

IN VITRO -DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN
VAIN VIENTIIN

Aiottu käyttötarkoitus

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit on reagenssi- ja tarvikesarja, joka on tarkoitettu näytekirjastojen valmisteluun ihmisen soluista ja kudoksesta peräisin olevasta genomisesta DNA:sta. Mielenkiinnon kohteena oleviin spesifisiin genomisiin alueisiin kohdistettujen kirjastojen valmistelu edellyttää käyttäjän hankkimia koetinpaneeleita. Luodut näytekirjastot on tarkoitettu käytettäväksi Illuminan sekvensointijärjestelmissä.

Menetelmän periaatteet

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on tarkoitettu sellaisten DNA-sekvensointikirjastojen valmisteluun, jotka on rikastettu kohdealueiden kohdalla ihmisen soluista ja kudoksesta saadusta genomisesta DNA:sta.

Käyttäjän toimittamia biotinyloituja oligonukleotidipaneeleita tarvitaan kohteen rikastukseen. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva paneelikokoalueen kanssa, pienistä paneeleista (< 20 000 anturia) suuriin paneeleihin (> 200 000 anturia) saakka. Luodut rikastetut kirjastot on tarkoitettu sekvensointiin Illumina-sekvensointijärjestelmissä.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan toimenpide koostuu seuraavista vaiheista:

- **Tagmentin genomi-DNA** – DNA-syötteen tagmentointiin on käytössä Enrichment BLT Small (eBLTS). Tagmentoinnin aikana gDNA is fragmentoidaan ja varustetaan sovitintunnisteilla yhden vaiheen aikana. EBLTS:n kyllästyksen tagmentointireaktiossa tarvitaan vähintään 50 ng:n DNA-syöte. Kyllästettynä eBLTS fragmentoi asetetun määrän DNA-molekyylejä sellaisten normalisoitujen kirjastojen luomiseksi, joiden fragmenttikokojakauma on yhdenmukainen.
- **Tagmentoinnin jälkeinen puhdistus** – puhdistaa sovitintunnisteella varustetun DNA:n eBLTS:ssä monistuksessa käytettäväksi
- **Tagmentoidun DNA:n monistaminen** – monistaa tagmentoidun DNA:n rajoitetun syklin PCR-ohjelmalla. Ainutkertaiset kaksoisindeksit (UD) lisätään DNA-fragmenttien päihin, jolloin voidaan ottaa käyttöön ainutkertainen DNA-kirjastojen viivakoodaus ja klustereiden luonti sekvensoinnin aikana.
- **Kirjastojen puhdistus** – raepuhdistustoimenpiteen avulla monistetut DNA-kirjastot puhdistetaan ja niiden koko valitaan.
- **Kirjastojen poolaus** – yhdistää ainutkertaisilla indekseillä varustetut DNA-kirjastot yhdeksi enintään 12 kirjaston pooliksi. Kirjastot voidaan poolata tilavuuden tai massan mukaan.
- **Antureiden hybridisaatio** – koostuu hybridisaatioreaktiosta, jonka aikana kaksisäikeiset DNA-kirjastot denaturoidaan ja biotinyloitujen DNA-antureiden paneeli hybridisoidaan kohdegenomialueiksi.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva useiden paneelien kanssa. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja ei sisällä rikastuspaneelia. Käyttäjä toimittaa anturipaneelit, ja niiden on oltava vaadittavien teknisten tietojen mukaisia. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan reagenssit ovat yhteensopivia sekä Illuminan että vaadittavien teknisten tietojen mukaisten kolmannen tahon DNA-rikastusoligonukleotidipaneelien kanssa. Tietoa kolmansien tahojen paneelilta edellytettävistä teknisistä tiedoista on kohdassa [Rikastusanturipaneelin vaatimukset sivulla 9](#).
- **Hybridisoitujen antureiden kaappaus** – Streptavidin Magnetic Beads (SMB3, Streptavidin-magneettirakeet) -magneettirakeita käytetään sellaisten biotinyloitujen antureiden kaappaukseen, jotka on hybridisoitu kohdealueille.
- **Rikastettujen kirjastojen monistaminen** – PCR:ää käytetään rikastettujen kirjastojen monistamiseen.
- **Monistettujen rikastettujen kirjastojen puhdistus** – sekvensointiin valmiit rikastetut kirjastot puhdistetaan raepuhdistustoimenpiteellä.
- **Sekvensointi** – rikastettujen kirjastojen sekvensointi suoritetaan MiSeqDx-, NextSeq 550Dx- tai NovaSeq 6000Dx -sekvensointijärjestelmissä. MiSeqDx ja NextSeq 550Dx: Integroitua DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager -moduulia käytetään sekvensointiajon valmisteluun, ajon valvontaan ja ensisijaiseen analyysiin (FASTQ-luonti emäksen tunnistuksista). NovaSeq 6000Dx:ssä DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellusta käytetään ajon määritykseen ja toissijaiseen analyysiin useilla käytettävissä olevilla työnkuluilla.

Menetelmän rajoitukset

- *In vitro* -diagnostiseen käyttöön.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva ihmisen soluista ja kudoksesta saatavan genomi-DNA:n kanssa.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva kaksisäikeisten 50–1 000 ng:n gDNA-syötteiden kanssa. Suorituskykyä ei taata, mikäli syötteet jäävät näiden kynnysten ulkopuolelle.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja ei sisällä DNA:n eristykseen tarkoitettuja reagensseja. Analyytiset testaustulokset, muun muassa interferenssitestaus, jotka ilmoitetaan kohdassa [Suorituskykyominaisuudet sivulla 55](#), on saatu käyttämällä kokoverta ja FFPE:tä edustavina näytetyyppeinä edustavien DNA-eristyssarjojen avulla. Kaikki diagnostiset testit, jotka on kehitetty käytettäväksi Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan reagenssien kanssa, edellyttävät kaikkien suorituskykynekohtien täydellistä validointia valitulla DNA-eristyssarjalla.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjaa ei suositella huonolaatuisille FFPE-näytteille, joissa on $\Delta Cq > 5$. Sellaisten näytteiden, joissa $\Delta Cq > 5$, käyttäminen kanssa saattaa lisätä kirjaston valmistelun epäonnistumisen mahdollisuutta ja heikentää määritysten suorituskykyä.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan reagenssit on määritetty ja testattu seuraavassa taulukossa ilmoitetun näytesyötteen, rikastusreaktioiden ja pleksisyyden osalta.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja	Näytesyöte	Rikastusreaktiot	Rikastuksen pleksisyys
16 näytteen sarja	Heikko laatu (FFPE)	16 reaktiota	1-pleksinen
96 näytteen sarja	Korkea laatu (esim. kokoveri)	8 reaktiota	12-pleksinen

- FFPE-syötteen käsittely on testattu ja sitä suositellaan ainoastaan 1-pleksisille rikastusreaktioille, kun käytetään 16 näytteen sarjaa.
- 96 näytteen sarjassa muut kuin vakiopleksisyys (2-pleksisestä 11-pleksiseen) ovat mahdollisia, mutta niihin liittyvät seuraavat rajoitukset:
 - 2–11-pleksisissä rikastusreaktioissa olevien näytteiden käsittely alentaa sarjan käsittelynopeutta.
 - Optimaalisia tuloksia ei taata. Sopivan rikastustuotoksen saaminen muun kuin vakiopleksisyyden kohdalla saattaa edellyttää lisäoptimointia.
 - Alhaisen pleksisyyden poolausstrategioissa (2-pleksisestä 8-pleksiseen) on valittava monimuotoisilla sekvensseillä varustettuja indeksisovittimia, jotta voidaan optimoida väritasapaino, jota vaaditaan onnistuneeseen sekvensointiin ja tietoanalyysiin. MiSeqDx:n ja NextSeq 550Dx:n DNA GenerateFASTQ Dx -moduulissa tarjotaan vaihtoehtoja väritasapainotettuja indeksiyhdistelmiä varten ajon määrityksen aikana. Lisätietoja poolausstrategioista on kohdassa [Poolausmenetelmät sivulla 32](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on rajoitettu toimittamaan rikastettuja kirjastoja, jotka on sekvensoitu vain MiSeqDx:llä, NextSeq 550Dx:llä ja NovaSeq 6000Dx:llä. Muiden sekvensointijärjestelmien käyttö edellyttää kaikkien suorituskykykökohtien täydellistä validointia.
- Rikastuspaneelit eivät ole osa tätä tuotetta. Analytyttiset testaustulokset, jotka on ilmoitettu kohdassa [Suorituskykyominaisuudet sivulla 55](#), on saatu aikaan edustavilla rikastuspaneelilla, ja ne ilmoitetaan vain tiedonantotarkoituksissa. Analytyttisiä suorituskykyominaisuuksia käytetään esimerkkeinä määrityksen yleisestä kapasiteetista, eikä niillä määritetä tiettyjen määritykseen liittyviä väitteitä koskevaa kapasiteettia tai soveltuvuutta. Kaikki diagnostiset testit, jotka on kehitetty käytettäväksi näiden reagenssien kanssa, edellyttävät täyttä validointia kaikkien suorituskykykökohtien kohdalla.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva sekä Illuminan että kolmansien tahojen rikastuspaneelien kanssa. Muiden kuin paneelivaatimukset täyttävien kolmannen tahon rikastuspaneelien suorituskykyä ei kuitenkaan taata. Lisätietoja paneelivaatimuksista on kohdassa [Rikastusanturipaneelin vaatimukset sivulla 9](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjassa käytetään 2 tunnin hybridisaatioaikaa. Pidemmän hybridisaatioajan käyttö saattaa vaikuttaa suorituskykymittareihin.
- DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager -moduulit MiSeqDx:lle ja NextSeq 550Dx:lle tuottavat vain FASTQ-tiedostoja. Jos käytät näitä moduuleja, sinun on suoritettava toissijaisten analyysien validointi.

- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellus on saatavilla NovaSeq 6000Dx:llä. Sovellus tukee useita toissijaisia analyysityönkulkuja, mukaan lukien FASTQ-sukupolvi, FASTQ- ja VCF-sukupolvi ituradan varianttien tunnistamiseen sekä FASTQ- ja VCF-generointi somaattisten varianttien tunnistamiseen. Jos käytät sovellusta VCF-generointiin, sinun ei tarvitse suorittaa toissijaisten analyysien validointia.
- Katso Dragen for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen rajoitukset, kun sitä käytetään NovaSeq 6000Dx:n kanssa, *NovaSeq 6000Dx -laitteen pakkausselosteesta (asiakirjanumero 200025276)*.

Tuotteen osat

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja koostuu seuraavista komponenteista.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx UD-indeksijoukolla A, luettelonro 20051354 (16 näytettä), tai nro 20051352 (96 näytettä)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx UD-indeksijoukolla B, luettelonro 20051355 (16 näytettä), tai nro 20051353 (96 näytettä)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx -moduuli NextSeq 550Dx:lle, luettelonro 20063024
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx -moduuli MiSeqDx:lle, luettelonro 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep ja Enrichment Dx -sovellus NovaSeq 6000Dx:lle, luettelonro 20074609

Mukana tulevat reagenssit

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx:n täydentämiseksi vaaditaan Illumina DNA Prep with Enrichment Dx UD-indeksijoukolla A tai Illumina DNA Prep with Enrichment Dx UD-indeksijoukolla B. Voit suorittaa seuraavan määrän kirjaston valmisteluja ja rikastusreaktioita 16 näytteen tai 96 näytteen sarjalla.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja			
	Näytesyöte	Rikastusreaktiot	Rikastuksen pleksisyys
16 näytteen sarja	Heikko laatu (FFPE)	16 reaktiota	1-pleksinen
96 näytteen sarja	Korkea laatu (esim. kokoveri)	8 reaktiota	12-pleksinen

illumina DNA Prep with Enrichment Dx UD-indeksijoukolla A/B

illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, säilytetään 15–30 °C:n lämpötilassa

Seuraavat reagenssit toimitetaan huoneenlämpötilassa. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

Reagenssin nimi	Putkimäärä		Korkin väri	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat
	16 näytettä (nro 20050020)	96 näytettä (nro 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Punainen	350 µl	Puhdistusaineliuos vedessä
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Vihreä	41 ml	Puhdistusainetta ja suolaa sisältävä puskuroitu vesiliuos
Cleanup Beads (CB)	1	Ei sovelleta*	Punainen	10 ml	Kiinteän faasin paramagneettiset rakeet puskuroidussa vesiliuoksessa

*96 näytteen kohdalla puhdistusrakeet sisältyvät illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples -tuotteeseen (luettelonro 20050030).

illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 Samples), säilytetään 15–30 °C:n lämpötilassa

96 näytteen sarjassa puhdistusrakeet sisältyvät illumina Prep Dx Cleanup Beads -tuotteeseen (luettelonro 20050030). Seuraava reagenssi toimitetaan huoneenlämpötilassa. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi. 16 näytteen sarjoissa puhdistusrakeet sisältyvät illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 -tuotteeseen (luettelonro 20050020).

Reagenssin nimi	Määrä	Korkin väri	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat
Cleanup Beads (CB)	4	Punainen	10 ml	Kiinteän faasin paramagneettiset rakeet puskuroidussa vesiliuoksessa

illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, säilytetään 2–8 °C:n lämpötilassa

Seuraavat reagenssit lähetetään jääkaappikylmänä. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi. Säilytä eBLTS-varastoputkea pystyasennossa niin, että rakeet on aina upotettu puskuriin.

Reagenssin nimi	Putkimäärä		Korkin väri	Täyttötilavuus		Aktiiviset ainesosat
	16 näytettä (nro 20050021)	96 näytettä (nro 20050026)		16 näytettä	96 näytettä	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Keltainen	200 µl	290 µl	Magneettiset streptavidinirakeet, jotka on linkitetty transposoneilla puskuroituun vesiliuokseen, joka sisältää glyserolia, EDTA:ta, dithiotreitolia, suolaa ja puhdistusainetta
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Kirkas	1,8 ml	1,8 ml	Puskuroitu vesiliuos

illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, säilytetään –25...–15 °C:n lämpötilassa

Seuraavat reagenssit lähetetään pakastettuna. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

Reagenssin nimi	Putkimäärä		Korkin väri	Täyttötilavuus		Aktiiviset ainesosat
	16 näytettä (nro 20050022)	96 näytettä (nro 20050027)		16 näytettä	96 näytettä	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Kirkas	290 µl	290 µl	Magnesiumsuolaa ja dimetyyliformamidia sisältävä puskuroitu vesiliuos
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Kirkas	200 µl	610 µl	DNA:n polymeraasi ja dNTP:t puskuroidussa vesiliuoksessa

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 samples), säilytetään 2–8 °C:n lämpötilassa

16 näytteen sarjojen kohdalla seruaavat reagenssit on sisällytetty Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 -tuotteeseen (luettelonro 20050023). 96 näytteen sarjojen kohdalla reagenssit on sisällytetty Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 -tuotteeseen (luettelonro 20050028).

Seuraavat reagenssit lähetetään jääkaappikylmänä. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

Reagenssin nimi	Putkimäärä	Korkin väri	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Kirkas	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads -magneettirakeet puskuroidussa vesiliuoksessa, joka sisältää formamidia, puhdistusainetta ja suolaa
Resuspension Buffer (RSB)	1	Kirkas	1,8 ml	Puskuroitu vesiliuos
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Kirkas	200 µl	Puhdistusainetta ja suolaa sisältävä puskuroitu vesiliuos
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Kirkas	200 µl	Puskuroitu vesiliuos

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 samples), säilytetään 2–8 °C:n lämpötilassa

96 näytteen sarjojen kohdalla seuraavat reagenssit on sisällytetty Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 -tuotteeseen (luettelonro 20050028). 16 näytteen sarjojen kohdalla reagenssit on sisällytetty IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 -tuotteeseen (luettelonro 20050023).

Seuraavat reagenssit lähetetään jääkaappikylmänä. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

Reagenssin nimi	Putkimäärä	Korkin väri	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Kirkas	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads -magneettirakeet puskuroidussa vesiliuoksessa, joka sisältää formamidia, puhdistusainetta ja suolaa
Resuspension Buffer (RSB)	4	Kirkas	1,8 ml	Puskuroitu vesiliuos

Reagenssin nimi	Putkimäärä	Korkin väri	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Kirkas	200 µl	Puhdistusainetta ja suolaa sisältävä puskuroitu vesiliuos
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Kirkas	200 µl	Puskuroitu vesiliuos

illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, säilytetään -25...-15 °C:n lämpötilassa

Seuraavat reagenssit lähetetään pakastettuna. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

Reagenssin nimi	Putkimäärä		Korkin väri	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat
	16 näytettä (nro 20050024)	96 näytettä (nro 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Kirkas	580 µl	Puhdistusaineliuos vedessä
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Kullanruskea	4,1 ml	Suoloja ja puhdistusainetta sisältävä puskuroitu vesiliuos
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Kirkas	320 µl	PCR-alukesekoite (oligonukleotidit)
2N NaOH (HP3)	1	1	Kirkas	200 µl	2 N natriumhydroksidiliuos (NaOH)
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Sininen	480 µl	Puskuroitu vesiliuos Cot-1 DNA:lla, tihennysaineella ja formamidilla
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Kirkas	200 µl	DNA:n polymeraasi ja dNTP:t puskuroidussa vesiliuoksessa

illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, säilytetään -25...-15 °C:n lämpötilassa

Seuraavat reagenssit lähetetään pakastettuna. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi. Katso indeksisovitinsekvenssin tiedot julkaisusta [Liite: illumina UD -indeksisovitinsekvenssit sivulla 58](#).

