

ZA IN VITRO DIJAGNOSTIKU
SAMO ZA IZVOZ

Namjena

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit skup je reagensa i potrošnog materijala namijenjen pripremi biblioteka uzoraka iz genomske DNA dobivene iz humanih stanica i tkiva. Za pripremu biblioteka koje ciljaju specifična genomska područja od interesa potrebni su paneli sa sondama koje pribavlja korisnik. Generirane biblioteka uzoraka namijenjene su upotrebi na sustavima za sekvenciranje tvrtke Illumina.

Načela postupka

Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit namijenjen je za pripremu DNA biblioteka za sekvenciranje za ciljna područja iz genomske DNA dobivene iz humanih stanica i tkiva.

Za ciljno obogaćivanje potrebni su biotinizirani oligonukleotidni paneli, koje pribavlja korisnik. Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilan je s panelima raznih veličina, uključujući sve između malih panela (< 20 000 sondi) i velikih panela (> 200 000 sondi). Generirane obogaćene biblioteka namijenjene su sekvenciranju na sustavima za sekvenciranje tvrtke Illumina.

Postupak za Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sastoji se od sljedećih koraka:

- **Tagmentiranje genomske DNA** – koristi se Enrichment BLT Small (eBLTS) za tagmentiranje ulazne DNA. Tijekom tagmentacije gDNA se u jednom koraku fragmentira i označava adapterima. Nužno je minimalno 50 ng ulazne DNA da bi se zasitio eBLTS u reakciji tagmentacije. Kad se postigne zasićenost, eBLTS fragmentira određeni broj DNA molekula radi generiranja normaliziranih biblioteka s dosljednom raspodjelom veličine fragmenata.
- **Pročišćavanje nakon tagmentacije** – DNA označena adapterima pročišćava se na eBLTS-u kako bi se koristila u amplifikaciji.
- **Amplifikacija tagmentirane DNA** – tagmentirana DNA se amplificira s pomoću PCR programa ograničenog ciklusa. Jedinstveni dvostruki (unique dual, UD) indeksi dodaju se na krajeve DNA fragmenata, što omogućuje dvostruko jedinstveno barkodiranje biblioteka DNA i generiranje klastera tijekom sekvenciranja.
- **Pročišćavanje biblioteka** – postupak čišćenja s pomoću zrnaca koristi se za čišćenje i sortiranje amplificiranih biblioteka DNA na temelju veličine.
- **Izrada skupova biblioteka** – DNA biblioteka kombiniraju se s jedinstvenim indeksima u jedan skup od najviše 12 biblioteka. Biblioteka se mogu grupirati u skupove prema volumenu ili masi.
- **Hibridizacija sondi** – sastoji se od reakcije hibridizacije tijekom koje se biblioteka dvostruke DNA denaturiraju te se panel biotiniziranih DNA sondi hibridizira na ciljna genomska područja.
 - Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilan je s raznim panelima. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne sadrži panel za obogaćivanje. Panele sa sondama pribavlja korisnik i oni moraju zadovoljavati određene specifikacije. Reagensi iz kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Kit kompatibilni su s DNA oligonukleotidnim panelima za obogaćivanje tvrtke Illumina i drugih proizvođača koji zadovoljavaju određene specifikacije. Da biste saznali više o odgovarajućim specifikacijama za panele drugih proizvođača, pogledajte odjeljak [Zahtjevi za panele sa sondama za obogaćivanje na stranici 9](#).

- **Hvatanje hibridiziranih sonda** – s pomoću zrnaca Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) hvataju se biotinizirane sonde hibridizirane s ciljnim područjima od interesa.
- **Amplifikacija obogaćenih biblioteka** – s pomoću PCR-a amplificiraju se obogaćene biblioteke.
- **Pročišćavanje amplificiranih obogaćenih biblioteka** – postupak čišćenja s pomoću zrnaca koristi se za čišćenje obogaćenih biblioteka spremnih za sekvenciranje.
- **Sekvenciranje** – sekvenciranje obogaćenih biblioteka izvodi se na sustavima za sekvenciranje MiSeqDx, NextSeq 550Dx ili NovaSeq 6000Dx. U slučaju sustava MiSeqDx i NextSeq 550Dx za postavljanje obrade sekvenciranjem, nadzor obrade i primarnu analizu (generiranje FASTQ-a iz određivanja baza) koristi se integrirani modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager. U slučaju sustava NovaSeq 6000Dx za postavljanje obrade i sekundarnu analizu s nekoliko dostupnih tijekova rada koristi se aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Ograničenja postupka

- Za *in vitro* dijagnostiku.
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilan je s genomskom DNA dobivenom od humanih stanica i tkiva.
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilan je s ulaznom dvostrukom gDNA od 50 – 1000 ng. Ne jamče se radna svojstva uz ulaze izvan tih pragova.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne sadrži reagense za izdvajanje DNA. Rezultati analitičkog testiranja, uključujući testiranje utjecaja, navedeni u odjeljku [Karakteristike radnih svojstava na stranici 56](#) dobiveni su uz punu krv i FFPE kao vrste reprezentativnih uzoraka s reprezentativnim kompletima za izdvajanje DNA. Svi dijagnostički testovi razvijeni za upotrebu s reagensima iz kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit zahtijevaju potpunu provjeru valjanosti za sve aspekte radnih svojstava s odabranim kompletom za izdvajanje DNA.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne preporučuje se za uzorke FFPE-a loše kvalitete s $\Delta Cq > 5$. Upotreba uzoraka s $\Delta Cq > 5$ povećava vjerojatnost neuspješne pripreme biblioteka i smanjuje radna svojstva analize.
- Reagensi iz kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit konfigurirani su i testirani za unos uzoraka, reakcije obogaćivanja i višestrukost indicirane u sljedećoj tablici.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Ulazni uzorak	Reakcije obogaćivanja	Višestrukost obogaćivanja
Komplet sa 16 uzoraka	Niska kvaliteta (FFPE)	16 reakcija	jednostruko
Komplet s 96 uzoraka	Visoka kvaliteta (npr. puna krv)	8 reakcija	12-struko

- Obrada ulaznih FFPE uzoraka testirana je i preporučuje se isključivo za reakcije jednostrukog obogaćivanja uz upotrebu kompleta sa 16 uzoraka.
- Za komplet s 96 uzoraka moguće su nestandardne višestrukosti (od dvostrukosti do 11-strukosti), ali uz sljedeća ograničenja:
 - Obrada uzoraka u reakcijama obogaćivanja od 2-struke do 11-struke smanjuje kapacitet kompleta.
 - Ne jamče se optimalni rezultati. Postizanje prikladnog učinka obogaćivanja za nestandardne višestrukosti možda će zahtijevati dodatnu optimizaciju.
 - Za strategije izrade skupova uz nisku višestrukost (od dvostrukosti do 8-strukosti) potrebno je odabrati indeksne adaptere s različitim sekvencama radi optimizacije balansa boja u svrhu uspješnog sekvenciranja i analize podataka. Modul DNA GenerateFASTQ Dx na instrumentima MiSeqDx i NextSeq 550Dx nudi mogućnosti za kombinacije indeksiranja s balansiranjem boja tijekom postavljanja obrade. Da biste saznali više o strategijama izrade skupova, pročitajte odjeljak [Metode stvaranja skupova na stranici 32](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ograničen je na isporuku obogaćenih biblioteka koje se sekvenciraju isključivo na instrumentima MiSeqDx, NextSeq 550Dx i NovaSeq 6000Dx. Upotreba drugih sustava za sekvenciranje zahtijeva kompletnu provjeru valjanosti svih aspekata radnih svojstava.
- Paneli za obogaćivanje nisu dio ovog proizvoda. Rezultati analitičkog testiranja navedeni u odjeljku [Karakteristike radnih svojstava na stranici 56](#) dobiveni su s reprezentativnim panelima za obogaćivanje i navedeni su samo u informativne svrhe. Analitičke karakteristike radnih svojstava služe kao primjeri općih sposobnosti analize i ne predstavljaju sposobnosti ni prikladnost koji se tiču specifičnih izjava o analizi. Svi dijagnostički testovi razvijeni za upotrebu s tim reagensima zahtijevaju kompletnu provjeru valjanosti svih aspekata radnih svojstava.
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilan je s panelima za obogaćivanje tvrtke Illumina i onima drugih proizvođača. No, ne jamče se radna svojstva s panelima za obogaćivanje drugih proizvođača koji ne odgovaraju zahtjevima za panele. Da biste saznali više o zahtjevima za panele, pogledajte odjeljak [Zahtjevi za panele sa sondama za obogaćivanje na stranici 9](#).
- Kod kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit predviđeno vrijeme hibridizacije iznosi 2 sata. Duže vrijeme trajanja hibridizacije može utjecati na mjerne podatke radnih svojstava.
- Moduli DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager za MiSeqDx i NextSeq 550Dx daju samo FASTQ datoteke. Ako koristite te module, morate provesti sekundarnu provjeru valjanosti analize.

- Aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx dostupna je na instrumentu NovaSeq 6000Dx. Ta aplikacija podržava više tijekova rada sekundarne analize, uključujući generiranje FASTQ-a, generiranje FASTQ-a i VCF-a za prepoznavanje varijanti spolnih stanica te generiranje FASTQ-a i VCF-a za prepoznavanje varijanti somatskih stanica. Ako tu aplikaciju upotrebljavate za generiranje VCF-a, ne morate provoditi sekundarnu provjeru valjanosti analize.
- Ograničenja aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pri upotrebi s instrumentom NovaSeq 6000Dx potražite u *Informativnom pregledu za instrument NovaSeq 6000Dx (broj dokumenta 200025276)*.

Komponente proizvoda

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sastoji se od sljedećih komponenti.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, kataloški br. 20051354 (16 uzoraka) ili br. 20051352 (96 uzoraka)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, kataloški br. 20051355 (16 uzoraka) ili br. 20051353 (96 uzoraka)
- Modul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx za NextSeq 550Dx, kataloški br. 20063024
- Modul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx za MiSeqDx, kataloški br. 20063022
- Aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za NovaSeq 6000Dx, kataloški br. 20074609

Priloženi reagensi

Dovršavanje postupka s reagensom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx zahtijeva Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A ili Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Možete izvesti sljedeći broj priprema biblioteka i reakcija obogaćivanja koristeći komplet sa 16 ili 96 uzoraka.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Ulazni uzorak	Reakcije obogaćivanja	Višestrukost obogaćivanja
Komplet sa 16 uzoraka	Niska kvaliteta (FFPE)	16 reakcija	jednostruko
Komplet s 96 uzoraka	Visoka kvaliteta (npr. puna krv)	8 reakcija	12-struko

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

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, čuvati na temperaturi od 15 °C do 30 °C

Sljedeći reagensi isporučuju se na sobnoj temperaturi. Odmah uskladištite reagense na navedenoj temperaturi pohrane da biste osigurali odgovarajuća radna svojstva.

Naziv reagensa	Količina epruveta		Boja čepa	Volumen ispune	Aktivni sastojci
	16 uzoraka (br. 20050020)	96 uzoraka (br. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Crvena	350 µl	Otopina deterdženta u vodi.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Zelena	41 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži deterdžent i sol.
Cleanup Beads (CB)	1	Nije primjenjivo*	Crvena	10 ml	Paramagnetska zrnca u krutom stanju u puferiranoj vodenoj otopini.

* Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (br. 20050030) sadrži Cleanup Beads za 96 uzoraka.

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 Samples), čuvati na temperaturi od 15 °C do 30 °C

Za komplete za 96 uzoraka Illumina Prep Dx Cleanup Beads (kataloški br. 20050030) sadrži Cleanup Beads. Sljedeći reagens isporučuje se na sobnoj temperaturi. Odmah uskladištite reagense na navedenoj temperaturi pohrane da biste osigurali odgovarajuća radna svojstva. Za komplete za 16 uzoraka Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (kataloški br. 20050020) sadrži Cleanup Beads.

Naziv reagensa	Količina	Boja čepa	Volumen ispune	Aktivni sastojci
Cleanup Beads (CB)	4	Crvena	10 ml	Paramagnetska zrnca u krutom stanju u puferiranoj vodenoj otopini.

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C

Sljedeći se reagensi isporučuju u hladnjaku. Odmah uskladištite reagense na navedenoj temperaturi pohrane da biste osigurali odgovarajuća radna svojstva. Epruvetu za čuvanje eBLTS-a pohranite uspravno tako da su zrnca uvijek potopljena u pufer.

Naziv reagensa	Količina epruveta		Boja čepa	Volumen ispune		Aktivni sastojci
	16 uzoraka (br. 20050021)	96 uzoraka (br. 20050026)		16 uzoraka	96 uzoraka	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Žuta	200 µl	290 µl	Streptavidin Magnetic Beads povezana s transposomima u puferiranoj vodenoj otopini koja sadrži glicerol, EDTA, ditiotritol, sol i deterdžent.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Prozirna	1,8 ml	1,8 ml	Puferirana vodena otopina.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, čuvati na temperaturi od -25 °C do -15 °C

Sljedeći se reagensi isporučuju zamrznuti. Odmah uskladištite reagense na navedenoj temperaturi pohrane da biste osigurali odgovarajuća radna svojstva.

Naziv reagensa	Količina epruveta		Boja čepa	Volumen ispune		Aktivni sastojci
	16 uzoraka (br. 20050022)	96 uzoraka (br. 20050027)		16 uzoraka	96 uzoraka	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Prozirna	290 µl	290 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži magnezijevu sol i dimetilformamid.
Poboljšana mješavina za PCR (EPM)	2	4	Prozirna	200 µl	610 µl	DNA polimeraza i dNTPs u puferiranoj vodenoj otopini.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 samples), čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C

Za komplete za 16 uzoraka Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloški broj 20050023) sadrži sljedeće reagense. Za komplete za 96 uzoraka Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloški broj 20050028) sadrži sljedeće reagense.

Sljedeći se reagensi isporučuju u hladnjaku. Odmah uskladištite reagense na navedenoj temperaturi pohrane da biste osigurali odgovarajuća radna svojstva.

Naziv reagensa	Količina epruveta	Boja čepa	Volumen ispune	Aktivni sastojci
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Prozirna	1,2 ml	Zrnca Streptavidin Magnetic Beads u puferiranoj vodenoj otopini s formamidom, deterdžentom i solju.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Prozirna	1,8 ml	Puferirana vodena otopina.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Prozirna	200 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži deterdžent i sol.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Prozirna	200 µl	Puferirana vodena otopina.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 samples), čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C

Za komplete za 96 uzoraka Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloški br. 20050028) sadrži sljedeće reagense. Za komplete za 16 uzoraka IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloški br. 20050023) sadrži reagense.

Sljedeći se reagensi isporučuju u hladnjaku. Odmah uskladištite reagense na navedenoj temperaturi pohrane da biste osigurali odgovarajuća radna svojstva.

