaoks oluline. Sobimatu denatureerimine võib vähendada saagist.

1. Kombineerige mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et lahjendada 1 N NaOH kontsentratsioonile 0,2 N NaOH.

Tabel 4 Režiim S2

Reaktiiv	Ühe läbivooluraku maht (µl)	Kahe läbivooluraku maht (µl)
Laborikvaliteediga vesi	40	80
Varu 1 N NaOH	10	20

Need mahud annavad tulemuseks 50 µl 0,2 N NaOH ühe läbivooluraku puhul või 100 µl 0,2 N NaOH kahe läbivooluraku puhul.

Tabel 5 Režiim S4

Reaktiiv	Ühe läbivooluraku maht (µl)	Kahe läbivooluraku maht (µl)
Laborikvaliteediga vesi	80	160
Varu 1 N NaOH	20	40

Need mahud annavad tulemuseks 100 µl 0,2 N NaOH ühe läbivooluraku puhul või 200 µl 0,2 N NaOH kahe läbivooluraku puhul.

- Pöörake segamiseks mitu korda ümber või segage hoolikalt keerisseguril.

MÄRKUS. Hoidke kork suletud. Kasutage värsket lahjendust **12 tunni** jooksul.

Normaliseeritud teegikogumi loomine

Laadimiskontsentratsioon võib erineda olenevalt teegi ettevalmistamise, kvantifitseerimise ja normaliseerimise meetodist.

Normaliseerige teegid järgmiste juhiste kohaselt sobiva kontsentratsioonini ja seejärel koguge. Samal läbivoolurakul sekveneeritud teegid tuleb ühendada üheks normaliseeritud kogumiks.

MÄRKUS. Proovide arv, mida saab komplektiga Illumina DNA Prep With Enrichment Dx iga raja kohta käitada, on maksimaalselt 192. Selle piirangu põhjuseks on UD indekseid koguarv komplektides A ja B.

Teekide normaliseerimine kogumiseks

- Tehke nõutav kogutud teekide kontsentratsioon kindlaks soovitud lõpliku laadimiskontsentratsiooni põhjal.
 - Lõpliku laadimiskontsentratsiooni 350 pM jaoks on nõutav kogutud teekide kontsentratsioon 1,75 nM.
 - Kogutud teekide kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks erinevate lõplike laadimiskontsentratsioonide puhul vt jaotist [Teekide lahjendamine lähtekontsentratsioonini leheküljel 46](#).
- Normaliseerige teegid soovitud kogutud teekide kontsentratsioonini, kasutades 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Täpsema teabe saamiseks teekide lahjendamise kohta sobiva kontsentratsioonini vt Illumina veebisaidil funktsiooni [Pooling Calculator](#) (Kogumise kalkulaator).

Soovitatud laadimiskontsentratsioonid

Optimaalne DNA laadimiskontsentratsioon sõltub teegi tüübist ja siseosa suurusest. Teekide puhul suurusega > 450 bp võib vajalik olla suurem laadimiskontsentratsioon.

Normaliseeritud teekide kogumine ja valikulise kontrollmaterjali PhiX Control lisamine

1. Lisage sobiv kogus igat normaliseeritud teeki uude mikrotsentrifuugi katsutisse, et saada üks järgmistest lõppmahtudest.

Režiim	Lõppmaht (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Valikuline]** Lisage 1% denatureerimata PhiX> järgmiselt.
 - a. Lahjendage 10 nM PhiX-i kontsentratsioonile 2,5 nM, kasutades 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
 - b. Lisage denatureerimata teegikogumile sobiv kogus denatureerimata 2,5 nM PhiX-i.

Režiim	Denatureerimata 2,5 nM PhiX-i (µl)	Denatureerimata teegikogum (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

PhiX-i lisamisel on hästi tasakaalustatud teekide jaoks soovituslik kogus 1%. Vähesese mitmekesisusega teegid võivad nõuda suuremat kogust. Vähesese mitmekesisusega PhiX-i kontrollmaterjalide kasutamiseks pöörduge suuniste saamiseks Illumina tehnilise toe poole.

Teegikogumi ja valikulise PhiX-i kontrollmaterjali denatureerimine

1. Lisage denatureeritud teegikogumi ja valikulise PhiX-i katsutisse 0,2 N NaOH järgmiselt.

Läbivoolurakk	0,2 N NaOH	Denatureerimata teegikogum (µl)	Saadud maht
S2	37	150	187 µl või 187,9 µl PhiX-iga
S4	77	310	387 µl või 388,9 µl PhiX-iga

2. Sulgege korgiga ja seejärel segage lühidalt keerisseguril.
3. Tsentrifugeerige kuni 1 minuti jooksul 280 × g juures.
4. Inkubeerige denatureerimiseks 8 minutit toatemperatuuril.
5. Lisage neutraliseerimiseks 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 järgmiselt.