Osa	Määrä
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Indexes), nro 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 Indexes), nro 20050039	1

Erikseen hankittavat reagenssit

Erikseen hankittavat pakolliset reagenssit

- DNA-eristys- ja puhdistusreagenssit
- DNA-kvantifointireagenssit
- Etanoli (200-kelpoinen molekyylibiologiaan)
- Nukleaasiton vesi
- 1M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- 1N NaOH -liuos, molekyylibiologiaatu
- Jos käytössä on NextSeq 550Dx -sekvensointijärjestelmä:
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (luettelonro 20028871)
- Jos käytössä on MiSeqDx-sekvensointijärjestelmä:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (luettelonro 20037124)
- Jos käytössä on NovaSeq 6000Dx -sekvensointijärjestelmä:
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (luettelonro 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (luettelonro 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (luettelonro 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (luettelonro 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (luettelonro 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (luettelonro 20062291)

Rikastusanturipaneelin vaatimukset

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan reagenssit ovat yhteensopivia sekä Illuminan että kolmansien tahojen DNA-rikastusoligonukleotidipaneelien kanssa. Jos käytetään kolmannen tahon biotinyloituja DNA-antureita (kiinteät tai mukautetut paneelit), varmista, että ne ovat vaadittavien teknisten tietojen mukaisia.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on optimoitu ja validoitu seuraavien kolmannen tahon paneelien koskevien teknisten tietojen avulla. Vertailukelpoista suorituskykyä ei taata käytettäessä kolmansien tahojen paneelien, jotka eivät ole teknisten tietojen mukaisia.

- Anturin pituus 80 bp tai 120 bp
- 500–675 000 anturin välillä
- Yksi- tai kaksisäikeinen DNA
- Anturin kokonaissyöte ≥ 3 pmol rikastukseen, kun pleksisyys vaihtelee 1-pleksisestä 12-pleksiseen

Säilytys ja käsittely

- Huoneen lämpötilan määritelmänä on 15–30 °C.
- Reagenssit ovat stabiileja pakkauksen merkinnöissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään asti, kun niitä säilytetään ilmoitetuissa olosuhteissa. Katso säilytyslämpötilat kohdasta [Mukana tulevat reagenssit sivulla 4](#).
- Pakastetut reagenssit ovat stabiileja enintään neljän sellaisen jäädytys-/sulatussyklin ajan, jotka suoritetaan ennen määritettyä viimeistä käyttöpäivää.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan toimenpide koostuu seuraavista turvallisista pysähdyspisteistä:
 - Tagmentoidun DNA:n monistuksen ([Tagmentoidun DNA:n monistaminen sivulla 27](#)) jälkeen monistetut kirjasot ovat stabiileja enintään 30 vuorokautta –25...–15 °C:n lämpötilassa säilytettynä.
 - Kirjastojen puhdistuksen ([Kirjastojen puhdistus sivulla 30](#)) jälkeen puhdistetut monistetut kirjasot ovat stabiileja enintään 30 vuorokautta –25...–15 °C:n lämpötilassa säilytettynä.
 - Esirikastettujen kirjastojen poolauksen ([Esirikastettujen kirjastojen poolaus sivulla 32](#)) jälkeen poolatut kirjasot ovat stabiileja enintään 30 vuorokautta –25...–15 °C:n lämpötilassa säilytettynä.
 - Rikastetun kirjaston monistuksen ([Rikastetun kirjaston monistaminen sivulla 42](#)) jälkeen rikastettujen monistettujen kirjastojen levy voi jäädä lämpöblokkiin enintään 24 tunniksi. Vaihtoehtoisesti levyä voidaan säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 48 tuntia.
 - Lopulliset puhdistetut rikastetut kirjasot ovat stabiileja enintään 7 vuorokautta –25 ... –15 °C:n lämpötilassa säilytettynä.
- Jos pakkaus tai Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan sisältö vaurioituu tai vaarantuu, ota yhteyttä Illuminan asiakaspalveluun.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) saattaa muodostaa näkyviä saostumia tai kristalleja. Jos havaitaan saostumia, lämmitä 37 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia ja vorteksoi sitten, kunnes saostumat liukenevat.
- Hybridisaatio-oligot (HYB) ja Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) on esilämmitettävä samaan lämpötilaan kuin hybridisaation pitolämpötila, jota sovelletaan näytetyyppejä ja anturipaneelia kohti. Lisätietoja NHB2:n ja EEW:n käsittelystä on kohdassa [Toimenpidehuomautukset sivulla 15](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) ja HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) saattavat johtaa kristalleihin ja sameuteen. Jos havaitaan kristalleja ja sameutta, vorteksoi tai sekoita pipetoimalla ylös ja alas, kunnes liuos on kirkasta. Varmista, että NHB2 esilämmitetään ennen pipetointia.

- Noudata puhdistusrakeiden (CB) käsittelyn yhteydessä seuraavia parhaita käytäntöjä:
 - Älä koskaan pakasta rakeita.
 - Vorteksoi rakeita juuri ennen käyttöä, kunnes ne ovat suspendoituneet uudelleen ja kunnes väri vaikuttaa tasaiselta.
- Noudata Enrichment BLT Small (EBLTS) -valmisteen käsittelyn yhteydessä seuraavia parhaita käytäntöjä:
 - Säilytä eBLTS-putkea pystyasennossa niin, että rakeet on aina upotettu puskuriin.
 - Vorteksoi eBLTS:ää perusteellisesti, kunnes rakeet on suspendoitu uudelleen. Jotta voidaan välttyä rakeiden uudelleenasettamiselta, sentrifugointia ei suositella ennen pipetointia.
 - Jos rakeet kiinnittyvät 96 levyn sivulle tai yläosaan, sentrifugoi 280 × g:ssa 3 sekuntia ja uudelleensuspendoi sen jälkeen pipetoimalla.
- Noudata indeksisovitinlevyjen käsittelyn yhteydessä seuraavia parhaita käytäntöjä:
 - Älä lisää näytteitä indeksisovitinlevylle.
 - Kaikki indeksilevyn kuopat ovat kertakäyttöisiä.

Tarvittavat välineet ja materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Varmista ennen protokollan käynnistämistä, että sinulla on tarvittavat laitteet ja materiaalit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan lisäksi.

Laitteet

Varmista, että käytössäsi on kaikki vaaditut laitteet ennen protokollan aloittamista.

Protokolla on optimoitu ja validoitu luettelon teknisten tietojen avulla. Vertailukelpoista suorituskykyä ei taata teknisten tietojen ulkopuolelle jääviä laitteita käytettäessä.

Joitakin materiaaleja tarvitaan vain tiettyihin työkulkuihin. Ne on määritetty erillisissä taulukoissa.

- Lämpöblokki seuraavin tiedoin:
 - Lämmitetty kansi
 - Lämpötilan vähimmäissäätoalue 10–98 °C
 - Lämpötilan vähimmäistarkkuus ±0,25 °C
 - Enimmäisreaktiotilavuus 100 µl
 - Yhteensopiva full-skirted-tyyppisten 96 kuopan PCR-levyjen kanssa
- Mikronäytteen inkubaattori seuraavin teknisin tiedoin:
 - Ympäristön lämpötila-alue +5,0–99,0 °C
 - Yhteensopiva 96 kuopan MIDI-levyjen kanssa

- Mikronäytteen inkubaattori-insertit, jotka ovat yhteensopivia 96 kuopan MIDI-levyjen kanssa
- Suurnopeuksinen mikrolevyravistin, jonka sekoitusnopeusalue on 200–3 000 kierrosta minuutissa
- 96 kuopan PCR-levyjen kanssa yhteensopiva magneettinen jalusta
- 96 kuopan MIDI-levyjen kanssa yhteensopiva magneettinen jalusta
- Kvantifiointimenetelmän kanssa yhteensopiva fluoromittari
- DNA-fragmenttianalysointilaite
- Tarkkuuspipetit:
 - 10 µl:n yksi- ja monikanavapipetit
 - 20 µl:n yksi- ja monikanavapipetit
 - 200 µl:n yksi- ja monikanavapipetit
 - 1 000 µl:n yksikanavapipetit
 - Tarkkuuspipeteillä varmistetaan tarkka reagenssien ja näytteiden toimitus. Yksikanavaisia tai monikanavaisia pipettejä voidaan käyttää, jos ne kalibroidaan säännöllisesti ja jos ne ovat tarkkoja 5 %:n sisällä ilmoitetusta tilavuudesta.
- Mikrolevysentrifugi
- Mikrosentrifugi
- Yksi seuraavista Illumina-sekvensointijärjestelmistä:
 - MiSeqDx Instrument, luettelonro DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx Instrument, luettelonro 20005715
 - NovaSeq 6000Dx Instrument, luettelonro 20068232
- [Valinnainen] Tyhjiökeskitin
- [FFPE] Reaaliaikainen PCR-tunnistusjärjestelmä

Materiaalit

Varmista, että käytössäsi on kaikki vaaditut materiaalit ennen protokollan aloittamista.

Joitakin materiaaleja tarvitaan vain tiettyihin työkulkuihin. Ne on määritetty erillisissä taulukoissa.

Protokolla on optimoitu ja validoitu luettelon kohteiden avulla. Vertailukelpoista suorituskykyä ei taata vaihtoehtoisia materiaaleja käytettäessä.

- Suodatetut pipettikärjet
- Kartiomaiset sentrifugiputket, 15 ml tai 50 ml
- 1,5 ml:n mikrosentrifugiputket
- RNAasittomat/DNAasittomat monikanava-reagenssisäiliöt, kertakäyttöiset
- RNAasittomat/DNAasittomat 8 putken rivit ja korkit
- Serologiset pipetit

- 96 kuopan polypropeeninen syväkuoppa-säilytyslevy, 0,8 ml (MIDI-levy)
- Kovakuoriset 96 kuopan full-skirted-tyypin PCR-levyt
- [FFPE] qPCR-laitteen kanssa yhteensopivat qPCR-levyt
- Liimapintaiset sulkukannet 96 kuopan levyille seuraavin tiedoin:
 - Irrotettavaa, optisesti kirkasta polyesteriä
 - Soveltuu skirted-tyypin PCR-levyille
 - Vahva liimapinta, joka kestää useita lämpötilanvaihteluja –40 °C...110 °C
 - DNAasiton/RNAasiton
- Muoviset tarvikkeet, jotka ovat yhteensopivia valitun kvantifointimenetelmän kanssa
- Fluorometrinen dsDNA-kvantifointisarja, joka on yhteensopiva valitun kvantifointijärjestelmän kanssa:
 - Ennalta rikastettujen monistettujen kirjastojen kvantifointiin voidaan käyttää laajan alueen kvantifointisarjaa.
 - Rikastettujen kirjastojen kvantifoinnin kohdalla kvantifointisarjan alue riippuu käytettävästä anturipaneelistä.
- Fragmenttianalyysisarja kirjaston kvalifointiin valitulla kvalifointijärjestelmällä:
 - Ennalta rikastettujen monistettujen kirjastojen kvalifointiin voidaan käyttää laajan alueen kvalifointisarjaa.
 - Rikastettujen kirjastojen kvalifoinnin kohdalla kvalifointisarjan alue riippuu käytettävästä anturipaneelistä.
- [Valinnainen] sarja DNA:n eristykseen ihmisen soluista ja kudoksesta. Voit käyttää mitä tahansa validoitua eristämismenetelmää.

Näytteiden ottaminen, kuljettaminen ja säilyttäminen



HUOMIO

Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti tartuntavaarallisina aineina.

- Tämä määrittäminen on yhteensopiva ihmisen soluista ja kudoksesta saatavan genomi-DNA:n kanssa.
- Varmista kaupallisesti saatavilla olevan puhdistetun gDNA:n kohdalla, että näytteet on kuljetettu oikeissa olosuhteissa ja että niitä on säilytetty valmistajan ohjeiden mukaan. Noudata gDNA-syklien säilytyksessä ja pakastuksessa sekä sulatuksessa parhaita käytäntöjä.

- Noudata kokoverisyötteen kohdalla veren keräystä, kuljetusta ja säilytystä koskevia vaatimuksia, joita sovelletaan valittuun DNA:n eristysmenetelmään. Mitä tahansa validoitua eristämismenetelmää voidaan käyttää. Kokoveren kuljetuksessa on noudatettava kaikkia maakohtaisia, osavaltiokohtaisia ja paikallisia sovellettavia säädöksiä etiologisten aineiden kuljetuksesta.
- DNA:n eristämiseen FFPE-kudoksesta voidaan käyttää mitä tahansa validoitua eristysmenetelmää. Noudata valittua eristysmenetelmää koskevia ohjeita ja suosituksia seuraavien käytäntöjen määrittämiseksi:
 - Formaaliiniikiinnitys- ja parafiiniupotusmenetelmä kudoksille eristetyn DNA:n parhaan laadun varmistamiseksi.
 - FFPE-näytteiden säilytys.
 - Aloitusmateriaalivaatimukset, kuten FFPE-osioiden määrä ja paksuus. Useimmissa puhdistusmenetelmissä suositellaan vastaleikattujen osioiden käyttöä.

Varoitukset ja varotoimet

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan reagenssit sisältävät kemikaaleja, jotka saattavat olla vaarallisia. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Saat ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta (KTT) osoitteessa support.illumina.com/sds.html.
- Käsittele kaikkia verinäytteitä aivan kuten niissä olisi tarttuvaa ihmisen immuunikatovirusta (HIV), ihmisen hepatiitti B -virusta (HBV) ja muita veren välityksellä tarttuvia taudinaiheuttajia (yleiset varotoimet).
- Noudata normaaleja laboratoriotyön varotoimia. Älä pipetoi suun avulla. Älä syö, juo tai tupakoi työhön varatuilla alueilla. Käytä kertakäyttöisiä hansikkaita ja laboratoriotakkeja, kun käsittelet näytteitä tai sarjareagensseja. Pese kädet huolellisesti näytteiden ja sarjareagenssien käsittelyn jälkeen.
- Näytteen tai reagenssin huononemisen estämiseksi on varmistettava, että puhdistuksen jättämät natriumhypokloriittihöyryt ovat haihtuneet täysin ennen protokollan aloittamista.
- Näytteiden kontaminoituminen muilla PCR-tuotteilla/amplikoneilla saattaa aiheuttaa epätarkkoja ja epäluotettavia tuloksia. Voit välttyä kontaminaatiolta noudattamalla seuraavia parhaita käytäntöjä:
 - Noudata asianmukaisia laboratorionkäytäntöjä ja laboratoriohygieniaa.
 - Suorita työnkulun vaiheet nimetyillä monistusta edeltävillä tai sen jälkeisillä alueilla.
 - Säilytä reagensseja ennen kirjastojen puhdistusta monistusta edeltävällä alueella.
 - Erotta monistusta edeltävät reagenssit monistuksen jälkeisistä reagensseista.
 - Varmista, että monistusta edeltävän ja sen jälkeisen työn alueilla on omat laitteet ja varusteet, kuten pipetit, pipettikärjet, vorteksilaite ja sentrifugi.

- Vältä ristikontaminaatiota. Käytä uusia pipettikärkiä näytteiden välillä ja reagenssien lisäämisen välillä. Suodatettujen kärkien käyttö vähentää amplikonin siirtymisen ja näytteiden välisen ristikontaminaation riskiä.
 - Kun lisätään tai siirretään näytteitä tai reagenssin Master-sekoitteita, vaihda kärkiä jokaisen näytteen välillä.
 - Kun lisätään indeksisovittimia monikanavapipetillä, vaihda kärkiä kunkin rivin tai kunkin sarakkeen välillä. Jos käytetään yksikanavapipettejä, vaihda kärkiä jokaisen näytteen välillä.
 - Poista käyttämättömät indeksisovitinlevyt työskentelyalueelta.
- Noudata etanolipesuvaiheissa seuraavia parhaita käytäntöjä:
 - Valmista aina tuoretta 80 %:n etanolia. Etanoli voi absorboida vettä ilmasta, mikä saattaa vaikuttaa tuloksiin.
 - Varmista, että etanoli poistetaan kuoppien pohjalta pesuvaiheiden aikana. Etanolijäämät voivat vaikuttaa tuloksiin.
 - Varmista täydellinen haihtuminen noudattamalla magneettisen jalustan vaiheille määritettyä kuivumisaikaa. Etanolin jäämät voivat vaikuttaa myöhempien reaktioiden toimintaan.
- Valmista Master-sekoitteet aina ennen käyttöä äläkä koskaan säilytä yhdistettyjä työliuoksia.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan suorituskykyä ei taata, kun toimenpiteitä ei noudateta pakkauselosteessa mainitulla tavalla.
- Sarjan komponentteja ei saa käyttää sarjan etiketissä mainitun viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen.
- Älä vaihda eri Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjojen komponentteja keskenään. Sarjat tunnustetaan sarjan etiketistä.