Naziv reagensa	Količina epruveta	Boja čepa	Volumen ispune	Aktivni sastojci
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Prozirna	1,2 ml	Zrnca Streptavidin Magnetic Beads u puferiranoj vodenoj otopini s formamidom, deterdžentom i solju.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Prozirna	1,8 ml	Puferirana vodena otopina.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Prozirna	200 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži deterdžent i sol.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Prozirna	200 µl	Puferirana vodena otopina.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, čuvati na temperaturi od –25 °C do –15 °C

Sljedeći se reagensi isporučuju zamrznuti. Odmah uskladištite reagense na navedenoj temperaturi pohrane da biste osigurali odgovarajuća radna svojstva.

Naziv reagensa	Količina epruveta		Boja čepa	Volumen ispune	Aktivni sastojci
	16 uzoraka (br. 20050024)	96 uzoraka (br. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Prozirna	580 µl	Otopina deterdženta u vodi.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Tamnožuta	4,1 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli i deterdžent.
Koktel primera za PCR (PPC)	1	1	Prozirna	320 µl	Mješavina PCR primera (oligonukleotida).
2N NaOH (HP3)	1	1	Prozirna	200 µl	Otopina 2N natrijeva hidroksida (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Plava	480 µl	Puferirana vodena otopina s Cot-1 DNA, tvari za nakupljanje i formamidom.
Poboljšana mješavina za PCR (EPM)	2	1	Prozirna	200 µl	DNA polimeraza i dNTPs u puferiranoj vodenoj otopini.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, čuvati na temperaturi od –25 °C do –15 °C

Sljedeći se reagensi isporučuju zamrznuti. Odmah uskladištite reagense na navedenoj temperaturi pohrane da biste osigurali odgovarajuća radna svojstva. Za sekvence indeksnih adaptera pogledajte odjeljak [Dodatak: Sekvence indeksnih adaptera Illumina UD na stranici 60.](#)

Komponenta	Količina
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Indexes), broj 20050038	1

Komponenta	Količina
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 Indexes), broj 20050039	1

Reagensi koji nisu priloženi

Obavezni reagensi koji nisu priloženi

- Reagensi za izdvajanje i pročišćavanje DNA
- Reagensi za kvantifikaciju DNA
- Etanol (stopostotni, za primjenu u molekularnoj biologiji)
- Voda bez nukleaze
- 1M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 – 8,5
- Otopina 1N NaOH, za primjenu u molekularnoj biologiji
- Ako se koristi sustav za sekvenciranje NextSeq 550Dx:
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (kataloški br. 20028871)
- Ako se koristi sustav za sekvenciranje MiSeqDx:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (kataloški br. 20037124)
- Ako upotrebljavate sustav za sekvenciranje NovaSeq 6000Dx:
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (kataloški br. 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (kataloški br. 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (kataloški br. 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (kataloški br. 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (kataloški br. 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (kataloški br. 20062291)

Zahtjevi za panele sa sondama za obogaćivanje

Reagensi iz kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilni su s panelima DNA oligonukleotida za obogaćivanje tvrtke Illumina i drugih proizvođača. Ako koristite biotinizirane sonde za DNA (fiksne ili prilagođene panele) drugih proizvođača, pripazite da one zadovoljavaju propisane specifikacije.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit optimiziran je te je potvrđena njegova valjanost s pomoću sljedećih specifikacija panela drugih proizvođača. Ne jamče se usporediva radna svojstva pri upotrebi panela drugih proizvođača koji ne zadovoljavaju specifikacije.

- dužina sonde 80 bp ili 120 bp
- između 500 i 675 000 sondi
- jednostruka ili dvostruka DNA
- ukupan ulaz sondi od ≥ 3 pmol za obogaćivanje uz višestrukosti od jednostruke do 12-struke

Skladištenje i rukovanje

- Sobna je temperatura definirana kao temperatura od 15 °C do 30 °C.
- Reagensi su stabilni kad se skladište kako je navedeno do datuma isteka roka trajanja navedenog na naljepnicama na kompletima. Temperature pohrane potražite u odjeljku [Priloženi reagensi na stranici 4](#).
- Zamrznuti reagensi stabilni su maksimalno četiri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja datirana prije navedenog datuma isteka trajanja.
- Postupak za Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ima sljedeće točke sigurnog zaustavljanja:
 - Nakon koraka [Amplificiranje tagmentirane DNA na stranici 28](#) amplificirane biblioteke stabilne su do 30 dana ako se čuvaju na temperaturi od –25 °C do –15 °C.
 - Nakon koraka [Pročišćavanje biblioteka na stranici 30](#) pročišćene amplificirane biblioteke stabilne su do 30 dana ako se čuvaju na temperaturi od –25 °C do –15 °C.
 - Nakon koraka [Izrada skupova od unaprijed obogaćenih biblioteka na stranici 32](#) biblioteke raspoređene u skupove stabilne su do 30 dana ako se čuvaju na temperaturi od –25 °C do –15 °C.
 - Nakon koraka [Amplificiranje obogaćene biblioteka na stranici 43](#) pločica s obogaćenim i amplificiranim bibliotekama može ostati u termocikleru do 24 sata. Ili se pločica može čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 48 sati.
 - Završne pročišćene obogaćene biblioteke stabilne su do 7 dana ako se čuvaju na temperaturi od –25 °C do –15 °C.
- Ako je bilo koji dio pakiranja ili sadržaja kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit oštećen ili kompromitiran, obratite se službi za korisnike tvrtke Illumina.
- U reagensu Stop Tagment Buffer 2 (ST2) može se razviti vidljiv talog ili kristalići. Ako zamijetite talog, zagrijavajte na 37 °C u trajanju od 10 minuta pa promiješajte na vrtložnoj miješalici dok se talog ne rastopi.
- Hybridization Oligos (HYB) i Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) moraju se unaprijed zagrijati na temperaturu držanja hibridizacije primjenjivu za tu vrstu uzorka i panela sa sondama. Da biste saznali više o rukovanju reagensima NHB2 i EEW, pogledajte odjeljak [Napomene povezane s postupkom na stranici 15](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) i HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) mogu razviti kristaliće i postati zamućeni. Ako zamijetite kristaliće ili zamućenost, promiješajte na vrtložnoj miješalici ili pipetirajte gore-dolje dok se otopina ne razbistri. Pripazite da zagrijete NHB2 prije pipetiranja.
- Pri rukovanju zrcima Cleanup Beads (CB) slijedite ove najbolje prakse:
 - Nikad ne zamrzavajte zrnca.

- Netom prije upotrebe promiješajte zrnca na vrtložnoj miješalici dok se ne resuspendiraju i boja se doima homogenu.
- Pri rukovanju reagensom Enrichment BLT Small (eBLTS) slijedite ove najbolje prakse:
 - Epruvetu za čuvanje eBLTS-a pohranite uspravno tako da su zrnca uvijek potopljena u puferu.
 - Temeljito promiješajte eBLTS na vrtložnoj miješalici da se zrnca resuspendiraju. Da bi se izbjeglo ponovno taloženje zrnaca, ne preporučuje se centrifugiranje prije pipetiranja.
 - Ako se zrnca drže za stjenke ili vrh pločice s 96 jažica, 3 sekunde centrifugirajte na 280 × g, a zatim pipetirajte da biste resuspendirali.
- Pri rukovanju pločicama s indeksnim adapterima slijedite ove najbolje prakse:
 - Nemojte dodavati uzorke na pločicu s indeksnim adapterima.
 - Svaka jažica pločice za indekse namijenjena je isključivo jednokratnoj upotrebi.

Obavezna oprema i materijal koji nisu priloženi

Prije pokretanja protokola, postarajte se da pored kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit imate i potrebnu opremu i materijal.