Režiim	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Saadud maht
S2	38	225 µl või 225,9 µl PhiX-iga
S4	78	465 µl või 466,9 µl PhiX-iga

6. Sulgege korgiga ja seejärel segage lühidalt keerisseguril.
7. Tsentrifugeerige kuni 1 minuti jooksul 280 × g juures.
8. Kandke kogu denatureeritud teegi või denatureeritud teegi ja PhiX-i maht süsteemi NovaSeq 6000Dx teegikatsutisse.

9. Jätka sekveneerimisega. Juhiseid vt dokumendist *NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation (Seadme NovaSeq 6000Dx tootedokumentatsioon) (dokument nr 200010105)*.

Tõrkeotsing

Töövoo tõrkeotsinguks kasutage järgmist tabelit. Kui sekveneerimiskäitus või proovi teekide valmistamine nurjub kaks korda, võib vajalik olla täiendav tõrkeotsing. Pöörduge Illumina tehnilise toe poole.

Probleem	Võimalik põhjus	Soovitav tegevus
Sekveneerimiskäitus ei läbi käituse kvaliteedikontrolli spetsifikatsioone	Kasutaja viga või laboriseadme tõrge analüüsi töövoos	<p>Kvalifitseerige rikastatud teeke, et tagada teegi sobiv saagis ja fragmentide suuruse jaotus. Korrake teekide valmistamist ühes järgmistest etappidest olenevalt sellest, kus kahtlustata kasutusviga või seadme tõrge tekkis. Kui te viga ei tuvasta või tekivad muud tõrked, pöörduge käituse tõrkeotsinguks Illumina tehnilise toe poole.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sekveneerige uuesti teeke. Vt jaotist Süsteemi NextSeq 550Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 48, Süsteemi MiSeqDx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 49 või Süsteemi NovaSeq 6000Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 51. • Rikastage uuesti teeke. Vt jaotist Sondide hübriidisatsioon leheküljel 35. • Käivitage teekide valmistamine alates töövoo algusest. Vt jaotist Kasutusjuhised leheküljel 20.
	Seadme probleem	Pöörduge Illumina tehnilise toe poole.
Tõrge FASTQ loomisel või üldine sekveneerimissüsteemi tõrge (nt võrgutõrge, tõrked reaktiivide sisestamisel/eemaldamisel jne)	Tarkvara või seadme probleem	<p>Vt dokumendist <i>Local Run Manager Software Guide (Tarkvara Local Run Manager juhend) (dokument nr 100000002702)</i> teavet FASTQ loomise kohta või vt dokumenti <i>Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend (dokument nr 1000000009513)</i>, <i>MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (Seadme MiSeqDx viitejuhend MOS v4 jaoks) (dokument nr 1000000157953)</i> või <i>NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation (Seadme NovaSeq 6000Dx tootedokumentatsioon) (dokument nr 200010105)</i>.</p> <p>Täiendava abi saamiseks pöörduge Illumina tehnilise toe poole.</p>

Probleem	Võimalik põhjus	Soovitav tegevus
DNA teek ei anna järjestuse laadimiseks piisavat saagist	Proovi sisendmahu nõuded pole täidetud	Veenduge, et proovi sisendmaht oleks sobiv, ja korrake teekide ettevalmistamist. Vt jaotist Proovisisendi soovitused leheküljel 17 .
	Kasutamiseviga või seadme tõrge analüüsi töövoos	Korrake teekide valmistamist ühes järgmistest etappidest olenevalt sellest, kus kahtlustatav kasutusviga või seadme tõrge tekkis. Kui te viga ei tuvasta või tekivad muud tõrked, pöörduge käituse tõrkeotsinguks Illumina tehnilise toe poole. <ul style="list-style-type: none">• Sekveneerige uuesti teeke. Vt jaotist Süsteemi NextSeq 550Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 48, Süsteemi MiSeqDx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 49 või Süsteemi NovaSeq 6000Dx sekveneerimiseks ettevalmistamine leheküljel 51.• Rikastage uuesti teeke. Vt jaotist Sondide hübriidisatsioon leheküljel 35.• Käivitage teekide valmistamine alates töövoos algusest. Vt jaotist Kasutusjuhised leheküljel 20.
	Rikastussondi paneelile esitatavad nõuded ei olnud täidetud	Veenduge, et rikastussondi paneel oleks sobiv, ja korrake teekide ettevalmistamist. Vt jaotist Rikastussondi paneeli nõuded leheküljel 9 .