Toimenpidehuomautukset

DNA-syötesuositukset

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan protokolla on yhteensopiva korkealaatuisen kaksisäikeisen 50–1 000 ng:n genomi-DNA-syötteen (gDNA) kanssa.

Varmista, että alustava gDNA-näyte ei sisällä > 1 mM EDTA:ta ja että siinä ei ole orgaanisia epäpuhtauksia, kuten fenolia ja etanolia. Nämä aineet saattavat häiritä tagmentointireaktiota ja johtaa määrityksen epäonnistumiseen.

gDNA-syöte \geq 50 ng

Välillä 50–1 000 ng gDNA-syötteen kohdalla alustavan gDNA-näytteen kvantifointia ja normalisointia ei tarvita.

gDNA-syöte < 50 ng

Voidaan käyttää 10–50 ng:n DNA-syötteitä seuraavin säädöin:

- Jos käytetään 10–49 ng:n gDNA-syötettä, suositellaan alustavan gDNA-näytteen kvantifiointia tagmentoinnin jälkeen tarvittavien PCR-syklien määrän määrittämiseksi. Käytä fluorometriapohjaista menetelmää kaksisäikeisten gDNA-syötteen kvantifiointiin. Vältä menetelmiä, joilla mitataan kokonaisnukleiinihappoa, kuten NanoDropia tai muita UV-absorbointimenetelmiä.
- Tämä protokolla ei normalisoi lopullisia esirikastettuja kirjastotuotoksia 10–49 ng gDNA:sta ja näin ollen on suoritettava kirjastojen kvantifiointi ja normalisointi ennen rikastusta ja sen jälkeen.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on luonnehdittu ja tarkistettu 50–1 000 ng:n DNA-syötteiden kohdalla. Vastaavaa tuotesuorituskykyä ei voida taata < 50 ng:n gDNA-syötteiden kohdalla.

Verisyötesuoritukset

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva perifeerisestä kokoverestä eristetyn gDNA:n kanssa. Mitä tahansa validoitua eristämismenetelmää voidaan käyttää. Kun gDNA:ta eristetään kokoverestä, syöte-DNA:n alustavaa kvantifiointia ei tarvita, ja Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja tuottaa normalisoituja esirikastettuja kirjastotuotoksia.

Seuraavat tekijät saattavat vaikuttaa kielteisesti kokoverinäytteistä saadun DNA:n määrään ja näin ollen kirjaston normalisointiin.

- Verinäytteen ikä
- Säilytysolosuhteet
- Taustalla olevat sairaudet, jotka vaikuttavat valkosolumäärään

FFPE-kudosnäytesyötettä koskevat suositukset

Käytä onnistuneeseen kirjaston valmisteluun tarvittavan asianmukaisen syötteen määrittämiseen seuraavia FFPE DNA laatukriteereitä:

- Sellaisten FFPE-näytteiden kohdalla, joiden ΔCq -arvo on ≤ 5 , suositeltu DNA-syöte on is 50–1 000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx:ää ei suositella huonolaatuisille FFPE-näytteille, joissa on $\Delta Cq > 5$. Sellaisten näytteiden, joissa $\Delta Cq > 5$, käyttäminen on mahdollista mutta se saattaa lisätä kirjaston valmistelun epäonnistumisen mahdollisuutta ja heikentää määritysten suorituskykyä.

FFPE:n eristäminen

Käytä nukleiinihapon eristysmenetelmää, joka johtaa palautusasteeltaan korkeita tuotoksia, vähentää näytteen kulutuksen minimiin ja säilyttää näytteen eheyden. Voit käyttää FFPE-näytteiden kohdalla mitä tahansa validoitua DNA:n eristämismenetelmää. Kun gDNA:ta eristetään FFPE-kudoksesta, on suoritettava syöte-DNA:n alustava kvantifiointi, ja Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja ei tuota normalisoituja esirikastettuja kirjastotuotoksia.

FFPE DNA -kvalifiointi

FFPE-kudoksesta eristetty gDNA on kvalifioitava ennen käyttöä. Arvioi optimaalisen suorituskyvyn aikaansaamiseksi DNA-näytteen laatu FFPE-näytteistä eristetyn DNA:n kvalifiointiin tarkoitettulla validoidulla eristysmenetelmällä. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -protokolla on yhteensopiva sellaisten FFPE DNA -näytteiden kanssa, joiden ΔCq -arvo on ≤ 5 . Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjaa ei suositella huonolaatuisille FFPE-näytteille, joissa on $\Delta Cq > 5$. Sellaisten näytteiden, joissa $\Delta Cq > 5$, käyttäminen on mahdollista mutta se saattaa lisätä kirjaston valmistelun epäonnistumisen mahdollisuutta ja heikentää määritysten suorituskykyä.

[Valinnainen] FFPE-viitenäytteet

Käytä Horizon HD799:n (DNA) kaltaisia luonnehdittuja viitemateriaaleja positiivisena kontrollina protokollan suorittamisen yhteydessä. Solulinjojen heterografeista saatavia kvalifioituja FFPE-materiaaleja voidaan myös käyttää viitenäytteinä. Käytä fluorometriapohjaista menetelmää viitemateriaalien kvantifiointiin ennen käyttöä.

HUOMAUTUS Positiivisen kontrolliviitenäytteen tai mallittoman kontrollin ajaminen kuluttaa reagensseja ja vähentää sellaisten tuntemattomien näytteiden kokonaismäärää, joka voidaan käsitellä.

Näytesyötettä koskevat suositukset

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan näytesyötettä koskevat suositukset on tiivistetty seuraavassa taulukossa.

Taulukko 1 Näytesyötettä koskevat suositukset

Näytteen syötetyyppi	Näytesyötteen määrä	Tarvittavan syöte-DNA:n kvantifiointi	Vaadittava DNA-syötteen laatu	Normalisoidun esirikastetun kirjaston tuotos
gDNA	10–49 ng	Kyllä	260/280-suhde 1,8–2,0	Ei
gDNA	50–1 000 ng	Ei	260/280-suhde 1,8–2,0	Kyllä
Verestä saatava gDNA	50–1 000 ng	Ei	260/280-suhde 1,8–2,0	Kyllä
FFPE:stä saatava gDNA	50–1 000 ng	Kyllä	ΔCq -arvo ≤ 5	Ei

eBLTS PCR -ohjelman suositeltuja PCR-syklejä säädetään näytesyötepitoisuuden ja -laadun perusteella. Lisätietoja on kohdassa [Tagmentoidun DNA:n monistaminen sivulla 27](#).

Vinkkejä ja tekniikoita

Ristikontaminaation välttäminen.

- Kun lisäät tai siirrät näytteitä, vaihda kärki *kunkin näytteen* välillä.
- Kun lisätään indeksisovittimia monikanavapipetillä, vaihda kärkiä *kunkin rivin* tai *kunkin sarakkeen* välillä. Jos käytetään yksikanavapipettejä, vaihda kärkiä jokaisen näytteen välillä.

Levyn sulkeminen

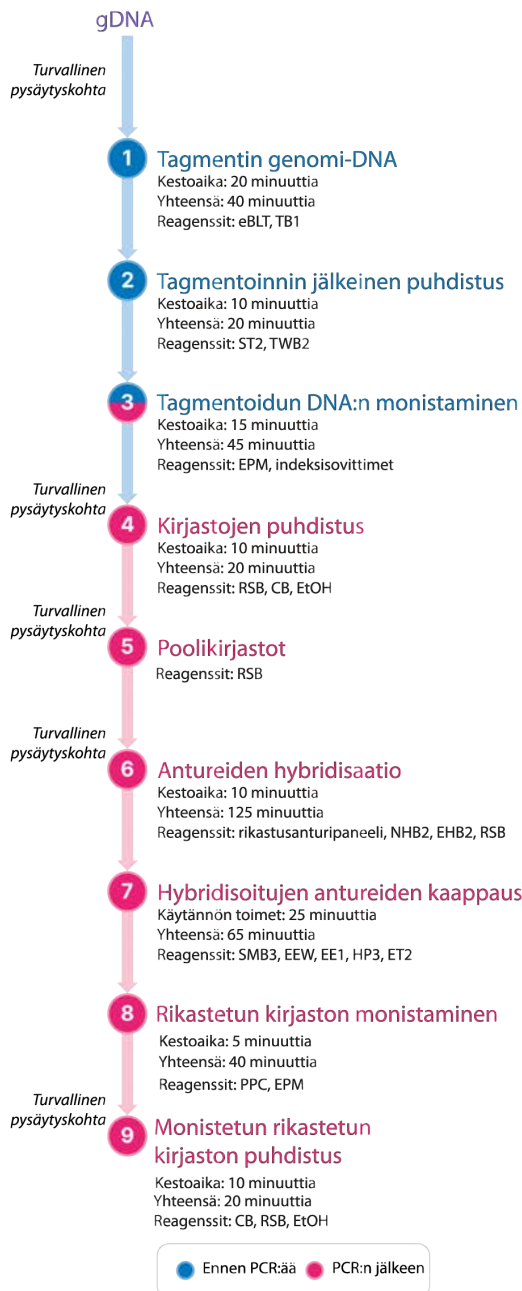
- Sulje 96 kuopan levy aina uudella liimapintaisella sululla käyttäen kumitulppaa levyn peittämiseen ennen protokollan seuraavia vaiheita:
 - Ravisteluvaiheet
 - Inkubointivaiheet. Mikäli levyä ei suljeta asianmukaisesti, se saattaa johtaa haihtumiseen inkuboinnin aikana.
 - Sentrifugointivaiheet
 - Hybridisaatiovaiheet
- Varmista, että reunat ja kuopat on suljettu täysin ristikontaminaatoriskin ja haihtumisriskin vähentämiseksi.
 - Mikäli sulussa tai levyn kuoppien sivuilla havaitaan nestettä tai kondensaatiota, sentrifugoi tarpeen mukaan ennen avaamista.
- Aseta levy tasaiselle pinnalle, ennen kuin poistat peittimen hitaasti.

Enrichment BLT Small (eBLTS) -valmisteen käsittely

- Säilytä eBLTS-varastoputkea pystyasennossa jääkaapissa niin, että rakeet on aina upotettu puskuriiin.
- Vorteksoi eBLTS-varastoputkea perusteellisesti välittömästi ennen käyttöä, kunnes rakeet suspendoiduvat uudelleen. Jotta voidaan välttyä rakeiden uudelleenasetumiselta, sentrifugointia ei suositella ennen pipetointia.
- Jos rakeet kiinnittyvät 96 levyn sivulle tai yläosaan, sentrifugoi 280 × g:ssa 3 sekuntia ja uudelleensuspendoi sen jälkeen pipetoimalla.
- eBLTS:n pesun yhteydessä:
 - Käytä levyille sopivaa magneettista jalustaa.
 - Pidä levy magneettisella jalustalla, kunnes ohjeissa kehoitetaan poistamaan se.
 - Jos rakeet aspiroidaan pipettien kärkiin, annostele ne takaisin magneettisella jalustalla olevalle levyille ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan työkulku

Seuraavassa kaaviossa havainnollistetaan illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan työkulkua. Turvalliset pysähdyskohdat on merkitty vaiheiden väliin. Aika-arviot perustuvat 12 näytteen käsittelyyn 12-pleksisellä rikastuksella.



Käyttöohjeet

Tässä luvussa kuvataan Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -protokolla.

- Tarkista suunniteltu täydellinen sekvensointityönkulku näytteestä analyysiin tuotteiden ja koeparametrien yhteensopivuuden varmistamiseksi.
- Vahvista ennen jatkamista sarjan sisältö ja varmista, että käytössä on tarvittavat komponentit, laitteet ja materiaalit.
 - Kolmannen tahon biotinyloitujen anturien on vastattava erityisiä vaatimuksia. Katso kohta [Rikastusanturipaneelin vaatimukset sivulla 9](#) ja varmista, että kolmannen osapuolen anturit täyttävät vaatimukset.
- Noudata protokollia esitettyssä järjestyksessä käyttämällä määritettyjä tilavuuksia ja inkubointiparametreja.
- Ellei turvallista pysähtymispistettä ole määritetty protokollassa, jatka välittömästi seuraavaan vaiheeseen.
- Master-sekoitetta luotaessa ylimitoitus sisältyy ilmoitettuihin tilavuuksiin.
- Varmista, että käytetään levytyypille sopivaa magneettista jalustaa.

Valmistelu poolausta varten

Tätä vaihetta tarvitaan rikastettujen kirjastojen onnistuneen sekvensoinnin varmistamiseen. Kirjastojen poolaus voidaan suorittaa ennen rikastusta ja ennen sekvensointia.

Ennen rikastusta – yksittäiset indeksoidut ja monistetut kirjastot poolataan yhteen valitun anturipaneelin avulla suoritettavaa rikastusta varten. Näin luodaan multipleksoitu rikastettujen kirjastojen pooli. FFPE-näytesyötteen kohdalla käsittely on testattu ja sitä suositellaan ainoastaan 1-pleksisille rikastusreaktioille. Korkealaatuisen gDNA:n kohdalla, 12-pleksinen on testattu, mutta vaihtoehto 2-pleksisestä 11-pleksiseen on mahdollinen.

Ennen sekvensointia – 1-pleksiset rikastetut kirjastot ja/tai rikastetut multipleksikirjastot poolataan yhteen ennen sekvensointia. Sellaisten rikastettujen kirjastojen määrä, jotka voidaan sekvensoida, riippuu sekvensointijärjestelmän kunkin näytteen kohde-readin syvyydestä.

Ainutkertainen kaksoisindeksointi

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjassa käytetään ainutkertaisia kaksoisindeksejä.

- Kaksoisindeksoiduissa kirjastoissa lisätään indeksi 1 (i7) - ja indeksi 2 (i5) -sekvenssit ainutlaatuisesti merkittyjen kirjastojen luomiseksi.
- UP-indekseissä on erilliset toisiinsa liittymättömät indeksisekvenssit i7- ja i5-indeksireadin kohdalla. Indeksit ovat 10 emäksen pituisia.

Kun valitaan monimuotoisilla sekvensseillä varustettuja indeksisovittimia poolattuihin kirjastoihin, voidaan optimoida väritasapaino onnistuneeseen sekvensointiin ja tietoanalyysiin. Pleksisyyspoolit, jotka ovat ≥ 10 -pleksisiä, ovat luonnostaan väritasapainotettuja, jotta voit käyttää mitä tahansa indeksisovitinyhdistelmää.

Sekvensointiajon aikana DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager -moduulissa tarjotaan vaihtoehtoja väritasapainotettuja indeksiyhdistelmiä varten ja ilmoitetaan, jos valituissa indeksiyhdistelmissä ei ole riittävästi monimuotoisuutta.

Tietoa illumina UD -indeksisovitinsekvensseistä ja levyn asetteluista on kohdassa [Liite: illumina UD -indeksisovitinsekvenssit sivulla 58](#).

Tuetut rikastuspleksisyydet

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan reagenssit on määritetty ja testattu 1-pleksisellä ja 12-pleksisellä rikastuspleksisyydellä. Vaikka muut rikastuspleksisyydet ovat mahdollisia, jotkin pleksisyydet edellyttävät ylimääräistä esirikastuskirjaston valmistelua ja rikastusanturipaneelin reagensseja.

Sopivan rikastustuoton aikaansaaminen muun kuin vakiorikastuspleksisyyden kohdalla saattaa edellyttää lisäoptimointia. Optimaalisia tuloksia ei taata.

- **Rikastuspleksisyys** – Esirikastettujen kirjastojen määrä (1–12) poolattuna yhteen rikastusreaktioon rikastusanturipaneeleilla suoritettavaa hybridisaatiota varten. Esimerkiksi 12 esirikastetun kirjaston yhdistäminen johtaa 12-pleksisen rikastuspoolin luontiin.
- **Rikastusreaktio** – Ainutkertaisten rikastusreaktiovalmistelujen määrä esirikastettujen reaktiota kohti poolattujen kirjastojen määrästä riippumatta. Esimerkiksi yksittäisellä rikastusreaktiolla voidaan valmistella 1-pleksinen tai 12-pleksinen rikastuspooli.

Jälkirikastettujen kirjastojen kokonaismäärän laskentaa varten on kerrottava reaktiokohtainen rikastuspleksisyys rikastusreaktioiden määrällä. Esimerkiksi 12-pleksisen rikastuspoolin yksittäinen rikastusreaktio johtaa 12 jälkirikastetun kirjaston pooliin.