Oprema

Pripazite da prije pokretanja protokola imate nužnu opremu.

Protokol je optimiziran i potvrđena je njegova valjanost uz upotrebu stavki navedenih specifikacija. Ne jamče se usporediva radna svojstva pri upotrebi opreme izvan specifikacija.

Neke su stavke potrebne samo za posebne tijekove rada. Te su stavke navedene u posebnim tablicama.

- Ciklički termostat sljedećih specifikacija:
 - Grijani poklopac
 - Minimalni kontrolni raspon temperature od 10 °C do 98 °C
 - Minimalna točnost temperature od ±0,25 °C
 - Maksimalan reakcijski volumen od 100 µl
 - Kompatibilno s posve zastrtim PCR pločicama s 96 jažica
- Inkubator mikrouzoraka sa sljedećim specifikacijama:
 - Temperaturni raspon okoline od +5,0 °C do 99,0 °C
 - Kompatibilno s MIDI pločicama s 96 jažica
- Umetci za inkubator mikrouzoraka kompatibilni s MIDI pločicama s 96 uzoraka
- Uređaj za miješanje mikropločica velike brzine s rasponom brzine miješanja 200 – 3000 okr./min
- Magnetski stalak kompatibilan s PCR pločicama s 96 jažica
- Magnetski stalak kompatibilan s MIDI pločicama s 96 jažica

- Fluorometar kompatibilan s vašom metodom kvantifikacije
- Analizator fragmenata DNA
- Precizne pipete:
 - Jednokanalne i višekanalne pipete od 10 µl
 - Jednokanalne i višekanalne pipete od 20 µl
 - Jednokanalne i višekanalne pipete od 200 µl
 - Jednokanalne pipete od 1000 µl
 - Precizne pipete osiguravaju točno doziranje reagensa i uzoraka. Jednokanalne ili višekanalne pipete mogu se koristiti ako se redovito kalibriraju i točne su unutar 5 % odstupanja od navedenog volumena.
- Centrifuga za mikropločice
- Mikrocentrifuga
- Neki od sljedećih sustava za sekvenciranje tvrtke Illumina:
 - MiSeqDx Instrument, kataloški broj DX-410-1001
 - Instrument NextSeq 550Dx, kataloški broj 20005715
 - Instrument NovaSeq 6000Dx, kataloški broj 20068232
- **[Neobavezno]** Vakuumski koncentrator
- **[FFPE]** Sustav za PCR prepoznavanje u stvarnom vremenu

Materijal

Pripazite da prije pokretanja protokola imate potreban materijal.

Neke su stavke potrebne samo za posebne tijekove rada. Te su stavke navedene u posebnim tablicama.

Protokol je optimiziran i potvrđena je njegova valjanost uz upotrebu navedenih stavki. Ne jamče se usporediva radna svojstva ako se koristi drugi materijal.

- Filtrirani vrhovi za pipetu
- Konusne epruvete za centrifugu, 15 ml ili 50 ml
- Epruvete za mikrocentrifugiranje od 1,5 ml
- Višekanalni spremnici reagensa bez RNaze/DNaze, jednokratni
- Trake s 8 epruveta i čepovi bez RNaze/DNaze
- Serološke pipete
- Propilenska pločica za pohranu s 96 dubokih jažica od 0,8 ml (MIDI pločica)
- Posve zastrte PCR pločice s 96 jažica i tvrdim omotom
- **[FFPE]** qPCR pločice kompatibilne s qPCR instrumentom

- Ljepljive brtve za pločice s 96 jažica sljedećih specifikacija:
 - Optički proziran poliester koji se može odlijepiti
 - Prikladno za zastrte PCR pločice
 - Jako ljepilo koje podnosi višestruke promjene temperature od –40 °C do 110 °C
 - Bez DNaze/RNaze
- Plastični potrošni materijal kompatibilan s odabranom kvantifikacijskom metodom
- Komplet za fluorometrijsku kvantifikaciju dsDNA kompatibilan s odabranim kvantifikacijskim sustavom:
 - Za kvantifikaciju unaprijed obogaćenih amplificiranih biblioteka može se koristiti komplet za kvantifikaciju širokog raspona.
 - Za kvantifikaciju obogaćenih biblioteka raspon kvantifikacijskog kompleta ovisi o korištenom panelu sa sondama.
- Komplet za analizu fragmenata za kvalifikaciju biblioteka s odabranim sustavom za kvalifikaciju:
 - Za kvalifikaciju unaprijed obogaćenih amplificiranih biblioteka može se koristiti komplet širokog raspona.
 - Za kvalifikaciju obogaćenih biblioteka raspon kvalifikacijskog kompleta ovisi o korištenom panelu sa sondama.
- **[Neobavezno]** Komplet za izdvajanje DNA iz humanih stanica i tkiva. Možete koristiti bilo koju metodu izdvajanja čija je valjanost potvrđena.

Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka



OPREZ

Svim uzorcima rukujte kao da su potencijalno zarazne tvari.

- Ta je analiza kompatibilna s genomskom DNA dobivenom iz humanih stanica i tkiva.
- Kod komercijalno dostupne pročišćene gDNA pripazite da su uzorci transportirani u odgovarajućim uvjetima i čuvani u skladu s uputama proizvođača. Slijedite najbolje prakse pohrane i ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja za gDNA.
- Za ulazne uzorke iz pune krvi slijedite zahtjeve za prikupljanje, prijenos i pohranu krvi primjenjive na odabranu metodu izdvajanja DNA. Može se koristiti bilo koja potvrđena metoda izdvajanja. Transport pune krvi mora biti u skladu sa županijskim, saveznim, državnim i lokalnim odredbama za transport etioloških tvari.
- Za izdvajanje DNA iz FFPE tkiva može se koristiti bilo koja potvrđena metoda izdvajanja. Slijedite upute i preporuke primjenjive na odabranu metodu izdvajanja za određivanje sljedećih praksi:
 - Metoda fiksiranja u formalinu i umetanja u parafin za tkiva, kako bi se osigurala najbolja kvaliteta izdvojene DNA.
 - Pohrana FFPE primjeraka.

- Zahtjevi za početni materijal, poput broja i debljine FFPE presjeka. Za većinu se metoda pročišćavanja preporučuje korištenje svježih izrezanih presjeka.