Toimivusnäitajad

Rakenduse DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx süsteemile NovaSeq 6000Dx toimivusnäitajad on esitatud dokumendis *NovaSeq 6000Dx Instrument Package Insert (Seadme NovaSeq 6000Dx pakendi infoleht) (dokument nr 200025276)*.

Toimivus tervete eksoomipaneelidega

Eksoomipaneeli toimivust analüüsiti, kasutades Coriell Cell Line gDNA NA12878 madalaimat (50 ng) ja kõrgeimat (1000 ng) soovitatud sisendit koos teadaoleva tõekomplektiga idutee variantide avastamiseks (Coriell Platinum Genome). Eksoomipaneeli 1 (45 Mb) ja eksoomipaneeli 2 (36,8 Mb) kasutati tüüppaneelidena. Analüüsi Illumina DNA Prep with Enrichment Dx käigus analüüsiti 24 tehnilist replikaati, kasutades eksoomipaneeli 1 (45 Mb) kahes 12-kordse rikastamise reaktsioonis. Analüüsi Illumina DNA Prep with

Enrichment Dx käigus analüüsiti 12 tehnilist replikaati, kasutades eksoomipaneeli 2 (36,8 Mb) ühes 12-kordse rikastamise reaktsioonis. Seejärel sekveneeriti rikastatud teeke sekveneerimissüsteemis NextSeq 550Dx tarkvara Local Run Manager mooduliga DNA GenerateFASTQ Dx.

Järgmises tabelis on esitatud iga paneeliga analüüsitud tehniliste replikatsioonide sekundaarse sekveneerimise ja variantide kutsumise toimivusmõõdikute keskmised väärtused.

Tabel 6 Analüüsi toimivus kahe terve eksoomipaneeliga

Paneel	Polsterdatud ainulaadne lugemi rikastus	Katvuse ühtsus	Fragmendi pikkuse mediaan	SNV tagasikutsumine ¹	SNV täpsus ²	Indeli tagasikutsumine ¹	Indeli täpsus ²
Eksoomi-paneel 1 (45 Mb)	80%	96%	186 bp	96%	99%	90%	89%
Eksoomi-paneel 2 (36,8 Mb)	93%	98%	188 bp	96%	99%	92%	93%

¹ Tagasikutsumine = positiivsed / (tõesed positiivsed + valenegatiivsed)

² Täpsus = tõesed positiivsed / (tõesed positiivsed + valepositiivsed)

Avastamispiir

Avastamispiiri testimiseks kasutati Horizon HD799 DNA etalonstandardit. HD799 koosneb mõõdukalt kahjustatud formaliiniga töödeldud DNA-st, mille SNV-d on alleelsete sageduste vahemikus 1–24,5%. Kasutati madalaimat soovitatud DNA-sisendit (50 ng) ja ning hinnati SNV-de avastamismäära variandi alleelisagedusega (VAF) $\geq 5,0\%$. Analüüsis Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analüüsiti FFPE töövoo abil 16 tehnilist replikaati, mida rikastati 16 (ühekordse) rikastamise korral vähiülese rikastuspaneeliga (1,94 Mb) ja sekveneeriti seejärel mooduliga DNA GenerateFASTQ Dx seadmes NextSeq 550Dx.

Kõik proovid vastasid paneelispetsiifiliste proovide toimivusnõuetele, nagu on näidatud järgmises tabelis.

Tabel 7 Proovi toimivus avastamispiiri puhul

Paneel	SNV-de variandi avastamise määr $\geq 5,0\%$ VAF	Keskmine Katvuse ühtsus
Vähiülene rikastuspaneel (1,94 Mb, 523 geeni)	100%	99%

Segavad ained

Võimalike segavate ainete mõju hinnati komplekti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx abil, hinnates analüüsi toimivust häirivate ainete juuresolekul.

Segav mõju täisvere puhul

Atsetaminofeeni (eksogeenne ühend, ravim), kreatiini ja triglütseriidide (endogeensed metaboliidid) analüüsiti, lisades need enne DNA eraldamist inimese täisvere proovidesse. Vere kogumisest (alla soovitatud mahu) tuleneva segava mõju hindamiseks lisati EDTA-d ka täisvereproovidesse. Peale selle lisati proovi ettevalmistamisest tuleneva segava mõju hindamiseks täisverest eraldatud DNA-sse molekulaarse klassi etanool.