Esirikastettuja kirjastoja poolattaessa illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan reagenssit tukevat seuraavia rikastusreaktioita ja pleksisyyttä.

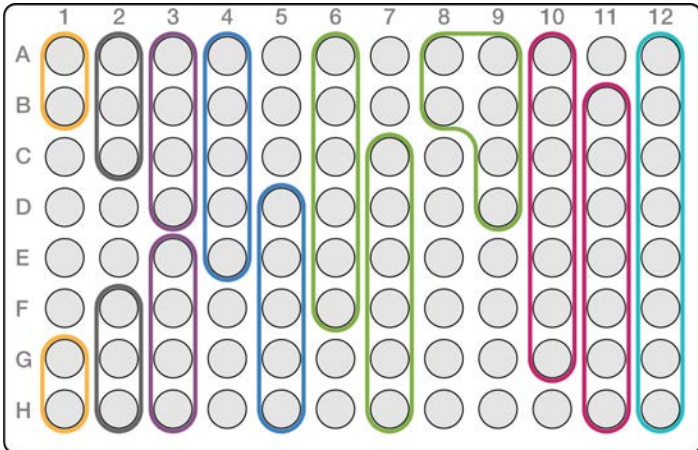
illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan reagenssit	Rikastusreaktiot	Rikastuksen pleksisyys
16 näytteen sarja	16 reaktiota	1-pleksinen
96 näytteen sarja	8 reaktiota	12-pleksinen

Kaksi pleksiä kahdeksan pleksin poolausstrategioiden kautta

Seuraavassa taulukossa esitetään indeksisovittimet (kuopat), jotka voidaan yhdistää 2–8 pleksin poolissa, kun taas kukin yhdistelmä on havainnollistettu värikoodatulla kuvalla.

Poolaa mahdollinen pleksisyys ≥ 2 sarakkeen ylä- tai alaosaan. Älä poolaa rivin poikki.

Pleksisyys	Yhdistelmät	Kuvan väri
2	Sarakkeen kaksi ensimmäistä tai kaksi viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A ja B • G ja H Rivejä C–F ei käytetä.	Oranssi
3	Sarakkeen kolme ensimmäistä tai kolme viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A–C • F–H Rivejä D ja E ei käytetä.	Harmaa
4	Sarakkeen neljä ensimmäistä tai neljä viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A–D • E–H 	Violetti
5	Sarakkeen viisi ensimmäistä tai viisi viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A–E • D–H 	Sininen
6	[Vaihtoehto 1] Sarakkeen kuusi ensimmäistä tai kuusi viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A–F • C–H [Vaihtoehto 2] Yhden sarakkeen kaksi ensimmäistä (A ja B) tai kaksi viimeistä kuoppaa (G ja H) ja mitkä tahansa neljä kuoppaa viereisessä sarakkeessa.	Vihreä
7	Sarakkeen seitsemän ensimmäistä tai seitsemän viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A–G • B–H 	Vaaleanpunainen
8	Koko sarake.	Sinivihreä

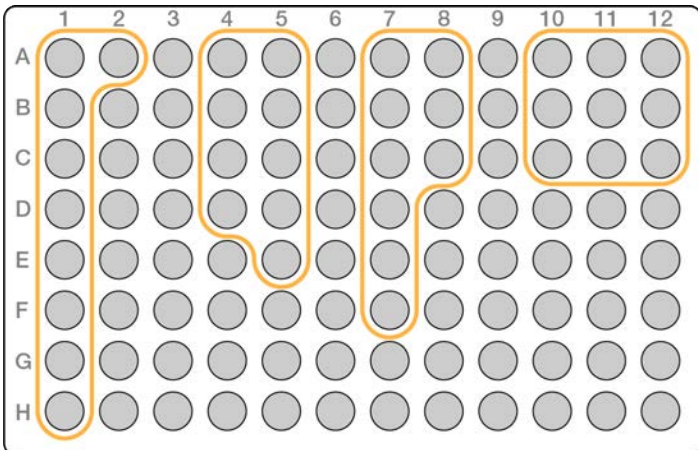


Yhdeksän pleksin poolausstrategiat

Käytä indeksisovittimia mistä tahansa kuopista, jotka optimoivat sekvensointiajon väritasapainon, esimerkiksi:

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

Seuraavassa kuvassa esitetään kaikki neljä esimerkkiä.



Tagmentin genomi-DNA

Tässä vaiheessa käytössä on Enrichment BLT Small (eBLTS) DNA:n tagmentointiin. Se on prosessi, jossa DNA fragmentoidaan ja merkitään sovitinsekvenssitunnisteilla.

Tarvikkeet

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (keltainen korkki)

- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nukleaasiton vesi
- 96 kuopan PCR-levy
- Liimapintainen sulku
- 1,7 ml:n mikrosentrifugiputket
- 8 putken rivit
- Pipetin kärjet
 - 200 µl:n monikanavapipetit



HUOMIO

Tämä reagenssarja sisältää mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Saat ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta (KTT) osoitteessa support.illumina.com/sds.html.

Tietoa reagensseista

- eBLTS on säilytettävä 2–8 °C:n lämpötiloissa. Älä käytä eBLTS:ää, jota on säilytetty alle 2 °C:ssa.
- Älä sentrifugoi eBLTS:ää.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Laite	Säilytys	Ohjeet
eBLTS (keltainen korkki)	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita välittömästi ennen käyttöä vorteksoimalla. Älä sentrifugoi pipetoimalla.
TB1	–25...–15 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla.

2. Vorteksoi tai pipetoi DNA ja sitten sentrifugoi lyhyesti.
3. Tallenna seuraava TAG-ohjelma lämpöblokkissa:
 - Valitse esilämmitetyn kannen vaihtoehto ja aseta lämpötilaksi 100 °C
 - Aseta reaktiotilavuudeksi 50 µl
 - 55 °C 5 minuutin ajan
 - Pidä 10 °C:ssa

Toimenpide

1. Lisää 2–30 µl DNA:tä 96 kuopan levyn jokaiseen kuoppaan, jotta kokonaissyötemäärä on 50–1 000 ng.
Jos DNA-tilavuus on < 30 µl, lisää nukleaasitonta vettä DNA-näytteisiin, jotta kokonaistilavuudeksi saadaan 30 µl.
2. Vorteksoi eBLTS:ää perusteellisesti, kunnes rakeet on suspendoitu kokonaan uudelleen.
3. Yhdistä seuraavat tilavuudet putkessa tagmentoinnin Master-sekoitteen valmistelua varten. Kerro kukin tilavuus käsiteltävien näytteiden määrällä.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Reagenssin ylimitoitus sisältyy tilavuuteen.
4. Sekoita tagmentoinnin Master-sekoite perusteellisesti sekoittamalla.
5. Jaa tagmentoinnin Master-sekoitteen tilavuus tasaisesti 8 putken riville.
6. Siirrä 200 µl:n monikanavapipetillä 20 µl tagmentoinnin Master-sekoitetta näytteen sisältävän PCR-levyn kuhunkin kuoppaan. Käytä kuhunkin näytesarakkeeseen tai -riviin uusia kärkiä.
7. Hävitä 8 putken rivi tagmentoinnin Master-sekoitteen annostelun jälkeen.
8. Sekoita pipetoimalla 40 µl:aan asetetulla 200 µl:n monikanavapipetillä jokaista näytettä 10 kertaa. Käytä kuhunkin näytesarakkeeseen uusia kärkiä.
Sulje vaihtoehtoisesti PCR-levy ja ravista levyravistimella nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
9. Sulje levy ja aseta se sitten esiohjelmoituun lämpöblokkiin ja aja TAG-ohjelma.
10. Odota, kunnes TAG-ohjelma on saavuttanut 10 °C:n pitolämpötilan, ja poista sitten levy välittömästi.
11. Anna 96-kuoppaisen PCR-levyn seistä huoneenlämmössä 2 minuuttia ja siirry sitten seuraavaan vaiheeseen.

Tagmentoinnin jälkeinen puhdistus

Tässä vaiheessa sovitintunnisteella varustettu DNA pestään eBLTS:ssä ennen PCR:n monistusta.

Tarvikkeet

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96 kuopan PCR-levyn magneettinen jalusta
- Liimapintainen sulku
- 8 putken rivit
- Pipetin kärjet
 - 20 µl:n monikanavapipetit

- 200 µl:n monikanavapipetit
- Valmistele myöhempää toimenpidettä varten:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Indeksisovitinlevy

Tietoa reagensseista

- Varmista, että käytetään levyille sopivaa magneettista jalustaa. MIDI-levyn magneettisen jalustan käyttö PCR-levyn kanssa saattaa estää TWB2:n kiinnittymisen rakeisiin.
- Pipetoi TWB2 hitaasti vaahtoamisen minimoimiseksi, jotta voidaan välttää virheellinen tilavuuden aspirointi ja epätäydellinen sekoittuminen.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Laite	Säilytys	Ohjeet
EPM	-25...-15 °C	Sulata jäissä 1 tunti. Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi lyhyesti.
ST2	15-30 °C	Jos havaitaan saostumia, lämmitä 37 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia ja vorteksoi sitten, kunnes saostumat ovat liuenneet. Käytä huoneenlämpötilassa.
TWB2	15-30 °C	Käytä huoneenlämpötilassa.
Indeksisovitinlevy	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.

Toimenpide

1. Lisää 10 µl ST2:ta jokaiseen tagmentointireaktioon. Jos käytetään monikanavapipettiä, pipetoi ST2 8 putken riville ja siirrä sitten asianmukaiset tilavuudet PCR-levylle. Käytä kuhunkin näytesarakkeeseen tai -riviin uusia kärkiä.
2. Pipetoi 50 µl:aan asetetulla 200 µl:n pipetillä hitaasti jokainen kuoppa 10 kertaa rakeiden uudelleensuspendoimiseksi.
Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan. Toista tarpeen mukaan.
3. Sulje levy ja sentrifugoi sitten 280 × g:ssa 10 sekuntia.
4. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
5. Aseta PCR-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (3 minuuttia).
6. [≤ 48 näytettä] Pese kolme kertaa seuraavasti.
 - a. Poista ja hävitä 60 µl:aan asetetulla 200 µl:n monikanavapipetillä supernatantti raapellettiä häiritsemättä.

- b. Poista magneettijalustalta.
 - c. Lisää välittömästi tämän jälkeen hitaasti 100 µl TWB2:ta suoraan rakeille.
 - d. Pipetoi hitaasti, kunnes rakeet on suspendoitu kokonaan uudelleen. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
 - e. Mikäli ilmenee roiskumista, pyöritä alas 280 × g:ssa 10 sekuntia.
 - f. Aseta PCR-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (3 minuuttia). Jätä levy magneettiselle jalustalle ja TWB2 kuoppiin liiallisen kuivumisen estämiseksi kolmatta pesua suoritettaessa. Poista ja hävitä supernatantti PCR Master -sekoitteen valmistelun jälkeen.
 - g. Poista ja hävitä 100 µl:aan asetetulla 200 µl:n monikanavapipetillä supernatantti.
 - h. Toista vaiheet c–f kaksi kertaa, jotta suoritetaan yhteensä kolme pesua.
7. [> 48 näytettä] Pese kolme kertaa seuraavasti.
- a. Suorita vaiheet b ja c 1 sarakkeen tai 2 sarakkeen lisäyksin, kunnes kaikki sarakkeet on käsitelty liiallisen kuivumisen estämiseksi.
 - b. Poista ja hävitä 60 µl:aan asetetulla 200 µl:n monikanavapipetillä supernatantti.
 - c. Poista magneettijalustalta.
 - d. Annostele välittömästi tämän jälkeen hitaasti 100 µl TWB2:ta suoraan rakeille.
 - e. Pipetoi hitaasti, kunnes rakeet on suspendoitu kokonaan uudelleen. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
 - f. Mikäli ilmenee roiskumista, pyöritä alas 280 × g:ssa 10 sekuntia.
 - g. Aseta PCR-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (3 minuuttia). Jätä levy magneettiselle jalustalle ja TWB2 kuoppiin liiallisen kuivumisen estämiseksi kolmatta pesua suoritettaessa. Poista ja hävitä supernatantti PCR Master -sekoitteen valmistelun jälkeen.
 - h. Poista ja hävitä 100 µl:aan asetetulla 200 µl:n monikanavapipetillä supernatantti.
 - i. Poista magneettiselta jalustalta ja lisää hitaasti 100 µl TWB2:ta suoraan rakeille.
 - j. Toista vaiheet h ja i 1 tai 2 sarakkeen lisäyksin, kunnes kaikki sarakkeet on käsitelty.
 - k. Toista vaiheet e–h kaksi kertaa, jotta suoritetaan yhteensä kolme pesua.
8. Pidä magneettisella jalustalla *Toimenpide-osion Tagmentoidun DNA:n monistaminen* -kohdan vaiheeseen 4 saakka.
TWB2 jää kuoppiin rakeiden liiallisen kuivumisen ehkäisemiseksi.

Tagmentoidun DNA:n monistaminen

Tässä vaiheessa tagmentoitu DNA monistetaan rajoitetun syklin PCR-ohjelmalla. PCR-vaiheessa lisätään indeksin 1 (i7) sovittimet, indeksin 2 (i5) sovittimet sekä sekvenssoinnin klusterin luontiin tarvittavat sekvenssit.

Tarvikkeet

- EPM (Enhanced PCR Mix)

- Indeksisovitinlevy
- 96 kuopan PCR-levy
- Nukleaasiton vesi
- Liimapintainen sulku
- 1,5 ml:n mikrosentrifugiputket
- Pipetin kärjet
 - 20 µl:n monikanavapipetit
 - 200 µl:n monikanavapipetit

Tietoa reagensseista

- Indeksisovitinlevyt
 - Kuoppa saattaa sisältää > 10 µl indeksisovittimia.
 - Älä lisää näytteitä indeksisovitinlevylle.
 - Kaikki indeksilevyn kuopat ovat kertakäyttöisiä.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Laite	Säilytys	Ohjeet
EPM	-25...-15 °C	Sulata 4 °C:n lämpötilaan tai säilytä jäissä 1 tunti. Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi lyhyesti.
Indeksisovitinlevy	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.

2. Tallenna seuraava eBLTS PCR -ohjelma lämpöblokkiin käyttämällä alla olevassa taulukossa ilmoitettu asianmukainen PCR-jaksojen määrä.

- Valitse esilämmitetyn kannen vaihtoehto ja aseta lämpötilaksi 100 °C
- Aseta reaktiotilavuudeksi 50 µl
- 72 °C 3 minuutin ajan
- 98 °C 3 minuutin ajan
- X sykliä arvoilla:
 - 98 °C 20 sekunnin ajan
 - 60 °C 30 sekunnin ajan
 - 72 °C 1 minuutin ajan
- 72 °C 3 minuutin ajan
- Pidä 10 °C:ssa

Kokonaisajoaika on ~38 minuuttia 9 syklin kohdalla ja ~46 minuuttia 12 syklin kohdalla.

Näytteen syötetyyppi	PCR-syklien määrä (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1 000 ng gDNA	9
50–1 000 ng gDNA:ta FFPE:stä eristettynä	12
gDNA verestä eristettynä	9

Toimenpide

- Yhdistä seuraavat PCR Master -sekoitteen valmistelemiseksi. Kerro kukin tilavuus käsiteltävien näytteiden määrällä.
 - EPM (23 µl)
 - Nukleasiton vesi (23 µl)
 Reagenssin ylimeritys sisältyy tilavuuteen.
- Sekoita PCR Master -sekoite pipetoimalla 10 kertaa ja sentrifugoi sen jälkeen lyhyen aikaa.
- Kun levy on magneettijalustalla, poista ja hävitä TWB2 200 µl:n monikanavapipetillä. Kuopan seinille jäävä vaahto ei vaikuta haitallisesti kirjastoon.
- Poista magneettijalustalta.
- Lisää välittömästi 40 µl PCR Master -sekoitetta suoraan kukin kuopan rakeisiin.
- Sekoita välittömästi pipetoimalla, kunnes rakeet on suspendoitu kokonaan uudelleen. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
- Sulje näytelevy ja sentrifugoi 280 × g:ssa 10 sekuntia.
- Sentrifugoi indeksisovitinlevyä arvolla 1 000 × g 1 minuutin ajan.
- Valmistele indeksisovitinlevy.
 - [< 96 näytettä] Puhkaise indeksisovitinlevyn kalvosulku uuden pipetin kärjellä kuoppien kohdalla vain käsiteltävien näytteiden määrän verran.
 - [96 näytettä] Kohdista uusi semiskirted-tyypin PCR-levy indeksisovitinlevyn yläpuolelle ja puhkaise kalvosulku painamalla alas. Hävitä kalvosulun puhkaisemiseen käytetty PCR-levy.
- Lisää uuden pipetin kärjellä 10 µl ennalta pareiksi muodostettua indeksisovitinta kuhunkin kuoppaan.
- Sekoita pipetoimalla 10 kertaa 40 µl:aan asetetulla pipetillä. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
- Sulje levy ja sentrifugoi sitten 280 × g:ssa 10 sekuntia.
- Aseta lämpöblokki päälle ja aja eBLTS PCR -ohjelma.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, säilytä –25...–15 °C:n lämpötilassa enintään 30 vuorokautta.