Upozorenja i mjere opreza

- Reagensi iz kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit mogu sadržavati potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu s odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlju i sigurnosti potražite na sigurnosno-tehničkom listu (SDS-u) na web-mjestu support.illumina.com/sds.html.
- Svim uzorcima krvi rukujte kao da je poznata njihova inficiranost virusom humane imunodeficiencije (HIV), virusom humanog hepatitisa B (HBV) i drugim patogenima koji se prenose krvlju (univerzalne mjere opreza).
- Pridržavajte se laboratorijskih mjera opreza. Nemojte pipetirati ustima. Nemojte jesti, piti ni pušiti u označenim prostorima za rad. Kad rukujete uzorcima i kompletima reagensa, koristite se rukavicama za jednokratnu upotrebu i laboratorijskim kutama. Nakon rukovanja uzorcima i kompletima reagensa temeljito operite ruke.
- Da biste spriječili degradaciju uzorka ili reagensa, prije pokretanja protokola provjerite jesu li sva isparavanja natrijeva hipoklorita posve izvjetrila.
- Kontaminacija uzoraka drugim PCR proizvodima/amplikonima može dovesti do netočnih i nepouzdanih rezultata. Da biste izbjegli kontaminaciju, koristite sljedeće najbolje prakse:
 - Koristite odgovarajuće laboratorijske prakse i higijenu u laboratoriju.
 - Izvodite korake tijekom rada u posebnim područjima za rad prije amplifikacije i nakon amplifikacije.
 - Upotrijebljene reagense pohranite prije pročišćavanja biblioteka u području za rad prije amplifikacije.
 - Odvojite reagense za upotrebu prije amplifikacije od onih za upotrebu nakon amplifikacije.
 - Provjerite upotrebljava li se u područjima prije amplifikacije i nakon amplifikacije posebna oprema, kao što su pipete, vrhovi pipeta, vrtložna miješalica i centrifuga.
- Izbjegavajte međusobnu kontaminaciju. Između uzoraka i doziranja reagensa koristite svježih vrhove za pipete. Korištenjem filtriranih vrhova smanjuje se rizik od prijenosa amplikona i međusobne kontaminacije uzoraka.
 - Pri dodavanju ili prijenosu uzoraka ili glavnih mješavina reagensa promijenite vrhove između svakog uzorka.
 - Pri dodavanju indeksnih adaptera višekanalnom pipetom promijenite vrhove između svakog retka ili svake kolone. Ako koristite jednokanalnu pipetu, promijenite vrhove između uzoraka.
 - Uklonite neupotrijebljene pločice s indeksnim adapterima iz radnog područja.
- U koracima ispiranja etanolom koristite sljedeće najbolje prakse:
 - Uvijek pripremite svježih 80-postotni etanol. Etanol može apsorbirati vlagu iz zraka, što može utjecati na rezultate.

- Pripazite da se tijekom koraka ispiranja ukloni sav etanol iz dna jažica. Preostali etanol može utjecati na rezultate.
- Pridržavajte se navedenog vremena sušenja u koracima koji se tiču magnetskog stalka da biste osigurali potpuno isparavanje. Preostali etanol može utjecati na radna svojstva daljnjih reakcija.
- Uvijek pripremite glavne mješavine prije upotrebe i nikad ne pohranjujte kombinirane radne otopine.
- Nije moguće jamčiti radna svojstva kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kad se postupci ne slijede kako je navedeno u informativnom pregledu.
- Nemojte koristiti nikakve dijelove kompleta nakon datuma isteka trajanja navedenog na naljepnici na kompletu.
- Nemojte mijenjati dijelove kompleta onima iz drugih kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Identifikacija kompleta navedena je na naljepnici na kompletu.

Napomene povezane s postupkom

Preporuke za ulaznu DNA

Protokol za Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilan je s ulaznom dvostrukom genomskom DNA (gDNA) visoke kvalitete od 50 – 1000 ng.

Pripazite da početni uzorak gDNA ne sadrži > 1 mM EDTA i da nema organskih kontaminanata poput fenola i etanola. Te tvari mogu ometati reakciju tagmentacije i dovesti do neuspješne analize.

ulazna gDNA \geq 50 ng

Za ulazne gDNA između 50 i 1000 ng nisu potrebne kvantifikacija ni normalizacija početnog uzorka gDNA.

ulazna gDNA < 50 ng

Mogu se koristiti ulazne DNA od 10 – 50 ng uz sljedeće prilagodbe:

- Ako se koriste ulazne gDNA od 10–49 ng, preporučuje se kvantifikacija početnog uzorka gDNA radi određivanja potrebnog broja PCR ciklusa nakon tagmentacije. Da biste kvantificirali dvostruku ulaznu gDNA, upotrijebite neku metodu temeljenu na fluorometriji. Izbjegavajte metode koje mjere ukupnu nukleinsku kiselinu, kao što je NanoDrop ili druge metode s apsorbancijom UV zračenja.
- Taj protokol ne normalizira prinose završnih unaprijed obogaćenih biblioteka od 10 – 49 ng gDNA te je stoga nužna kvantifikacija i normalizacija biblioteka prije i nakon obogaćivanja.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit karakteriziran je i potvrđen za ulaznu DNA od 50 – 1000 ng. Nije moguće jamčiti ekvivalentna radna svojstva za ulazne gDNA < 50 ng.

Preporuke za unos krvi

Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilan je s gDNA izdvojenom iz periferne pune krvi. Može se koristiti bilo koja potvrđena metoda izdvajanja. Pri izdvajanju gDNA iz pune krvi nije potrebna početna kvantifikacija ulazne DNA – komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit daje normalizirane unaprijed obogaćene biblioteke.

Sljedeći čimbenici mogu utjecati na količinu DNA dobivenu iz uzoraka pune krvi, a time i na normalizaciju biblioteka:

- starost uzorka krvi
- uvjeti pohrane
- postojeća medicinska stanja koja utječu na broj leukocita

Preporuke za ulazne uzorke FFPE tkiva

Koristite sljedeće kriterije kvalitete DNA izdvojene iz FFPE-a da biste odredili odgovarajući ulaz za uspješnu pripremu biblioteka:

- Za uzorke FFPE-a s vrijednosti ΔCq od ≤ 5 preporučena ulazna DNA je 50 – 1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ne preporučuje se za uzorke FFPE-a loše kvalitete s $\Delta Cq > 5$. Moguće je upotrijebiti uzorke s $\Delta Cq > 5$, ali to povećava vjerojatnost neuspješne pripreme biblioteka i smanjuje radna svojstva analize.

Izdvajanje FFPE

Koristite metodu izolacije nukleinske kiseline koja daje velike prinose pri oporavku, svodi potrošnju uzorka na najmanju moguću mjeru i čuva integritet uzorka. Možete koristiti bilo koju metodu izdvajanja DNA iz FFPE uzoraka čija je valjanost potvrđena. Za gDNA izdvojenu iz FFPE tkiva nužna je početna kvantifikacija ulazne DNA, a Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne daje normalizirane unaprijed obogaćene biblioteke.

Kvalifikacija DNA izdvojene iz FFPE-a

gDNA izdvojen iz FFPE tkiva treba se prije upotrebe kvalificirati. Za optimalna radna svojstva odredite kvalitetu DNA uzorka s pomoću metode izdvajanja čija je valjanost provjerena za kvalifikaciju DNA izdvojene iz FFPE uzoraka. Protokol za Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilan je s DNA uzorcima iz FFPE-a s vrijednosti ΔCq od ≤ 5 . Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne preporučuje se za uzorke FFPE-a loše kvalitete s $\Delta Cq > 5$. Moguće je upotrijebiti uzorke s $\Delta Cq > 5$, ali to povećava vjerojatnost neuspješne pripreme biblioteka i smanjuje radna svojstva analize.

[Neobavezno] FFPE referentni uzorci

Pri izvođenju protokola koristite karakteriziran referentni materijal kao što je Horizon HD799 (DNA) kao pozitivnu kontrolu. Kao referentni uzorak može se koristiti i kvalificirani FFPE materijal iz stranih presadaka dobivenih iz linija stanica. Da biste prije upotrebe kvantificirali referentni materijal, upotrijebite neku metodu temeljenu na fluorometriji.

NAPOMENA Obrada referentnog uzorka kao pozitivne kontrole ili kontrole bez predloška troši reagense i smanjuje ukupan broj nepoznatih uzoraka koji se mogu obraditi.

Preporuke za ulazne uzorke

Preporuke za ulazne uzorke za Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sažete su u sljedećoj tablici.