Järgmises tabelis on toodud analüüsitavad kontsentratsioonid segava aine kohta.

Tabel 8 Täisveres analüüsitud potentsiaalselt segavad ained ja kontsentratsioonid

Analüüsitav aine	Analüüsitav kontsentratsioon
Atsetaminofeen	15,6 mg/dl* Kolm korda suurem kontsentratsioon, mida oodatakse pärast ravimi raviannust.
Kreatiiniin	15 mg/dl* Suurim täheldatud kontsentratsioon elanikkonnas.
Triglütseriidid	1,5 g/dl* Suurim täheldatud kontsentratsioon elanikkonnas.
EDTA	6 mg/ml Oodatust kolm korda suurem kontsentratsioon veres, mis on kogutud EDTA katsutitesse.
Molekulaarse klassi etanool	15% v/v Eluaadis pärast DNA eraldamist.

* Standardi CLSI EP37-ED1:2018 kohaselt

Iga segava aine puhul analüüsiti analüüsiga Illumina DNA Prep with Enrichment Dx 12 tehnilist replikaati, mida rikastati ühekordse (12-kordse) rikastamise korral eksoomipaneeliga 1 (45 Mb) ja sekveneeriti seejärel mooduliga DNA GenerateFASTQ Dx seadmes NextSeq 550Dx.

Analüüsitud ainete puhul vastasid kõik 12 proovi toimivusnõuetele ja mingit segavat mõju analüüsi toimimises ei täheldatud.

Segav mõju FFPE koe puhul

Kaht kolorektaalset FFPE proovi analüüsiti hemoglobiini olemasolu ja puudumise korral 0,1 mg juures 10 µm FFPE lõigu kohta, mis esindas halvimat stsenaariumit, mille puhul on saastunud 50% FFPE koeproovist kõrge hemoglobiinitasemega verrega. Proove analüüsiti analüüsiga Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, kasutades ühekordse rikastamise tüüpilise paneelina 1. vähiülese rikastuspaneeli (1,94 Mb). Seejärel sekveneeriti rikastatud teeke seadmes NextSeq 550Dx mooduliga DNA GenerateFASTQ Dx. Kõik proovid vastasid proovi toimivusnõuetele ja näidati, et hemoglobiin ei mõjuta analüüsi toimivust.

Proovi ettevalmistamisest tuleneva segava mõju hindamiseks lisati põievähi FFPE koeproovist eraldatud DNA-le kaks eksogeenset ühendit. Analüüsitud eksogeensed ained on eraldamislahused, mida tavaliselt kasutatakse DNA eraldamise protsessis, ja need on koos analüüsitud kogustega loetletud järgmises tabelis.

Analüüsitava aine lahused on kaubanduslikult saadaval kolonnipõhistes DNA isoleerimiskomplektides.

Tabel 9 FFPE-s analüüsitud potentsiaalselt segavad eksogeensed ained ja kontsentratsioonid

Analüüsitava aine	Analüüsitava kontsentratsioon (µl / 30 µl eluaat)
Deparafiinimislahus	113 × 10 ⁻⁶
Pesupuhver AW2	0,417

Iga segava aine kohta analüüsiti analüüsiga Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kaheksat tehnilist replikaati, mida rikastati ühekordse rikastamise korral vähiülese rikastuspaneeliga (1,94 Mb) ja sekveneeriti seejärel mooduliga DNA GenerateFASTQ Dx seadmes NextSeq 550Dx.

Mõlema analüüsitud aine puhul vastasid kõik kaheksa proovi toimivusnõuetele ja mingeid häireid analüüsi toimivuses ei täheldatud.

Ristsaastumine

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (naiselt, 10 proovi), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (mehelt, 12 proovi) ja matriitsita kontrollmaterjale (NTC, 2 proovi) analüüsiti analüüsiga Illumina DNA Prep with Enrichment Dx malelauaplaadi paigutuses. Kõik proovid kasutasid proovi ristsaastumise hindamiseks kõige rangemat tingimusena kõrgeimat (1000 ng) gDNA sisendi soovitusi. Analüüsi viisid kaks korda läbi kaks eraldi operaatorit. 12-kordsetes rikastamisreaktsioonides kasutati eksoomipaneeli 1 (45 Mb). Seejärel sekveneeriti rikastatud teek seadmes NextSeq 550Dx mooduliga DNA GenerateFASTQ Dx. Hindamine viidi läbi, hinnates meesspetsiifilise Y-kromosoomi katvust naiste proovides võrreldes naiste proovide täisplaadi taustatasemega ja NTC proovide indeksi esitusega.