Kirjastojen puhdistus

Tässä vaiheessa käytetään kaksipuolista rakeiden puhdistustoimenpidettä monistettujen kirjastojen puhdistukseen.

Tarvikkeet

- CB (puhdistusrakeet)
- RSB (uudelleensuspensiopuskuri)
- Vasta valmistettu 80-prosenttinen etanoli (EtOH)
- 96 kuopan 0,8 ml:n polypropeeninen syväkuoppa-säilytyslevy (MIDI-levy)
- 96 kuopan PCR-levy
- MIDI-levyn magneettinen jalusta
- PCR-levyn magneettinen jalusta
- 1,5 ml:n mikrosentrifugiputket
- Nukleaasiton vesi

Tietoa reagensseista

- Puhdistusrakeet
 - Vorteksoi ennen jokaista käyttökertaa.
 - Varmista vorteksoimalla usein, että rakeet ovat jakautuneet tasaisesti.
 - Aspiroi ja annostelee hitaasti liuoksen viskositeetin vuoksi.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Laite	Säilytys	Ohjeet
CB	Huoneenlämpötila	Sekoita vorteksoimalla ja kääntämällä, kunnes nesteen väri on tasainen.
RSB	2–8 °C	Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia. Sekoita vorteksoimalla.

Toimenpide

1. Ravista 96 kuopan PCR-levyä nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan ja sentrifugoi sen jälkeen lyhyesti.
2. Aseta PCR-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (1 minuutti).
3. Vorteksoi CB 3 kertaa 10 sekunnin ajan ja käännä sitten useita kertoja, jotta uudelleensuspensiointi toteutuu.
4. Saat korkealaatuista gDNA:ta toimimalla seuraavasti.
 - a. Lisää 77 µl nukleaasitonta vettä uuden MIDI-levyn kaikkiin kuoppiin.

- b. Lisää 88 µl CB:tä MIDI-levyn jokaiseen kuoppaan.
- c. Siirrä 45 µl supernatanttia PCR-levyn jokaisesta kuopasta MIDI-levyn vastaavaan kuoppaan.
- d. Hävitä PCR-levy.
- e. Sekoita pipetoimalla kukin kuoppa 10 kertaa. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
- f. Sulje levy ja inkuboi huoneenlämpötilassa 5 minuuttia.
- g. Tarkista ilmakuplien varalta. Mikäli niitä havaitaan, pyöritä alas.
- h. Laita MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (5 minuuttia).
- i. Vorteksoi CB perusteellisesti inkuboinnin aikana ja lisää sitten 20 µl uuden MIDI-levyn jokaiseen kuoppaan.
- j. Siirrä 200 µl supernatanttia ensimmäisen MIDI-levyn jokaisesta kuopasta uuden (20 µl CB:tä sisältävän) MIDI-levyn vastaaviin kuoppiin.
- k. Hävitä ensimmäinen MIDI-levy.
- l. Sekoita pipetoimalla jokainen uuden MIDI-levyn kuoppa 10 kertaa. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.

MadCap:conditions="Illumina_DNA.Prep_Enrichment,Illumina_DNA.Prep_Enrichment_Dx">

5. Toimi eristetyn FFPE:n kohdalla seuraavasti.
 - a. Lisää 81 µl CB:ta uuden MIDI-levyn jokaiseen kuoppaan.
 - b. Siirrä 45 µl supernatanttia PCR-levyn jokaisesta kuopasta MIDI-levyn vastaavaan kuoppaan.
 - c. Hävitä PCR-levy.
 - d. Sekoita pipetoimalla kukin kuoppa 10 kertaa. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
6. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
7. Tarkista ilmakuplien varalta. Mikäli niitä havaitaan, pyöritä alas.
8. Laita MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (5 minuuttia).
9. Poista ja hävitä supernatantti rakeita häiritsemättä.
10. Pese rakeet seuraavasti.
 - a. Kun levy on magneettisella jalustalla, lisää 200 µl uutta 80-prosenttista EtOH:ta sekoittamatta.
 - b. Inkuboi 30 sekuntia.
 - c. Poista ja hävitä supernatantti rakeita häiritsemättä.
11. Pese rakeet **toisen** kerran.
12. Ilmakuivaa magneettisella jalustalla 5 minuuttia.
13. Käytä ilmakeivauksen aikana 20 µl:n pipettiä EtOH-jäännösmäärien poistamiseen ja hävittämiseen.
14. Poista magneettijalustalta.
15. Lisää 17 µl RSB:tä rakeisiin.
16. Sulje levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.

17. Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.
18. Tarkista ilmakuplien varalta. Mikäli niitä havaitaan, pyöritä alas.
19. Laita levy MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
20. Siirrä 15 µl supernatanttia uudelle 96 kuopan PCR-levylle.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä levy ja aseta se säilytykseen –25...–15 °C:seen enintään 30 vuorokaudeksi.

Esirikastettujen kirjastojen poolaus

Tässä vaiheessa ainutkertaisilla indekseillä varustetut DNA-kirjastot yhdistetään yhdeksi enintään 12 kirjaston pooliksi.

Poolausmenetelmät

Poolaus voidaan suorittaa tilavuuden tai massan mukaan. Määritä seuraavan taulukon avulla syötteesi sopiva menetelmä.

Taulukko 2 Suositellut poolausmenetelmät

Näytesyöte	Poolausmenetelmä
10–49 ng gDNA	Massa
50–1 000 ng gDNA	Tilavuus
FFPE:stä eristetty gDNA	Massa
gDNA verestä eristettynä	Tilavuus

- Yhden pleksin rikastus ei edellytä esirikastettujen kirjastojen poolausta. RSB:n lisäys saattaa kuitenkin olla tarpeen.
- Esirikastetun kirjaston kvantifioinnin jälkeen kaikki näytesyötetyypit voidaan poolata massan mukaan optimaalisen indeksitasapainon aikaansaamiseksi.
- Erillisissä kokeellisissa valmisteluissa luotujen esirikastettujen kirjastojen lopullinen tuotos saattaa vaihdella. Näin ollen poolausta massan mukaan suositellaan optimaalisen indeksitasapainon aikaansaamiseksi.
- Käytä 1-pleksistä rikastusta seuraavissa tilanteissa.
 - 10–49 ng gDNA
 - 50–1 000 ng gDNA:ta FFPE:stä eristettynä
 - Alhainen vähäisen alleelitaajuuden tunnistus somaattisen varianttunnistuksen kohdalla.

Poolaus massan mukaan

Kvantifioi seuraavissa tilanteissa kirjastot käyttämään DNA-massaa kirjastoa kohti sellaista rikastusta varten, joka on määritetty kohdassa [Esirikastettujen kirjastojen poolaus yhtä suuressa pitoisuudessa sivulla 33](#).

- 10–49 ng gDNA:n näytesyöte
- 50–1 000 ng gDNA:ta FFPE-näytesyötteestä eristettynä
- Alhainen vähäisen alleelitaajuuden tunnistus somaattisen varianttintunnistuksen kohdalla
- Verestä eristetty gDNA optimaalisen indeksitasapainon aikaansaamiseksi

Esirikastettujen kirjastojen kvantifiointi

1. Aja 1 µl esirikastettuja kirjastoja valitsemallasi fluoresenssipohjaisella kvantifiointimenetelmällä, jossa käytetään dsDNA:n interkalaatiöväriä.
 - 50–1 000 ng:n korkealaatuisesta gDNA:sta on odotettavissa ≥ 500 ng:n esirikastettu kirjastotuotos.
 - 50–1 000 ng:n FFPE:stä eristettyä gDNA:sta on odotettavissa 500–6 000 ng:n esirikastettu kirjastotuotos alustavan näytteen laadun mukaan.

HUOMAUTUS Kvalifioi tämän työkulun kvantifiointimenetelmä vinoumaltaan erilaisten kvantifiointimenetelmien kohdalla. Pitoisuustulokset saattavat olla erilaisia käytetyn menetelmän mukaan.

Esirikastettujen kirjastojen poolaus yhtä suuressa pitoisuudessa

Määritä seuraavan taulukon avulla rikastukseen tarvittava DNA-massa kirjastoa kohti näytetyypin ja rikastuksen pleksisyyden mukaan. Optimaalisia rikastustuottoja ja määrityksen optimaalista suorituskykyä ei taata käytettäessä suositeltua alhaisempia esirikastettuja kirjastotuotoksia.

Rikastusreaktion DNA-kokonaismassan ei pitäisi ylittää 6 000 ng.

Näytesyöte	Rikastuksen pleksisyys	DNA-massa kirjastoa kohti (ng)	DNA-kokonaiskirjastomassa (ng)
Korkealaatuinen gDNA	12	250–500	3 000–6 000
FFPE:stä eristetty gDNA	1	200	200

1. Tallenna sellaisten kirjastojen indeksit, jotka aiot poolata tässä vaiheessa.
2. Laske kunkin kirjaston pitoisuuden perusteella tilavuus, joka on lisättävä rikastusreaktioon vaadittavan DNA-massan aikaansaamiseksi.
 - Korkealaatuinen gDNA: laske kirjaston tilavuus, joka tarvitaan 250–500 ng:n syötteeseen.
 - FFPE:stä eristetty gDNA: laske kirjaston tilavuus, joka tarvitaan 200 ng:n syötteeseen.
3. Lisää kunkin kirjaston laskettu tilavuus PCR-levyn samaan kuoppaan.
4. Jos käytetään korkealaatuista gDNA:ta, suorita yksi seuraavista toimista poolattujen esirikastettujen kirjastojen kokonaistilavuuden perusteella:

- Jos esirikastetun kirjaston tilavuus = 30 µl, jatka kohtaan [Antureiden hybridisaatio sivulla 35](#).
 - Jos esirikastetun kirjaston tilavuus < 30 µl, lisää RSB, jotta saadaan 30 µl:n kokonaistilavuus.
 - Jos esirikastetun kirjaston tilavuus > 30 µl, voit tiivistää poolatun näytteen raepohjaisella menetelmällä tai tyhjiökeskittimellä. Lisää RSB:tä tiivistettyyn poolattuun näytteeseen, jotta saadaan 30 µl:n kokonaistilavuus.
5. Jos käytetään FFPE:stä eristettyä gDNA:ta, suorita yksi seuraavista toimista poolattujen esirikastettujen kirjastojen kokonaistilavuuden perusteella.
- Jos esirikastetun kirjaston tilavuus = 7,5 µl, siirry kohtaan [Antureiden hybridisaatio sivulla 35](#).
 - Jos esirikastetun kirjaston tilavuus < 7,5 µl, lisää RSB, jotta saadaan 7,5 µl:n kokonaistilavuus.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä levy ja aseta se säilytykseen -25...-15 °C:seen enintään 30 vuorokaudeksi.

Poolaus tilavuuden mukaan

Kun syöte on 50–1 000 ng gDNA, saman kokeen yhteydessä luotujen yksittäisten kirjastojen kvantifiointia ja normalisointia ei tarvita.

Jotta saat aikaan optimaalisen suorituskyvyn, poolaa vain saman käyttäjän valmistelemat, samassa reagenssierässä valmistellut ja samalla indeksisovitinlevyllä valmistellut esirikastetut kirjastonäytteet.

1. Tallenna sellaisten kirjastojen indeksit, jotka aiot poolata tässä vaiheessa.
2. Yhdistä seuraava esirikastettu kirjasto ja rikastuksesi pleksisyyden RSB-tilavuudet uuden PCR-levyn samaan kuoppaan.

Tuloksena saadaan 30 µl:n tilavuus.

Rikastuksen pleksisyys *	Jokaisen esirikastetun kirjaston tilavuus (µl)	RSB-tilavuus (µl)
1-pleksinen	14	16
2-pleksinen	14	2
3-pleksinen	10	0
4-pleksinen	7,5	0
5-pleksinen	6	0
6-pleksinen	5	0
7-pleksinen	4,2	0,6
8-pleksinen	3,7	0,4
9-pleksinen	3,3	0,3
10-pleksinen	3	0
11-pleksinen	2,7	0,3
12-pleksinen	2,5	0

*Lisätietoja ei-standardista pleksiteeteistä (2-pleksinen–11-pleksinen) on kohdassa [Menetelmän rajoitukset sivulla 2](#).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä levy ja aseta se säilytykseen –25...–15 °C:seen enintään 30 vuorokaudeksi.

[Valinnainen] Esirikastettujen kirjastojen kvalifointi

Jos poolaus suoritetaan tilavuuden mukaan, esirikastettujen kirjastojen kvantifointiin käytetään fluorometriapohjaista menetelmää, jossa käytetään dsDNA:n interkalaatioväriä. Voit kvalifioida esirikastettuja kirjastoja käyttämällä DNA:n fragmenttianalysointilaitetta asianmukaisella fragmenttianalyysisarjalla.

Käytä yhteensä 1 µl kirjaston kvalifointiin. Esirikastetut kirjastot ovat riittävän tiivistettyjä, jotta voidaan suorittaa pieniä laimennuksia kvantifointiin tai fragmenttianalyysiin.

Antureiden hybridisaatio

Tämä vaihe sitoo DNA:n kohdealueet tartunta-antureilla.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjan reagenssit ovat yhteensopivia sekä Illuminan että kolmansien tahojen DNA-rikastusoligonukleotidipaneelien kanssa. Tietoa kolmansien tahojen paneeleilta edellytettävistä teknisistä tiedoista on kohdassa [Rikastusanturipaneelin vaatimukset sivulla 9](#).

Tarvikkeet

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT -estäjät) (sininen korkki)
- Rikastusanturipaneeli
- 96 kuopan PCR-levy
- Liimapintainen sulku
- Valmistele myöhempää toimenpidettä varten:
 - SMB3 (streptavidiini-magneettirakeet)
 - EEW (parannettu rikastettu pesupuskuri) (kullankeltainen korkki)

Tietoa reagensseista

- NHB2 saostuu ja erottuu säilytyksen aikana.
- Rikastusanturin paneelissa viitataan valittuun rikastusoligonukleotidipaneeliin, jonka myyjä on Illumina.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Laite	Säilytys	Ohjeet
EHB2	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla. Jos havaitaan kristalleja ja sameutta, toista vorteksointi tai sekoita pipetoimalla ylös ja alas, kunnes liuos on kirkasta.
Rikastusanturipaneeli	–25...–15 °C (illumina)	Tuo sekä illumina että kolmansien tahojen paneelit huoneenlämpötilaan. Sekoita vorteksoimalla.
NHB2 (sininen korkki)	–25...–15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Esilämmitä huoneenlämpötilassa mikronäytteen inkubaattori 5 minuutiksi samaan lämpötilaan käyttämäsi anturin kanssa. Suspendoi uudelleen vorteksoimalla maksiminopeudella 3 kertaa 10 sekunnin ajan. Sentrifugoi lyhyesti. Pipetoi ylös ja alas putken pohjalta. Jos havaitaan kristalleja ja sameutta, toista vorteksointi tai sekoita pipetoimalla ylös ja alas, kunnes liuos on kirkasta. Käytä lämpimänä saostumien uudelleenmuodostumisen ehkäisemiseksi.
SMB3*	2–8 °C	Jos siirryt seuraavaan toimenpiteeseen välittömästi HYB-ohjelman 90 minuutin pidon jälkeen, tuo huoneenlämpötilaan vähintään 2 tuntia ennen HYB-ohjelman käynnistämistä.
EEW * (kullanruskea putki)	–25...–15 °C	Jos siirryt seuraavaan toimenpiteeseen välittömästi HYB-ohjelman 90 minuutin pidon jälkeen, tuo huoneenlämpötilaan vähintään 2 tuntia ennen HYB-ohjelman käynnistämistä. Esilämmitä huoneenlämpötilassa mikronäytteen inkubaattorissa sovellettavaan hybridisaatioon ja kaappaa lämpötila 30 minuuttia ennen HYB-ohjelman päättymistä.

*Jos pysähdyt ennen seuraavaa toimenpidettä, viivytä tämän reagenssin valmistelua, kunnes saavutaan kyseisen toimenpiteen kohdalle.

2. Tallenna seuraava HYB-ohjelma lämpöblokkiin käyttämällä asianmukaista syklimäärää, jonka esittää [Taulukko 3](#).

- Valitse esilämmitetyn kannen vaihtoehto ja aseta lämpötilaksi 100 °C
- Reaktiutilavuuden asettaminen
 - [Korkealaatuinen gDNA] 100 µl
 - [FFPE:stä eristetty gDNA] 25 µl
- 98 °C 5 minuutin ajan
- X kappaletta 1 minuutin syklejä alkaen 98 °C:stä ensimmäisen syklin kohdalla ja laskien lämpötilaa 2 °C sykliä kohti
- Pidä 90 minuuttia sovellettavassa lämpötilassa:
 - [FFPE:stä eristetty gDNA] 58 °C
 - [80 meerin anturipaneelit] 58 °C
 - [Somaattinen varianttitunnistus] 58 °C
 - [Kaikki muut] 62 °C

Kokonaisajoaika on ~115 minuuttia.