Tablica 1 Preporuke za ulazne uzorke

Vrsta ulaznog uzorka	Količina ulaznog uzorka	Potrebna kvantifikacija ulazne DNA	Potrebna kvaliteta ulazne DNA	Prinos normalizirane unaprijed obogaćene biblioteke
gDNA	10 – 49 ng	Da	omjer 260/280 od 1,8 – 2,0	Ne
gDNA	50 – 1000 ng	Ne	omjer 260/280 od 1,8 – 2,0	Da
gDNA iz krvi	50 – 1000 ng	Ne	omjer 260/280 od 1,8 – 2,0	Da
gDNA iz FFPE- a	50 – 1000 ng	Da	vrijednost ΔCq od ≤ 5	Ne

Preporučeni PCR ciklusi za program eBLTS PCR prilagođeni su na temelju koncentracije i kvalitete ulaznih uzoraka. Da biste saznali više, pogledajte odjeljak [Amplificiranje tagmentirane DNA na stranici 28](#).

Savjeti i tehnike

Izbjegavajte međusobnu kontaminaciju

- Pri dodavanju ili prijenosu uzoraka promijenite vrhove prije *svakog uzorka*.
- Pri dodavanju indeksnih adaptera višekanalnom pipetom, promijenite vrhove između *svakog retka* ili *svake kolone*. Ako koristite jednokanalnu pipetu, promijenite vrhove između uzoraka.

Brtvljenje pločice

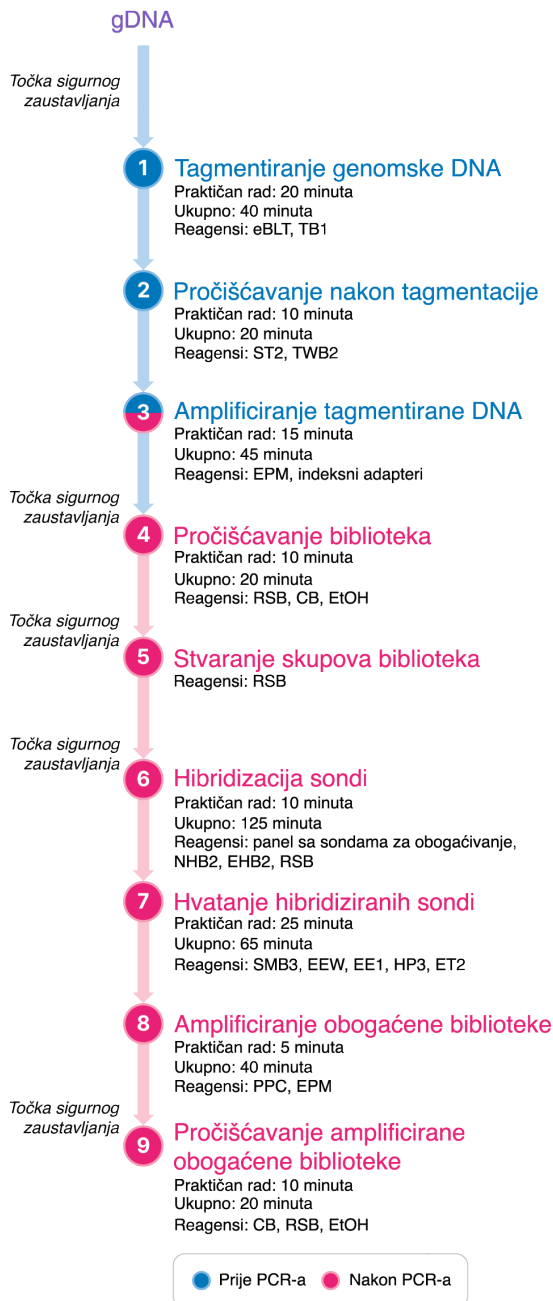
- Uvijek zabrtvite pločicu s 96 jažica novom ljepljivom brtvom s pomoću gumenog valjka da biste prekrili pločicu prije daljnjih koraka u protokolu:
 - Koraci miješanja,
 - Koraci inkubacije. Ako dobro ne zabrtvite pločicu, može doći do isparavanja tijekom inkubacije.
 - Koraci centrifuge
 - Koraci hibridizacije
- Pripazite da su rubovi i jažice posve zabrtvljeni da biste smanjili rizik od međusobne kontaminacije i isparavanja.
 - Ako na brtvi ili stjenkama jažica na pločici primijetite tekućinu ili kondenzat, centrifugirajte ako je potrebno prije skidanja brtve.
- Stavite pločicu na ravnu površinu prije nego što polako uklonite brtvu.

Rukovanje reagensom Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Epruvetu za čuvanje eBLTS-a u hladnjaku pohranite uspravno tako da su zrnca uvijek potopljena u puferu.
- Netom prije upotrebe na vrtložnoj miješalici temeljito promiješajte epruvetu za čuvanje eBLTS-a tako da se zrnca resuspendiraju. Da bi se izbjeglo ponovno taloženje zrnaca, ne preporučuje se centrifugiranje prije pipetiranja.
- Ako se zrnca drže za stjenke ili vrh pločice s 96 jažica, 3 sekunde centrifugirajte na 280 × g, a zatim pipetirajte da biste resuspendirali.
- Pri ispiranju eBLTS-a:
 - Koristite odgovarajući magnetski stalak za pločicu.
 - Držite pločicu na magnetskom stalku dok se u uputama ne kaže da je skinete.
 - Ako se zrnca aspiriraju u vrhove pipeta, vratite ih na pločicu na magnetskom stalku i čekajte da se tekućina razbistri (2 minute).

Tijek rada s kompletom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Sljedeći dijagram prikazuje tijek rada s kompletom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Točke sigurnog zaustavljanja označene su između koraka. Procjene vremena temelje se na obradi 12 uzoraka uz 12-struko obogaćivanje.



Upute za upotrebu

U ovom se odjeljku opisuje protokol za komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Pregledajte cijeli planirani tijek sekvenciranja, od uzimanja uzorka do analize, da biste osigurali kompatibilnost proizvoda i eksperimentirali s parametrima.
- Prije nastavka provjerite sadržaj kompleta i pripazite da imate sve potrebne komponente, opremu i materijal.
 - Biotinilirane sonde drugih proizvođača moraju zadovoljiti određene uvjete. Da biste bili sigurni da vaše sonde drugih proizvođača odgovaraju zahtjevima, pogledajte odjeljak [Zahtjevi za panele sa sondama za obogaćivanje na stranici 9](#).
- Slijedite protokol prikazanim redoslijedom uz upotrebu navedenih volumena i parametara inkubacije.
- Ako u protokolu nije navedena točka sigurnog zaustavljanja, odmah prijedite na sljedeći korak.
- Pri stvaranju glavne mješavine isporučeni volumeni sadrže i višak.
- Pripazite da koristite odgovarajući magnetski stalak za svoju vrstu pločice.

Priprema za izradu skupova

Ovaj je korak nužan za osiguranje uspješnog sekvenciranja obogaćenih biblioteka. Izrada skupova biblioteka može se izvesti prije obogaćivanja i prije sekvenciranja.

Prije obogaćivanja – pojedinačne indeksirane amplificirane biblioteke objedinjuju se u skupove radi obogaćivanja s pomoću odabranog panela sa sondama. Time se stvara multipleksirani skup obogaćenih biblioteka. Za ulazne FFPE uzorke obrada je testirana i preporučuje se isključivo za jednostruke reakcije obogaćivanja. Za gDNA visoke kvalitete testirana je 12-erostrukost, ali moguće su višestrukosti od dvostrukosti do 11-strukosti.

Prije sekvenciranja – jednostruko obogaćene biblioteke i/ili višestruko obogaćene biblioteke objedinjuju se u skupove prije sekvenciranja. Broj obogaćenih biblioteka koje se mogu sekvencirati ovisi o ciljnoj dubini očitavanja za svaki uzorak na vašem sustavu za sekvenciranje.