Tabel 10 Ristsaastumise tulemused

Naiste proovid meeste Y-kromosoomi katvusega < 3x algtaseme müraga	Indeksi esitus NTC-s
100%	< 0,0005%

Lisa: Illumina UD-indeksite adapterijärjestused

Need ainulaadsed kahe (UD) indeksiga adapterid on paigutatud plaadile, et jõustada soovitud sidumisstrateegia. Indeksadapterid on 10 aluse pikkused tavalise kaheksa aluse asemel.

Index 1 (i7) adapterid

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (i5) adapterid

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

1. lugemi ja 2. lugemi adapterite kärpimiseks kasutatakse järgmist järjestust.

CTGTCTCTTATACACATCT

Plaat A / kogum 1 indeksiadapterid

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAAC TGAA
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

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGCACTAATG	TGACTACATA
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGGT	CTCATAGCGA
UDP0083	GTAAGGCATA	AGACACATTA
UDP0084	GTCCACTTGT	GCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	CATGAGTACT

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	CATGTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Plaat B / kogum 2 indeksiadapterid

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCTG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGTT
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	TTGCTTGAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA

Indeksi nimi	i7 alust adapteris	i5 alust adapteris
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCTA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
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	GAGTTGTACT

Muudatuste ajalugu

Dokument	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
Dokument nr 200019584 v02	September 2022	Lisati sisu seadme NovaSeq 6000Dx sekveneerimistoe kohta.
Dokument nr 200019584 v01	Mai 2022	Lisati sekveneerimissüsteemide nimed ja katalooginumbrid. Eemaldati ühe indeksiga teekide ainulaadne topeltindekseerimise teave.
Dokument nr 200019584 v00	Mai 2022	Esialgne väljalase.

Patendid ja kaubamärgid

See dokument ja selle sisu kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. ja selle tütarettevõtetele („Illumina“) ning on mõeldud kasutamiseks ainult ettevõtte lepingulistele klientidele seoses selles dokumendis kirjeldatud toote (toodete) kasutamisega ega ole mõeldud mitte mingiks muuks otstarbeks. Seda dokumenti ega selle sisu ei tohi mis tahes viisil kasutada ega muul eesmärgil levitada ja/või edastada, avaldada või reprodutseerida ilma Illumina eelneva kirjaliku nõusolekuta. Illumina ei anna selle dokumendiga kolmandale isikule oma patendi-, kaubamärgi-, autori-, tava- või muu sarnase õiguse alusel mitte ühtegi litsentsi.

Kvalifitseeritud ja asjakohase koolituse saanud töötajad peavad selles dokumendis kirjeldatud juhiseid järgima rangelt ja üksikasjalikult, et tagada siin kirjeldatud toote (toodete) õige ja ohutu kasutusviis. Siinse dokumendi sisu tuleb enne nimetatud toote (toodete) kasutamist täies ulatuses läbi lugeda ja endale selgeks teha.

SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD JUHISTE MITTE LUGEMINE JA MITTE ÜKSIKASJALIKULT JÄRGIMINE VÕIB KAHJUSTADA TOODET (TOOTEID), VIGASTADA INIMESI (SH KASUTAJAID VÕI TEISI) JA KAHJUSTADA MUUD VARA. NIMETATUD JUHUL EI KEHTI ÜKSKI TOOTELE (TOODETELE) ANTUD GARANTII.

ILLUMINA EI VASTUTA SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD TOOTE (TOODETE) (SEALHULGAS TOOTE OSAD VÕI TARKVARA) VÄÄRKASUTUSE EEST.

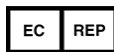
© 2022 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

Kõik kaubamärgid kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. või nende vastavatele omanikele. Kaubamärgi kohta lisateabe saamiseks vt www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktteave



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+ 1 800 809 ILMN (4566)
+1 85 8202 4566 (väljaspool Põhja-Ameerikat)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Sponsor Austraalias

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

Toote märgistus

Toote pakendil ja etikettidel olevate sümbolite täieliku kirjelduse leiate, kui külastate aadressi support.illumina.com ja avate oma komplekti vahekaardi *Documentation* (Dokumendid).