Taulukko 3 Syklien määrä näytettä tai paneelia kohti

Näyte- ja paneelityyppi	Syklien määrä (X)
FFPE:stä eristetty gDNA (paneelityypistä riippumatta)	20
80 meerin anturipaneelit (paneelityypistä riippumatta)	20
Somaattinen varianttitunnistus	20
Kaiki muut näytteet ja paneelit	18

Toimenpide

1. [Korkealaatuinen gDNA] Lisää seuraavat reagenssit *luetellussa järjestyksessä* kuhunkin poolattuun kirjastoon PCR-levyllä.
Älä luo Master-sekoitetta. NHB2- ja EHB2-Master-sekoitteen luominen vaikuttaa kielteisesti rikastuksen suorituskykyyn.
 - NHB2 (sininen korkki) (50 µl)
 - Rikastusanturipaneeli (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. [Korkealaatuinen gDNA] Sekoita pipetoimalla 90 µl:aan asetetulla pipetillä kaikki kuopat 10 times kertaa.
3. [FFPE:stä eristetty gDNA] Lisää seuraavat reagenssit *luetellussa järjestyksessä* kuhunkin poolattuun kirjastoon PCR-levyllä.
Älä luo Master-sekoitetta. NHB2- ja EHB2-Master-sekoitteen luominen vaikuttaa kielteisesti rikastuksen suorituskykyyn.

- NHB2 (sininen korkki) (12,5 µl)
 - Rikastusanturipaneeli (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. [FFPE:stä eristetty gDNA] Sekoita pipetoimalla 20 µl:aan asetetulla pipetillä kaikki kuopat 10 kertaa.
 5. Sulje levy ja sentrifugoi 280 × g:ssa 10 sekuntia.
 6. Aseta näytelevy esiohjelmoidun lämpöblokin päälle ja aja HYB-ohjelma.
 7. Siirry välittömästi seuraavaan toimenpiteeseen, kun HYB-ohjelman lämpötilan pitoaika päättyy.

**HUOMIO**

Saostumia muodostuu, jos hybridisaatioreaktion lämpötila jää huoneenlämpötilan alapuolelle.

Hybridisoitujen antureiden kaappaus

Tässä vaiheessa käytetään Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) -magneettirakeita kohdealueille hybridisoitujen antureiden kaappaukseen.

Tarvikkeet

- EEW (parannettu rikastettu pesupuskuri) (kullankeltainen korkki)
- EE1 (rikastuseluointipuskuri 1)
- ET2 (eluointikohdepuskuri 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (streptavidiini-magneettirakeet)
- 1,5 ml:n mikrosentrifugiputki
- 96 kuopan MIDI-levy
- 96 kuopan PCR-levy
- Liimapintainen sulku
- MIDI-levyn magneettinen jalusta
- Valmistele myöhempää toimenpidettä varten:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Tietoa reagensseista

- EEW
 - Varmista, että EEW on sulanut huoneenlämpötilassa vähintään 2 tuntia, ennen kuin se esilämmitetään mikronäytteen inkubaattorissa.

- Varmista, että EEW:tä on lämmitetty mikronäytteen inkubaattorissa 30 minuuttia ennen HYB-ohjelman päättymistä.
- Jätä EEW mikronäytteen inkubaattoriin, kun sitä ei käytetä. EEW:n on pysyttävä lämmitettynä koko protokollan ajan.
- Se saattaa olla sameaa huoneenlämpötilassa.
- Se saattaa olla kellertävää.
- SMB3
 - SMB3:n on oltava huoneenlämpötilassa ennen käyttöä.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet.

Laite	Säilytys	Ohjeet
SMB3	2–8 °C	Anna lämmitä huoneenlämpöiseksi 2 tunnin ajan. Käännä ja vorteksoi sitten, kunnes se on suspendoitu kokonaan uudelleen.
EEW (kullanruskea putki)	–25...–15 °C	Kun inkubointia on suoritettu 2 tuntia huoneenlämpötilassa, esilämmitä mikronäytteen inkubaattori sovellettavaan hybridisaatioon ja kaappaa lämpötila 30 minuuttia ennen HYB-ohjelman päättymistä.
EE1	–25...–15 °C	Sulata huoneenlämmössä ja vorteksoi sen jälkeen.
HP3	–25...–15 °C	Sulata huoneenlämmössä ja vorteksoi sen jälkeen.
ET2	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla.
EPM	–25...–15 °C	Sulata jäissä yksi tunti. Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi lyhyen aikaa. Siirrä syrjään jäihin.
PPC	–25...–15 °C	Sulata jäissä yksi tunti. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Siirrä syrjään jäihin.

2. Esilämmitä yksi mikronäytteen inkubaattori MIDI-lämpölohkon insertillä näytelevyn inkuboimiseksi yhteen seuraavista lämpötiloista. EEW:n esilämmitykseen voidaan käyttää valinnaista toista mikronäytteen inkubaattoria. Aseta EEW MIDI-lämpölohkon insertin päälle.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 meeriä anturipaneeleita kohti] 58 °C
 - [Somaattinen varianttitunnistus] 58 °C
 - [Kaikki muut] 62 °C

Toimenpide

Kaappaus

- Lisää SMB3 uuden MIDI-levyn vastaavaan kuoppaan seuraavasti.
 - [Korkealaatuinen gDNA] Lisää 250 µl SMB3.
 - [FFPE:stä eristetty gDNA] Lisää 62,5 µl SMB3:a.
- Siirrä 100 µl:aan korkealaatuista gDNA:ta varten tai 25 µl:aan FFPE:tä varten jokainen poolattu kirjasto 96 kuopan PCR-levyltä uuden MIDI-levyn vastaavaan kuoppaan.
- Sulje levy ja ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 4 minuutin ajan.
- Mikäli ilmenee roiskumista, sentrifugoi levyä lyhyen aikaa.
- Laita poolattujen kirjastojen levy MIDI-lämpölohkon insertin päälle mikronäytteen inkubaattorille EEW-putken alle, sulje kansi, ja inkuboi sitten 15 minuuttia sovellettavassa lämpötilassa:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 meerin anturipaneeli] 58 °C
 - [Somaattinen varianttitunnistus] 58 °C
 - [Kaikki muut] 62 °C
- Poista poolattujen kirjastojen levy ja sentrifugoi voimalla 280 × g 30 sekunnin ajan.
- Aseta levy välittömästi MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
- [Korkealaatuinen gDNA] Poista ja hävitä 200 µl:aan asetetulla pipetillä supernatantti kokonaan kustakin kuopasta raepellettiä häiritsemättä.
- [FFPE:stä eristetty gDNA] Poista ja hävitä 90 µl:aan asetetulla pipetillä supernatantti kokonaan kustakin kuopasta raepellettiä häiritsemättä.
- Poista ja hävitä supernatanttijäämät kokonaan kustakin kuopasta.

Pesu

- Poista magneettijalustalta.
- [Korkealaatuinen gDNA] Poista EEW nopeasti mikronäytteen inkubaattorista ja lisää 200 µl kuhunkin kuoppaan.
- [FFPE:stä eristetty gDNA] Poista EEW nopeasti mikronäytteen inkubaattorista ja lisää 50 µl kuhunkin kuoppaan.
- Palauta käyttämätön EEW mikronäytteen inkubaattoriin ja pidä se lämmitettynä.
- Sulje ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 4 minuutin ajan.
- Laita näytelevy MIDI-lämpölohkon insertin päälle mikronäytteen inkubaattoriin EEW-putken alle, sulje kansi ja inkuboi sitten 5 minuuttia sovellettavassa lämpötilassa:
 - [FFPE] 58 °C

- [80 meerin anturipaneelit] 58 °C
 - [Somaattinen varianttitunnistus] 58 °C
 - [Kaikki muut paneelit] 62 °C
7. Aseta levy välittömästi MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
 8. Poista ja hävitä pipetillä, joka on asetettu 200 µl:aan korkealaatuista gDNA:ta varten tai 50 µl:aan FFPE:tä varten, supernatantti kokonaan kustakin kuopasta.
 9. Toista vaiheet 1–8 kaksi kertaa, jotta suoritetaan yhteensä kolme pesua.

Pesun siirto

1. Poista magneettijalustalta.
2. **[Korkealaatuinen gDNA]** Poista EEW nopeasti mikronäytteen inkubaattorista ja lisää 200 µl kuhunkin kuoppaan.
3. **[FFPE:stä eristetty gDNA]** Poista EEW nopeasti mikronäytteen inkubaattorista ja lisää 50 µl kuhunkin kuoppaan.
4. Sulje ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 4 minuutin ajan. Jos ilmenee roiskumista, alenna nopeutta 1 600 kierrokseen minuutissa.
5. Slirrä uudelleensuspendoitu raeliuos uudelle MIDI-levylle.
Kuoppiin voi jäädä jonkin verran näytettä.



HUOMIO

Reagenssin siirtäminen vähentää minimiin jäännösreagenssien siirtymisen, joka saattaa estää loppupään PCR:n.

6. Laita näytelevy MIDI-lämpölohkon insertin päälle mikronäytteen inkubaattoriin, sulje kansi ja inkuboi sitten 5 minuuttia sovellettavassa lämpötilassa:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 meerin anturipaneelit] 58 °C
 - [Somaattinen varianttitunnistus] 58 °C
 - [Kaikki muut] 62 °C
7. Aseta levy välittömästi MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
8. Poista ja hävitä pipetillä, joka on asetettu 200 µl:aan korkealaatuista gDNA:ta varten tai 50 µl:aan FFPE:tä varten, supernatantti kokonaan kustakin kuopasta.
9. Sentrifugoi levyä 280 × g:ssa 30 sekuntia.
10. Laita MIDI-levyn magneettiselle jalustalle 10 sekunniksi.
11. Poista ja hävitä 20 µl:n pipetillä jäännösneeste jokaisesta kuopasta.
12. Siirry välittömästi kohtaan [Eluointi sivulla 42](#) rakeiden liiallisen kuivumisen ja kirjaston tuotoksen menetyksen ehkäisemiseksi.

Eluointi

1. Yhdistä seuraavat tilavuudet Elution Master Mix -sekoitteen valmistelemiseksi. Kerro kukin tilavuus käsiteltävien poolattujen kirjastojen määrällä.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Reagenssin ylimääräinen ylimerkitys sisältyy tilavuuteen.
2. Vorteksoi ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
3. Poista MIDI-levy magneettijalustalta.
4. Lisää 23 µl Elution Master Mixiä kuhunkin kuoppaan.
5. Sulje levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
6. Inkuboi levyä huoneenlämpötilassa 2 minuuttia.
7. Sentrifugoi 280 × g:ssa 30 sekuntia.
8. Laita se MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
9. Siirrä 21 µl supernatanttia MIDI-levyltä uuden 96 kuopan PCR-levyn vastaavaan kuoppaan.
10. Hävitä MIDI-levy.
11. Lisää 4 µl ET2:ta jokaiseen kuoppaan, joka sisältää 21 µl supernatanttia.
12. Määritä pipetti 20 µl:aan ja sekoita pipetoimalla hitaasti kutakin kuoppaa 10 kertaa.
13. Sulje levy ja sentrifugoi sitten 280 × g:ssa 10 sekuntia.
14. Inkuboi levyä huoneenlämpötilassa 1 minuutin ajan.

Rikastetun kirjaston monistaminen

Tässä vaiheessa käytetään PCR:ää rikastetun kirjaston monistamiseen.

Tarvikkeet

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail eli PCR-alukeseos)
- Liimapintainen sulku

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Laite	Säilytys	Ohjeet
EPM	-25...-15 °C	Sulata 4 °C:n lämpötilaan tai säilytä jäissä yksi tunti. Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi lyhyen aikaa. Siirrä syrjään jäihin.
PPC	-25...-15 °C	Sulata 4 °C:n lämpötilaan jäissä yksi tunti. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Siirrä syrjään jäihin.

2. Tallenna seuraava AMP-ohjelma lämpöblokkiin käyttämällä seuraavassa taulukossa lueteltu asianmukainen PCR-jaksojen määrä.

- Valitse esilämmitetyn kannen vaihtoehto ja aseta lämpötilaksi 100 °C
- Aseta reaktiutilavuudeksi 50 µl
- 98 °C 45 sekunnin ajan
- (X) sykliä arvoilla:
 - 98 °C 30 sekunnin ajan
 - 60 °C 30 sekunnin ajan
 - 72 °C 30 sekunnin ajan
- 72 °C 5 minuutin ajan
- Pidä 10 °C:ssa

Kokonaisajoaika on ~35 minuuttia.

Näyte- ja paneelityyppi	(X) sykliä
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) korkealaatuiseen gDNA:han	10
Illumina Exome Panel (CEX) FFPE:lle	12
Kaiki muut näytteet ja paneelit	12 ¹²³⁴

¹ Voidaan säätää enintään 15 sykliä pienten kolmannen osapuolen paneelien kohdalla myöhemmän optimoinnin avulla. Jos käytetään FFPE:tä, syklien määräksi voidaan säätää enintään 17.

² Voidaan säätää enintään 17 sykliä sellaisten kolmannen osapuolen paneelien kohdalla, joissa on vain 500 anturia. Jos käytetään FFPE:tä, syklien määräksi voidaan säätää enintään 19.

³ Voidaan säätää enintään 14 sykliä FFPE-näytteiden kohdalla.

⁴ PCR-syklien määrän lisääminen saattaa johtaa suurempaan duplikaatioasteeseen ja pienempiin fragmenttikokoihin FFPE-näytteiden kohdalla.

Toimenpide

1. Lisää 5 µl PPC:tä kuhunkin kuoppaan.

2. Lisää 20 µl EPM:ää kuhunkin kuoppaan.
3. Sulje levy ja ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
4. Sentrifugoi levyä 280 × g:ssa 10 sekuntia.
5. Aseta esiohjelmoidun lämpöblokin päälle ja aja AMP-ohjelma.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, säilytä 2–8 °C:n lämpötilassa enintään kaksi vuorokautta. Jätä vaihtoehtoisesti lämpöblokki päälle enintään 24 tunniksi.

Monistetun rikastetun kirjaston puhdistaminen

Tässä vaiheessa käytetään puhdistusrakeita rikastetun kirjaston puhdistukseen ja ei-toivottujen tuotteiden poistamiseen.

Tarvikkeet

- CB (puhdistusrakeet)
- RSB (uudelleensuspensiopuskuri)
- Vasta valmistettu 80-prosenttinen etanoli (EtOH)
- Liimapintaiset sulut
- 96 kuopan MIDI-levy
- 96 kuopan PCR-levy
- MIDI-levyn magneettinen jalusta

Tietoa reagensseista

- Puhdistusrakeet
 - Vorteksoi ennen jokaista käyttökertaa.
 - Varmista vorteksoimalla usein, että rakeet ovat jakautuneet tasaisesti.
 - Aspiroi ja annostele hitaasti liuoksen viskositeetin vuoksi.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet.

Laite	Säilytys	Ohjeet
CB	Huoneenlämpötila	Sekoita vorteksoimalla ja kääntämällä, kunnes nesteen väri on tasainen.
RSB	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla.

2. Valmista uusi 80-prosenttinen EtOH absoluuttisesta etanolista.

Toimenpide

1. Sentrifugoi PCR-levyä 280 × g:ssä 10 sekuntia.
2. Vorteksoi CB 3 kertaa 10 sekuntia ja käännä se sitten.
3. Lisää 40,5 µl CB:tä jokaiseen kuoppaan uudessa **MIDI:ssä** plate.
4. Siirrä 45 µl PCR-levyn jokaisesta kuopasta MIDI-levyn vastaavaan kuoppaan.
5. Sulje levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
6. Inkuboi MIDI-levyä huoneenlämpötilassa 5 minuuttia.
7. Sentrifugoi 280 × g:ssa 10 sekuntia.
8. Laita se MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (5 minuuttia).
9. Poista ja hävitä 95 µl:aan asetetulla pipetillä supernatantti kokonaan jokaisesta kuopasta.
10. Pese kaksi kertaa seuraavasti.
 - a. Kun levy on magneettisella jalustalla, lisää 200 µl uutta 80-prosenttista EtOH:ta sekoittamatta.
 - b. Inkuboi 30 sekuntia.
 - c. Poista ja hävitä supernatantti rakeita häiritsemättä.
11. Ilmakuivaa magneettisella jalustalla 5 minuuttia.
12. Käytä ilmakuivauksen aikana 20 µl:n pipettiä EtOH-jäännösmäärien poistamiseen ja hävittämiseen kustakin kuopasta.
13. Poista magneettiselta jalustalta ja lisää 32 µl RSB:tä jokaiseen kuoppaan.
14. Sulje levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
15. Inkuboi levyä huoneenlämpötilassa 5 minuuttia.
16. Sentrifugoi 280 × g:ssa 10 sekuntia.
17. Laita se MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
18. Siirrä 30 µl supernatanttia 96 kuopan MIDI-levyltä uuden PCR-levyn vastaavaan kuoppaan.
19. Hävitä MIDI-levy.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä levy ja aseta se säilytykseen -25...-15 °C:seen enintään 7 vuorokaudeksi.