Jedinstveno dvostruko indeksiranje

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit koristi jedinstvene dvostruke indekse.

- Dvostruko indeksirane biblioteke dodaju sekvence Index 1 (i7) i Index 2 (i5) radi generiranja jedinstveno označenih biblioteka.
- UD indeksi imaju razlikovne, nepovezane sekvence indeksa za očitavanje indeksa i7 i i5. Indeksi su dugi 10 baza.

Odabirom indeksnih adaptera s različitim sekvencama za biblioteke podijeljene u skupove optimizira se balans boje radi uspješnog sekvenciranja i analize podataka. Za skupove višestrukosti koji su ≥ 10 -struki inherentno je

balansirana boja, pa možete koristiti bilo koju kombinaciju indeksnih adaptera. Tijekom obrade sekvenciranjem modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager nudi mogućnosti za kombinacije indeksa s balansiranim bojama i obavještava vas ako se odabrane kombinacije indeksa ne razlikuju dovoljno.

Da biste saznali više o sekvencama indeksnih adaptera Illumina UD i rasporedima pločica, pogledajte [Dodatak: Sekvence indeksnih adaptera Illumina UD na stranici 60](#).

Podržane višestrukosti obogaćivanja

Reagensi iz kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit konfigurirani su i testirani uz jednostruku i 12-struku višestrukost obogaćivanja. Moguće su i druge višestrukosti obogaćivanja, ali neke od njih zahtijevaju dodatnu pripremu unaprijed obogaćenih biblioteka i reagens za panel sa sondama za obogaćivanje.

Dobivanje odgovarajućeg prinosa pri obogaćivanju za nestandardne višestrukosti obogaćivanja može zahtijevati dodatnu optimizaciju. Ne jamče se optimalni rezultati.

- **Višestrukost obogaćivanja** – broj unaprijed obogaćenih biblioteka (1 – 12) skupljenih zajedno u jednu reakciju obogaćivanja za hibridizaciju s pomoću panela sa sondama za obogaćivanje. Primjerice, kombiniranjem 12 unaprijed obogaćenih biblioteka stvara se 12-erostruko obogaćeni skup.
- **Reakcija obogaćivanja** – broj jedinstvenih priprema reakcija obogaćivanja, bez obzira na broj zajednički skupljenih unaprijed obogaćenih biblioteka po reakciji. Primjerice, jednom reakcijom obogaćivanja može se pripremiti jednostruko ili 12-struko obogaćeni skup.

Da biste izračunali ukupan broj naknadno obogaćenih biblioteka, pomnožite višestrukost obogaćivanja po reakciji s brojem reakcija obogaćivanja. Primjerice, jedna reakcija obogaćivanja 12-erostrukog obogaćenog skupa stvara skup od 12 naknadno obogaćenih biblioteka.

Pri izradi skupova od unaprijed obogaćenih biblioteka reagensi iz kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit podržavaju sljedeće reakcije obogaćivanja i višestrukosti.

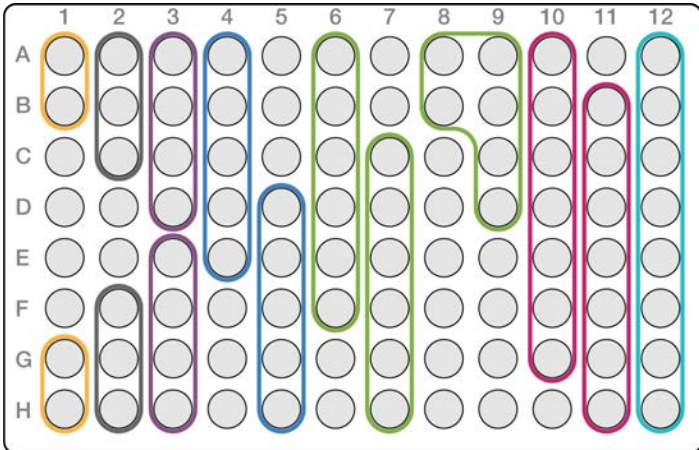
Reagensi iz kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Reakcije obogaćivanja	Višestrukost obogaćivanja
Komplet sa 16 uzoraka	16 reakcija	jednostruko
Komplet s 96 uzoraka	8 reakcija	12-struko

Strategije stvaranja skupova – od dvostrukih do osmerostrukih

U sljedećoj tablici prikazani su indeksni adapteri (jažice) koji se mogu kombinirati u skup, od dvostrukog do osmerostrukog, dok slika u bojama ilustrira svaku kombinaciju.

Stvorite skup od bilo koje višestrukosti ≥ 2 od vrha ili dna kolone. Nemojte stvarati skupove kroz redak.

Višestrukost	Kombinacije	Boja na slici
2	Prve dvije ili zadnje dvije jažice u koloni: <ul style="list-style-type: none"> • A i B • G i H Redovi C – F ne koriste se.	Narančasta
3	Prve tri ili zadnje tri jažice u koloni: <ul style="list-style-type: none"> • A – C • F – H Redovi D i E ne koriste se.	Siva
4	Prve četiri ili zadnje četiri jažice u koloni: <ul style="list-style-type: none"> • A – D • E – H 	Ljubičasta
5	Prvih pet ili zadnjih pet jažica u koloni: <ul style="list-style-type: none"> • A – E • D – H 	Plava
6	[Mogućnost 1] Prvih šest ili zadnjih šest jažica u koloni: <ul style="list-style-type: none"> • A – F • C – H [Mogućnost 2] Prve dvije jažice (A i B) ili zadnje dvije jažice (G i H) u jednoj koloni i četiri jažice u susjednoj koloni.	Zelena
7	Prvih sedam ili zadnjih sedam jažica u koloni: <ul style="list-style-type: none"> • A – G • B – H 	Ružičasta
8	Cijela kolona.	Zelenoplava

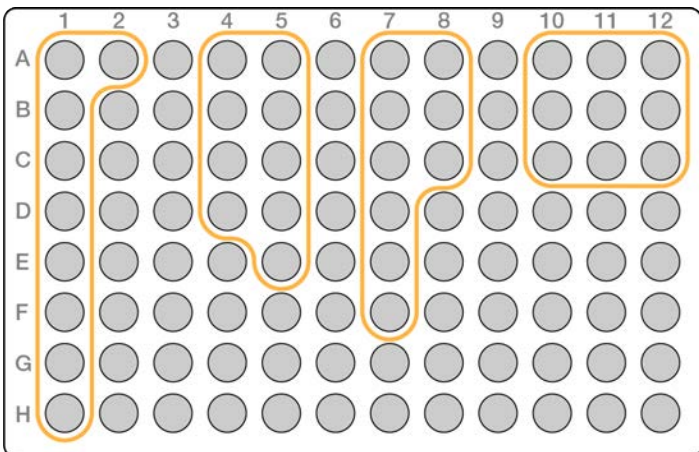


Strategije za deveterostruko stvaranje skupova

Upotrijebite indeksne adaptore iz bilo koje jažice koji optimiziraju balans boje u obradi sekvenciranjem, primjerice:

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

Na sljedećoj slici prikazana su sva četiri primjera.



Tagmentiranje genomske DNA

U ovom se koraku koristi Enrichment BLT Small (eBLTS) za tagmentiranje DNA, a to je postupak kojim se fragmentira i označava („tagira“) DNA sekvencama adaptera.