Rikastettujen kirjastojen tarkistaminen

Voit kvantifioida kaksisäikeisen gDNA-syötteen käyttämällä fluoresenssipohjaista menetelmää, jossa käytetään interkalaativäriä. Vältä menetelmiä, joilla mitataan kokonaisnukleiinihappoa, kuten NanoDropia tai muita UV-absorbointimenetelmiä.

1. Aja 1 µl rikastettuja kirjastoja kvantifointimenetelmäsi avulla.

HUOMAUTUS Anturin kokonaismolaarisuus vaikuttaa suhteellisesti rikastuksen jälkeisen kirjaston tuotokseen.

Odota 125–235 bp:n keskimääräistä fragmenttikokoa ja DNA-fragmenttien jakautumista kokoalueella, joka vaihtelee välillä ~200 bp – ~1 000 bp.

Kirjastojen laimennus aloituspitoisuuteen

Tässä vaiheessa kirjastot laimennetaan sekvensointijärjestelmän aloituspitoisuuteen, ja tämä on sarjalaimennuksen ensimmäinen vaihe. Kun laimennus aloituspitoisuuteen on suoritettu, kirjastot ovat valmiita denaturointiin ja lopulliseen latauspitoisuuteen laimennukseen.

Riippumatta käyttämästäsi rikastusanturipaneelista Illumina suosittelee sekvensoinnin kohdalla paired-end-tyyppisen ajon määrittämistä 151 sykliä readia kohti (2 × 151) ja 10 sykliä indeksireadia kohti. Jos haluat vähemmän päällekkäisiä readeja tai vähemmän raakakattavuutta, voit sekvensoida arvoon 2 × 126 tai 2 × 101.

1. Laske kirjaston tai poolattujen kirjastojen molaarisuusarvo seuraavalla kaavalla.

- Käytä kirjaston keskimääräistä kokoa DNA-fragmenttianalysointilaitteella kvalifioitujen kirjastojen kohdalla.
- Käytä kaikkien muiden kvalifiointimenetelmien kohdalla kirjaston keskimääräisenä kokona 350 bp:tä.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times kirjaston\ keskimääräinen\ koko\ (bp)} = molaarisuus\ (nM)$$

Jos kirjaston pitoisuus on esimerkiksi 20 ng/μl ja keskimääräinen koko on 350 bp, tulokseksi saatava molaarisuusarvo on 86,58 nM.

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

2. Laske molaarisuusarvon avulla RSB:n tilavuudet ja kirjasto, jota tarvitaan kirjastojen laimentamiseksi järjestelmän aloituspitoisuuteen.

Sekvenaattorijärjestelmä	Vaadittava kirjaston vähimmäistilavuus (μl)	Aloituspitoisuus (nM)	Lopullinen latauspitoisuus (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) tai 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM on lähtöpitoisuus lopulliselle latauspitoisuudelle 350 pM. Säädä tarvittaessa lopullista latauspitoisuutta seuraavaa taulukkoa käyttäen.

Lopullinen latauspitoisuus (pM)	Poolatun kirjaston pitoisuus (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. Kirjastojen laimennus RSB:llä:

- **Multipleksoiduksi kirjastopooliksi kvantifioidut kirjastot** – Laimenna pooli järjestelmän aloituspitoisuuteen.
- **Yksitellen kvantifioidut kirjastot** – Laimenna jokainen kirjasto järjestelmän aloituspitoisuuteen. Lisää 10 µl kustakin laimennetusta kirjastosta putkeen multipleksoidun kirjastopoolin luomiseksi.

4. Noudata järjestelmäsi denaturointi- ja laimennusohjeita laimennuksen suorittamiseksi lopulliseen latauspitoisuuteen.

- Katso NextSeq 550Dx -järjestelmän osalta [NextSeq 550Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 47](#).
- Katso MiSeqDx -järjestelmän osalta [MiSeqDx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 49](#).
- Katso NextSeq 6000Dx -järjestelmän osalta [NovaSeq 6000Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 50](#).

Lopulliset latauspitoisuudet ovat aloituspiste ja yleinen ohjeistus. Optimoi pitoisuudet työnkulkuasi ja kvantifiointimenetelmää varten myöhempien sekvensointiajojen kohdalla tai virtauskyvetin titrauksella.

NextSeq 550Dx -sekvensoinnin valmistelu

Noudata seuraavia ohjeita kirjastojen denaturointiin ja laimennukseen NextSeq 550Dx -sekvensointijärjestelmällä suoritettavan sekvensoinnin yhteydessä.

Tarvikkeet

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

Valmisteleminen

Valmista *tuore* 0,2 N NaOH:n laimennus sekvensointikirjastojen denaturointia varten. Jotta pienet pipetointivirheet eivät vaikuttaisi lopulliseen NaOH:n pitoisuuteen, valmistetaan tarpeellinen ylimäärä.



HUOMIO

Juuri laimennettu 0,2N NaOH on välttämätön denaturointiprosessille. Virheellinen denaturointi voi vähentää tuottoa.

1. Yhdistä seuraavat määrät mikrosentrifugiputkeen tehdxsesi laimennuksen 1 N NaOH – 0,2 N NaOH:
1. Valmistele seuraavat tarvikkeet.

Laite	Säilytys	Ohjeet
HT1	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Säilytä 2–8 °C:n lämpötilassa, kunnes olet valmis laimentamaan denaturoidut kirjastot.

2. Valmista uusi NaOH-laimennus yhdistämällä seuraavat määrät mikrosentrifugin putkeen:
 - Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)
 Tuloksena on 1 ml 0,2 N NaOH.
3. Sekoita kääntelemällä putkea useita kertoja.
4. Valmista 200 mM Tris-HCl:ää, pH 7,0, yhdistämällä seuraavat määrät mikrosentrifugin putkeen.
 - Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi (800 µl)
 - 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)
 Tuloksena on 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

HUOMAUTUS Pidä putki suljettuna. Käytä uusi laimennus **12 tunnin** kuluessa.

Kirjastojen denaturointi

1. Yhdistä kirjaston seuraavat tilavuudet ja äskettäin laimennettu 0,2 N NaOH mikrosentrifugiputkessa.
 - 10 µl:n kirjasto
 - 10 µl 0,2 N NaOH
2. Vorteksoi lyhyen aikaa ja sentrifugoi sen jälkeen 280 × g:ssä 1 minuutin ajan.
3. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
4. Lisää 10 µl 200 mM Tris-HCl:ää, pH 7.

Laimenna denaturoidut kirjastot 20 pM:iin

1. Lisää 970 µl ennalta jäähdytettyä HT1:tä putkeen, joka sisältää denaturoituja kirjastoja. Tuloksena on 20 pM:n denaturoitu kirjasto.
2. Vorteksoi lyhyen aikaa ja sentrifugoi sen jälkeen 280 × g:ssä 1 minuutin ajan.
3. Laita 20 pM:n kirjastot jäihin, kunnes olevat valmis siirtymään lopulliseen laimennukseen.

Kirjastojen laimennus latauspitoisuuteen

1. Lisäämällä seuraavat tilavuudet voit laimentaa denaturoidun 20 pM:n kirjastoliuoksen 1,2 pM:iin.
 - Denaturoitu kirjastoliuos (78 µl)
 - Ennalta jäähdytetty HT1 (1 222 µl)Kokonaistilavuus on 1,3 ml 1,2 pM:n kohdalla.
2. Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi sykinällä.
3. Siirry sekvensointiin. Katso ohjeet kohdasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.

MiSeqDx-sekvensoinnin valmistelu

Noudata seuraavia ohjeita kirjastojen denaturointiin ja laimennukseen MiSeqDx-sekvensointijärjestelmällä suoritettavan sekvensoinnin yhteydessä.

Tarvikkeet

- HT1 (hybridisaatiopuskuri)
- 1N NaOH

Valmisteleminen

Valmista *tuore* 0,2 N NaOH:n laimennus sekvensointikirjastojen denaturointia varten. Jotta pienet pipetointivirheet eivät vaikuttaisi lopulliseen NaOH:n pitoisuuteen, valmistetaan tarpeellinen ylimäärä.



HUOMIO

Juuri laimennettu 0,2N NaOH on välttämätön denaturointiprosessille. Virheellinen denaturointi voi vähentää tuottoa.

1. Yhdistä seuraavat määrät mikrosentrifugiputkeen tehdäksesi laimennuksen 1 N NaOH – 0,2 N NaOH:
1. Valmistele seuraavat tarvikkeet.

Laite	Säilytys	Ohjeet
HT1	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Säilytä 2–8 °C:n lämpötilassa, kunnes olet valmis laimentamaan denaturoidut kirjastot.

- Valmista uusi NaOH-laimennus yhdistämällä seuraavat määrät mikrosentrifugin putkeen:
 - Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)

Tuloksena on 1 ml 0,2 N NaOH.

HUOMAUTUS Pidä putki suljettuna. Käytä uusi laimennus **12 tunnin** kuluessa.

Denaturoi 4 nM:n kirjasto

- Yhdistä seuraavat tilavuudet mikrosentrifugiputkessa.
 - 4 nM:n kirjasto (5 µl)
 - 0,2N NaOH (5 µl)
- Vorteksoi lyhyen aikaa ja sentrifugoi sen jälkeen 280 × g:ssä 1 minuutin ajan.
- Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
- Lisää 990 µl ennalta jäädytettyä HT1:tä putkeen, joka sisältää denaturoidun kirjaston. Tuloksena on 1 ml:n 20 pM denaturoitu kirjasto.

Laimenna denaturoitu 20 pM:n kirjasto

- Laimenna haluttuun pitoisuuteen seuraavien tilavuuksien avulla.

Pitoisuus	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM:n kirjasto	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Ennalta jäädytetty HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi sykinällä.
- Siirry sekvensointiin. Katso ohjeet *MiSeqDx-laitteen viiteoppaasta MOS v4:lle (asiakirjanro 1000000157953)*.

NovaSeq 6000Dx -sekvensoinnin valmistelu

Noudata seuraavia ohjeita kirjastojen denaturointiin ja laimennukseen NovaSeq 6000Dx -sekvensointijärjestelmällä suoritettavan sekvensoinnin yhteydessä.

Tarvikkeet

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (uudelleensuspensiopuskuri)
- 1N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- NovaSeq 6000Dx -kirjastoputki

Valmisteleminen

Valmista *tuore* 0,2 N NaOH:n laimennus sekvensointikirjastojen denaturointia varten. Jotta pienet pipetointivirheet eivät vaikuttaisi lopulliseen NaOH:n pitoisuuteen, valmistetaan tarpeellinen ylimäärä.



HUOMIO

Juuri laimennettu 0,2N NaOH on välttämätön denaturointiprosessille. Virheellinen denaturointi voi vähentää tuottoa.

1. Yhdistä seuraavat määrät mikrosentrifugiputkeen tehdäkseen laimennuksen 1 N NaOH – 0,2 N NaOH:

Taulukko 4 S2-tila

Reagenssi	Tilavuus yhdelle virtauskyvetille (µl)	Tilavuus kahdelle virtauskyvetille (µl)
Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi	40	80
Vakiolaadun 1N NaOH	10	20

Nämä tilavuudet johtavat 50 µl:aan 0,2N NaOH:ta yhdelle virtauskyvetille tai 100 µl:aan 0,2N NaOH:ta kahdelle virtauskyvetille.

Taulukko 5 S4-tila

Reagenssi	Tilavuus yhdelle virtauskyvetille (µl)	Tilavuus kahdelle virtauskyvetille (µl)
Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi	80	160
Vakiolaadun 1N NaOH	20	40

Nämä tilavuudet johtavat 100 µl:aan 0,2N NaOH:ta yhdelle virtauskyvetille tai 200 µl:aan 0,2N NaOH:ta kahdelle virtauskyvetille.

2. Sekoita kääntämällä useita kertoja tai vorteksoi huolellisesti.

HUOMAUTUS Pidä putki suljettuna. Käytä uusi laimennus **12 tunnin** kuluessa.

Normalisoidun kirjastopoolin luominen

Latauspitoisuus voi vaihdella kirjaston valmistelu-, kvantifiointi- ja normalisointimenetelmien mukaan.

Seuraavien ohjeiden avulla voit normalisoida kirjastot sopivaan pitoisuuteen ja sitten suorittaa poolauksen. Samaa virtauskyvettiin sekvensoidut kirjastot on yhdistettävä yhdeksi normalisoiduksi pooliksi.

HUOMAUTUS Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarjalla suoritettavien näytteiden enimmäismäärä kaistaa kohden on 192. Tämä rajoitus aiheutuu UD-indeksien kokonaismäärästä sarjassa A ja B.

Kirjastojen normalisointi poolausta varten

- Määritä tarvittava poolattu kirjastopitoisuus halutun lopullisen kuormauspitoisuuden perusteella.
 - Kun haluttu lopullinen latauspitoisuus on 350 pM, vaadittu poolatun kirjaston pitoisuus on 1,75 nM.
 - Kun haluat määrittää poolatun kirjaston pitoisuuden eri lopulliselle latauspitoisuudelle, katso [Kirjastojen laimennus aloituspitoisuuteen sivulla 46](#).
- Normalisoi kirjastot haluttuun poolatun kirjaston pitoisuuteen käyttäen 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Jos tarvitset ohjeita kirjastojen laimentamisessa sopivaan pitoisuuteen, katso Illumina-verkkosivuston [Poolauslaskin](#).

Suosittelut latauspitoisuudet

Optimaalinen DNA-latauspitoisuus riippuu kirjastotyypistä ja insertin koosta. Kun kirjaston koko > 450 bp, voi olla tarpeen lisätä latauspitoisuuksia.

Poolaa normalisoidut kirjastot ja lisää valinnainen PhiX-kontrolli

- Yhdistä kunkin normalisoidun kirjaston asianmukainen tilavuus uuteen mikrosentrifugiputkeen, jotta saat jonkin seuraavista lopullisista tilavuuksista:

Tila	Lopullinen tilavuus (µl)
S2	150
S4	310

- [Valinnainen]** Spaikkaa 1 % denaturoimatonta PhiX:ää seuraavasti.
 - Laimenna 10 nM PhiX arvoon 2,5 nM käyttäen 10 mM Tris-HCl, pH-arvo 8,5.
 - Lisää asianmukainen määrä denaturoimatonta 2,5 nM PhiX:ää denaturoimattoman kirjastopoolin putkeen.

Tila	Denaturoimaton 2,5 nM PhiX (µl)	Denaturoimaton kirjastopooli (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

PhiX-spaikkauksen yhteydessä 1 % on suositeltava määrä tasapainoisten kirjastojen saavuttamiseksi. Pienen diversiteetin kirjastot voivat vaatia enemmän. Kun haluat käyttää PhiX-kontrollia, jossa on pienen diversiteetin kirjastoja, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen saadaksesi ohjeita.

Kirjastopoolin denaturointi ja valinnainen PhiX-kontrolli

1. Lisää 0,2 N NaOH:ta denaturoimattoman kirjastopoolin putkeen ja valinnaisen PhiX:n putkeen seuraavasti:

Virtauskyvetti	0,2 N NaOH	Denaturoimaton kirjastopooli (µl)	Tuloksena oleva tilavuus
S2	37	150	187 µl tai 187,9 µl PhiX:llä
S4	77	310	387 µl tai 388,9 µl PhiX:llä

2. Sulje korkilla ja vorteksoi sitten lyhyesti.
 3. Sentrifugoi 280 × g:ssä enintään minuutin ajan.
 4. Denaturoi inkuboimalla huoneenlämmössä 8 minuuttia.
 5. Neutraloi lisäämällä 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 seuraavasti:

Tila	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Tuloksena oleva tilavuus
S2	38	225 µl tai 225,9 µl PhiX:llä
S4	78	465 µl tai 466,9 µl PhiX:llä

6. Sulje korkilla ja vorteksoi sitten lyhyesti.
 7. Sentrifugoi 280 × g:ssä enintään minuutin ajan.
 8. Siirrä denaturoidun kirjaston tai denaturoidun kirjaston ja PhiX:n koko määrä NovaSeq 6000Dx -kirjastoputkeen.
 9. Siirry sekvensointiin. Katso ohjeet *NovaSeq 6000Dx -laitteen tuotedokumentaatiosta (asiakirjanro 200010105)*.

Vianmääritys

Seuraavan taulukon avulla voit tehdä työnkulun ongelmien vianmäärityksen. Jos näytteen sekvensointiajo tai kirjaston valmistelu epäonnistuu kaksi kertaa, vianmäärityksen lisätoimet saattavat olla tarpeen. Ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
Sekvensointiajo ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita.	Käyttäjän tai laboratoriolaitteiden virhe määrityksen työnkulussa	<p>Kvalifioi rikastetut kirjastot varmistaaksesi asianmukainen kirjaston tuotos ja fragmenttikokojakauma. Toista kirjaston valmistelu jostakin seuraavista vaiheista riippuen siitä, missä epäily käyttövirhe tai laitevirhe tapahtui. Jos tuntematon virhe tai muita virheitä tapahtui, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen, jotta voidaan tehdä ajon vianmääritys.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sekvensoi kirjastot uudelleen. Katso NextSeq 550Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 47, MiSeqDx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 49 tai NovaSeq 6000Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 50. • Rikasta kirjastot uudelleen. Katso Antireiden hybridisaatio sivulla 35. • Aloita kirjaston valmistelu työnkulun alusta. Katso Käyttöohjeet sivulla 20.
	Laiteongelma	Ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.
FASTQ-luontiin liittyvä virhe tai yleisen sekvensointijärjestelmän virhe (esim. verkkovirhe, virheet reagenssien latauksessa/purkamisessa jne.)	Ohjelmisto- tai laiteongelma	<p>Katso <i>Local Run Manager -ohjelmisto-oppaasta</i> (asiakirjanumero 100000002702) ohjeita FASTQ-generointiin tai katso <i>NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas</i> (asiakirjanumero 1000000009513), <i>MiSeqDx -laitteen viiteopas MOS v4:lle</i> (asiakirjanumero 1000000157953) tai <i>NovaSeq 6000Dx -laitteen tuotedokumentaatio</i> (asiakirjanumero 200010105).</p> <p>Saat apua ottamalla yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.</p>

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpide
DNA-kirjastosta ei saada riittävästi tuotosta sekvensoinnin lataukseen	Näytteen syöttöä koskevat vaatimukset eivät täytyneet	Varmista asianmukainen näytesyöte ja toista kirjaston valmistelu. Katso Näytesyötettä koskevat suositukset sivulla 17 .
	Käyttö- tai laitevirhe määrityksen työnkulussa	Toista kirjaston valmistelu jostakin seuraavista vaiheista riippuen siitä, missä epäilty käyttövirhe tai laitevirhe tapahtui. Jos tuntematon virhe tai muita virheitä tapahtui, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen, jotta voidaan tehdä ajon vianmääritys. <ul style="list-style-type: none"> • Sekvensoi kirjastot uudelleen. Katso NextSeq 550Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 47, MiSeqDx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 49 tai NovaSeq 6000Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 50. • Rikasta kirjastot uudelleen. Katso Antareiden hybridisaatio sivulla 35. • Aloita kirjaston valmistelu työnkulun alusta. Katso Käyttöohjeet sivulla 20.
	Rikastusanturipaneelia koskevia vaatimuksia ei noudatettu	Varmista, että käytössä on asianmukainen rikastusanturipaneeli ja toista kirjaston valmistelu. Katso Rikastusanturipaneelin vaatimukset sivulla 9 .

Suorituskykyominaisuudet

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen suorituskykyominaisuudet NovaSeq 6000Dx:lle on esitetty [NovaSeq 6000Dx -laitteen pakkauselosteessa \(asiakirjanumero 200025276\)](#).

Suorituskyky kokonaisilla eksomipaneeleilla

Eksomipaneelin suorituskykyä testattiin käyttämällä alhaisinta (50 ng) ja korkeinta (1 000 ng) suositeltua Coriell Cell Line gDNA NA12878:n syötettä ituratavariantin tunnistuksen tunnetulla totuusjoukolla (Coriell-platinagenomi). Eksomipaneelia 1 (45 Mt) ja eksomipaneelia 2 (36,8 Mt) käytettiin edustavina paneeleina. Testattiin 24 teknistä replikaattia Illumina DNA Prep -valmisteen kautta Enrichment Dx -määrityksellä käyttäen eksomipaneelia 1 (45 Mt) kahdessa 12-pleksi-rikastusreaktiossa. Testattiin 12 teknistä replikaattia Illumina DNA Prep -valmisteen kautta Enrichment Dx -määrityksellä käyttäen eksomipaneelia 2 (36,8 Mt) yhdessä 12-pleksi-rikastusreaktiossa. Rikastetut kirjastot sekvensoitiin NextSeq 550Dx -sekvensointijärjestelmässä DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager -moduulilla.

Seuraavassa taulukossa esitetään toissijaisen sekvensoinnin keskiarvot ja varianttintunnistuksen suorituskykymittarit kunkin paneelin kohdalla testattujen teknisten replikaattien osalta.

Taulukko 6 Määrittelyn suorituskyky kahdella kokonaisella eksomipaneelilla

Paneeli	Tyynyllisen ainutkertaisen readin rikastus	Kattavuuden yhdenmukaisuus	Fragmenttipituuden keskiarvo	SNV-takaisinkutsu ¹	SNV-tarkkuus ²	Indel-takaisinkutsu ¹	Indel-tarkkuus ²
Eksomipaneeli 1 (45 Mt)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Eksomipaneeli 2 (36,8 Mt)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹Takaisinkutsu = Positiiviset/(todelliset positiiviset + virheelliset negatiiviset)

²Tarkkuus = Todelliset positiiviset/(todelliset positiiviset + virheelliset positiiviset)

Määrittelyn tunnistusraja

Horizon HD799 DNA -viitestandardia käytettiin tunnistusrajan testaukseen. HD799 koostuu kohtalaisen vaarantuneesta formaliinilla käsitellystä DNA:sta, jossa on tunnettuja SNV-kohteita alleelitaajuuksilla alueella 1–24,5 %. Käytettiin pienintä suositeltua DNA-syötettä (50 ng) ja arvioitiin SNV-osien havaitsemisastetta $\geq 5,0$ %:n variantti-alleelitaajuudella (VAF). Testattiin 16 teknistä replikaattia käyttäen FFPE-työnkulkua illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrittelyllä, joka on rikastettu yleisellä syöpää koskevalla rikastuspaneelilla (1,94 Mt), jossa on 16 kpl (1-pleksisiä) rikastuksia, ja joka sekvensoidaan sen jälkeen NextSeq 550Dx -laitteessa DNA GenerateFASTQ Dx -moduulilla.

Kaikki näytteet läpäisivät paneelikohtaiset näytteen suorituskykyvaatimukset seuraavassa taulukossa esitetyllä tavalla.

Taulukko 7 Tunnistusrajan näytesuorituskyky

Paneeli	Variantin tunnistusaste SNV-kohteissa, kun VAF $\geq 5,0$ %	Keskiarvo Kattavuuden yhdenmukaisuus
Yleinen syöpää koskeva rikastuspaneeli (1,94 Mt, 523 geeniä)	100 %	99 %

Häiritsevät aineet

Mahdollisten interferenttien vaikutusta illumina DNA Prep with Enrichment Dx:ssä arvioitiin testaamalla määrittelyn suorituskykyä interferenssiä aiheuttavien aineiden läsnäollessa.

Interferenssi kokoveressä

Asetaminofeenia (eksogeeninen yhdiste, lääkevalmiste), kreatiniinia ja triglyseridejä (endogeeniset metaboliitit) testattiin lisäämällä niitä ihmisen kokoverinäytteisiin ennen DNA:n eristämistä. Veren keräyksestä (lyhyt näytteenotto) johtuvan interferenssin arvioimiseksi kokoverinäytteisiin lisättiin myös EDTA:ta. Lisäksi näytteen valmistelusta johtuvan interferenssin arvioimiseksi molekyyliaadun etanolia lisättiin kokoverestä eristettyyn DNA:han.

Seuraavassa taulukossa esitetään testipitoisuudet interferenttiä kohti.

Taulukko 8 Kokoverestä testattavat mahdollisesti interferenssiä aiheuttavat aineet ja pitoisuudet

Testattu aine	Testipitoisuus
Asetaminofeeni	15,6 mg/dl* Odotettavissa oleva kolme kertaa korkeampi pitoisuus lääkehoitoannoksen jälkeen.
Kreatiniini	15 mg/dl* Korkein väestössä havaittu pitoisuus.
Triglyseridit	1,5 g/dl* Korkein väestössä havaittu pitoisuus.
EDTA	6 mg/ml Kolme kertaa veressä odotettavissa oleva pitoisuus EDTA-putkiin kerättynä.
Molekyyliaadun etanoli	15 % v/v Eluaatissa DNA:n eristyksen jälkeen.

*CLSI EP37-ED1:2018:n mukaan

Interferenssiä aiheuttavaa ainetta kohti testattiin 12 teknistä replikaattia Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrityksellä, joka on rikastettu eksomipaneelilla 1 (45 Mt), jossa on yksittäinen (12-pleksinen) rikastus, ja joka sekvensoidaan sen jälkeen NextSeq 550Dx -laitteessa DNA GenerateFASTQ Dx -moduulilla.

Testattavien aineiden kohdalla kaikki 12 näytettä vastasivat näytteen suorituskykyvaatimuksia, eikä määrityksen suorituksessa havaittu interferenssiä.

Interferenssi FFPE-kudoksessa

Kaksi kolorektaalista FFPE-näytettä testattiin, kun mukana oli 0,1 mg hemoglobiinia 10 µm:n FFPE-osiota kohti tai tällainen hemoglobiini puuttui. Tarkoituksena oli edustaa pahinta mahdollista tilannetta, jossa 50 % FFPE-kudosnäytteestä on kontaminoitunut verellä, jonka hemoglobiinitaso on korkea. Näytteet testattiin Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrityksellä yleisellä syöpää koskevalla rikastuspaneelilla 1 (1,94 Mt), jota käytetään edustuspaneelilla yksittäisen pleksin rikastuksissa. Rikastetut kirjastot sekvensoitiin tämän jälkeen NextSeq 550Dx -laitteessa DNA GenerateFASTQ Dx -moduulilla. Kaikki näytteet vastasivat näytteiden suorituskykyvaatimuksia, ja osoitettiin, että hemoglobiini ei vaikuta määrityksen suorituskykyyn häiritsevästi.

Näytteiden valmistelusta johtuvan interferenssin arvioimiseksi kaksi eksogeenistä yhdistettä lisättiin virtsarakon syöpää koskevasta FFPE-kudosnäytteestä eristettyyn DNA:han. Testatut eksogeeniset aineet ovat eristettyjä liuoksia, joita käytetään yleisessä DNA:n eristysprosessissa, ja ne on lueteltu seuraavassa taulukossa yhdessä testattujen määrien kanssa.

Testiaineliuokset ovat kaupallisesti saatavilla sarakepohjaisissa DNA-eristyssarjoissa.

Taulukko 9 FFPE:ssä testatut potentiaalisesti interferenssiä aiheuttavat eksogeeniset aineet ja pitoisuudet

Testattu aine	Testipitoisuus (µl / 30 µl:n eluaatti)
Parafiininpoistoliuos	113 x 10 ⁻⁶
Pesupuskuri AW2	0,417

Interferenssiä aiheuttavaa ainetta kohti testattiin kahdeksan teknistä replikaattia Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrityksellä, joka on rikastettu yleisellä syöpää koskevalla rikastuspaneelilla (1,94 Mt), jossa on yksittäisen pleksin rikastuksia, ja joka sekvensoidaan sen jälkeen NextSeq 550Dx -laitteessa DNA GenerateFASTQ Dx -moduulilla.

Molempien testattavien aineiden kohdalla kaikki kahdeksan näytettä vastasivat näytteen suorituskykyvaatimuksia, eikä määrityksen suorituksessa havaittu interferenssiä.

Ristikontaminaatio

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (naaras, 10 näytettä), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (koiras, 12 näytettä), ei mallikontrolleja (NTC, 2 näytettä) testattiin Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrityksellä ruudukkokuviolla levyasettelussa. Kaikissa näytteissä käytettiin korkeinta (1 000 ng) gDNA-syötesuositusta vaativimpana ehtona näytteen ristikontaminaation arviointiin. Testaus suoritettiin kaksi kertaa, ja suorittajina oli kaksi eri käyttäjää. Eksomipaneelia 1 (45 Mt) käytettiin 12-pleksisissä rikastusreaktioissa. Rikastetut kirjastot sekvensoitiin NextSeq 550Dx:ssä DNA GenerateFASTQ Dx:llä. Arviointi suoritettiin arvioimalla miesten Y-kromosomin kattavuus naarasnäytteissä vertaamalla niitä kokonaisen naisten näytteiden levyn taustatasoihin sekä NTC-näytteiden indeksiedustukseen.

Taulukko 10 Ristikontaminaatiotulokset

Naarasnäytteet, joissa on miesten Y-kromosomin kattavuus < 3x lähtötason melussa	Indeksin edustus NTC:ssä
100 %	< 0,0005 %

Liite: Illumina UD -indeksisovitinsekvenssit

Nämä ainutkertaiset kaksoisindeksisovittimet (UD) järjestellään levyllä suositellun parinmuodostusstrategian täytöntöönpanoa varten. Indeksisovittimet ovat 10 emäksen pituisia tavanomaisten kahdeksan emäksen sijasta.

Indeksisovittimet 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Indeksisovittimet 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Seuraavaa sekvenssiä käytetään Readin 1 ja Readin 2 sovittimen leikkaukseen.

CTGTCTCTTATACACATCT

Levyn A/Joukon 1 indekssovittimet

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
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

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTACAC	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	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGCACTAATG	TGACTACATA
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGGT	CTCATAGCGA

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
UDP0083	GTAAGGCATA	AGACACATTA
UDP0084	GTCCACTTGT	GCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	CATGAGTACT
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	CATGTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGAAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Levyn B/Joukon 2 indeksisovittimet

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
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

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGC GTT
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

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGTAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTGCGATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCCTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Versiohistoria

Asiakirja	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirjanro 200019584 v02	Syyskuu 2022	Lisätty sisältöä, joka tukee sekvensointia NovaSeq 6000Dx -laitteella.

Asiakirja	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirjanro 200019584 v01	Toukokuu 2022	Lisää sekvensointijärjestelmän nimet ja luettelonumerot. Poista ainutkertaiset kaksoisindeksintiedot yksittäisen indeksin kirjastojen kohdalla.
Asiakirjanro 200019584 v00	Toukokuu 2022	Ensimmäinen versio.

Patentit ja tavaramerkit

Tämä asiakirja ja sen sisältö ovat Illumina, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden ("Illumina") omaisuutta, ja ne on tarkoitettu ainoastaan Illuminan asiakkaiden sopimuskäyttöön tässä kuvattujen tuotteiden käyttöön liittyen eikä mihinkään muuhun tarkoitukseen. Tätä asiakirjaa ja sen sisältöä ei saa käyttää tai jakaa missään muussa tarkoituksessa ja/tai välittää, paljastaa tai jäljentää millään muulla tavoin ilman Illuminalta ennakkoon saatua kirjallista lupaa. Illumina ei tällä asiakirjalla luovuta mitään käyttöoikeuksia sen patentti-, tavaramerkki-, tekijänoikeus- tai tapaoikeuksien nojalla eikä vastaavien kolmansien osapuolten oikeuksien nojalla.

Tässä kuvattuja tuotteita saa käyttää vain pätevä ja asianmukaisesti koulutettu henkilökunta noudattamalla täsmällisesti tässä asiakirjassa annettuja ohjeita, jotta tuotteiden asianmukainen ja turvallinen käyttö voidaan taata. Asiakirjan sisältö on luettava ja ymmärrettävä kokonaisuudessaan ennen näiden tuotteiden käyttöä.

MIKÄLI TÄSSÄ ANNETTUJA OHJEITA EI LUETA JA TÄSMÄLLISESTI NOUDATETA, SEURAUKSENA VOI OLLA TUOTTEIDEN VAURIOITUMINEN, HENKILÖVAHINKOJA JOKO KÄYTTÄJILLE TAI MUILLE JA MUITA OMAISUUSVAHINKOJA, MINKÄ LISÄKSI TUOTTEITA MAHDOLLISESTI KOSKEVAT TAKUUT MITÄTÖITYVÄT.

ILLUMINA EI OLE VASTUUSSA TÄSSÄ KUVATTUJEN TUOTTEIDEN VÄÄRINKÄYTTÖSTÄ (MUKAAN LUKIEN TUOTTEEN OSAT JA OHJELMISTO).

© 2022 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

Kaikki tavaramerkit ovat Illumina, Inc:n tai niiden vastaavien omistajien omaisuutta. Tarkemmat tavaramerkkitiedot annetaan osoitteessa www.illumina.com/company/legal.html.

Yhteystiedot



Illumina

5200 Illumina Way

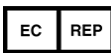
San Diego, California 92122 U.S.A.

+1 800 809.ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (Pohjois-Amerikan ulkopuolella)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B. V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Alankomaat

Rahoittaja Australiassa

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Australia

Tuotteiden merkinnät

Katso tuotteen pakkauksessa ja merkinnöissä käytettyjen symbolien selitykset osoitteesta support.illumina.com käyttämäsi sarjan välilehdeltä *Documentation* (Dokumentaatio).