Potrošni materijal

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (žuti čep)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1, pufer za tagmentiranje 1)
- Voda bez nukleaze
- PCR pločica s 96 jažica
- Ljepljiva brtva
- Epruvete za mikrocentrifugiranje od 1,7 ml
- Traka s 8 epruveta
- Vrhovi za pipetu
 - Višekanalne pipete od 200 µl



OPREZ

Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu s odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlju i sigurnosti potražite na sigurnosno-tehničkom listu (SDS-u) na web-mjestu support.illumina.com/sds.html.

O reagensima

- eBLTS treba čuvati na temperaturama od 2 °C do 8 °C. Ne koristite eBLTS koji je čuvan na temperaturi manjoj od 2 °C.
- Nemojte centrifugirati eBLTS.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
eBLTS (žuti čep)	od 2 °C do 8 °C	Zagrijte na sobnu temperaturu. Netom prije upotrebe promiješajte na vrtložnoj miješalici. Nemojte centrifugirati prije pipetiranja.
TB1	od -25 °C do -15 °C	Zagrijte na sobnu temperaturu. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.

2. Promiješajte DNA na vrtložnoj miješalici ili pipetiranjem, a zatim nakratko centrifugirajte.
3. Spremite sljedeći program TAG na termocikler:
 - Odaberite mogućnost s predgrijavanjem poklopca i postavite na 100 °C

- Postavite reakcijski volumen na 50 µl
- 55 °C u trajanju 5 minuta
- Zadržite na 10 °C

Postupak

1. Dodajte 2 – 30 µl DNA u svaku jažicu PCR pločice s 96 jažica tako da ukupna ulazna količina bude 50 – 1000 ng.
Ako je volumen DNA < 30 µl, dodajte vodu bez nukleaze u uzorke DNA da biste ukupan volumen podigli na 30 µl.
2. Promiješajte temeljito eBLTS na vrtložnoj miješalici tako da se zrnca posve resuspendiraju.
3. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti da biste pripremili Tagmentation Master Mix. Pomnožite svaki volumen s brojem uzoraka koji se obrađuju.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Volumen obuhvaća i višak reagensa.
4. Pipetirajte Tagmentation Master Mix temeljito da biste ga promiješali.
5. Podijelite volumen mješavine Tagmentation Master Mix jednako u traku s 8 epruveta.
6. S pomoću višekanalne pipete od 200 µl prenesite 20 µl reagensa Tagmentation Master Mix u svaku jažicu PCR pločice s uzorkom. Za svaku kolonu ili svaki redak uzorka koristite svježe vrhove.
7. Bacite traku s 8 epruveta u otpad kad primijenite Tagmentation Master Mix.
8. S pomoću višekanalne pipete od 200 µl postavljene na 40 µl pipetirajte svaki uzorak 10 puta da biste ga promiješali. Za svaku kolonu s uzorcima upotrijebite svježi vrh.
Ili zabrtvite PCR pločicu i upotrijebite uređaj za trešnju pločica pri 1600 okr./min u trajanju 1 minute.
9. Zabrtvite pločicu pa je stavite u unaprijed programirani termocikler i pokrenite program TAG.
10. Pričekajte da program TAG dosegne temperaturu zadržavanja od 10 °C, a zatim odmah uklonite pločicu.
11. Ostavite PCR pločicu s 96 jažica 2 minute na sobnoj temperaturi pa prijedite na sljedeći korak.

Pročišćavanje nakon tagmentacije

U ovom se koraku na eBLTS-u ispire DNA označena adapterima prije PCR amplifikacije.

Potrošni materijal

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- Magnetski stalak za PCR pločicu s 96 jažica
- Ljepljiva brtva

- Traka s 8 epruveta
- Vrhovi za pipetu
 - Višekanalne pipete od 20 µl
 - Višekanalne pipete od 200 µl
- Pripremite za daljnji postupak:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Pločica s indeksnim adapterima

O reagensima

- Pripazite da koristite odgovarajući magnetski stalak za svoju pločicu. Korištenje magnetskog stalka za MIDI pločicu za rad s PCR pločicom može spriječiti vezivanje TWB2 sa zrcima.
- Polako pipetirajte TWB2 da biste sveli pjenu na najmanju moguću mjeru te izbjegli aspiraciju neodgovarajućeg volumena i nepotpuno miješanje.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
EPM	od -5 °C do -15 °C	Otapajte na ledu jedan sat. Preokrenite da biste promiješali, a zatim kratko centrifugirajte.
ST2	od 15 °C do 30 °C	Ako zamijetite talog, zagrijavajte na 37 °C u trajanju 10 minuta pa promiješajte na vrtložnoj miješalici dok se talog ne rastopi. Koristite na sobnoj temperaturi.
TWB2	od 15 °C do 30 °C	Koristite na sobnoj temperaturi.
Pločica s indeksnim adapterima	od -5 °C do -15 °C	Otapajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Postupak

1. Dodajte 10 µl ST2 svakoj reakciji tagmentacije. Ako koristite višekanalnu pipetu, pipetirajte ST2 u traku s 8 epruveta, a zatim prenesite odgovarajuće volumene na PCR pločicu. Za svaku kolonu ili redak uzorka koristite svježe vrhove.
2. S pomoću pipete od 200 µl postavljene na 50 µl polako pipetirajte svaku jažicu 10 puta da biste resuspendirali zrnca.
Možete i zabrtviti pločicu i tresti 1 minutu pri 1600 okr./min. Prema potrebi ponovite.
3. Zabrtvite pločicu pa 10 sekundi centrifugirajte pri 280 × g.

4. Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi.
5. Stavite na magnetski stalak za PCR pločicu i čekajte da se tekućina razbistri (3 minute).
6. [\leq 48 uzoraka] Isperite tri puta na sljedeći način.
 - a. S pomoću višekanalne pipete od 200 μ l postavljene na 60 μ l uklonite i bacite supernatant tak da pritom ne uzbibate zrnca.
 - b. Skinite s magnetskog stalka.
 - c. Odmah potom polako dodajte 100 μ l TWB2 izravno na zrnca.
 - d. Polako pipetirajte dok se zrnca posve ne suspendiraju. Ili zabrtvite pločicu i tresite 1 minutu pri 1600 okr./min.
 - e. U slučaju prskanja smanjite brzinu okretanja na 280 \times g u trajanju 10 sekundi.
 - f. Stavite na magnetski stalak za PCR pločicu i čekajte da se tekućina razbistri (3 minute). Ostavite pločicu na magnetskom stalku i TWB2 u jažicama da biste spriječili isušivanje pri izvođenju trećeg ispiranja. Uklonite i bacite supernatant nakon pripreme mješavine PCR Master Mix.
 - g. S pomoću višekanalne pipete od 200 μ l postavljene na 100 μ l uklonite i bacite supernatant.
 - h. Ponovite korake od c do f dvaput, čime ćete izvesti ukupno tri ispiranja.
7. [$>$ 48 uzoraka] Isperite tri puta na sljedeći način.
 - a. Izvedite korake b i c u inkrementima po 1 ili 2 kolone dok se ne obrade sve kolone radi sprječavanja isušivanja.
 - b. S pomoću višekanalne pipete od 200 μ l postavljene na 60 μ l uklonite i bacite supernatant.
 - c. Skinite s magnetskog stalka.
 - d. Odmah nakon toga polako dodajte 100 μ l TWB2 izravno na zrnca.
 - e. Polako pipetirajte dok se zrnca posve ne suspendiraju. Ili zabrtvite pločicu i tresite 1 minutu pri 1600 okr./min.
 - f. U slučaju prskanja smanjite brzinu okretanja na 280 \times g u trajanju 10 sekundi.
 - g. Stavite na magnetski stalak za PCR pločicu i čekajte da se tekućina razbistri (3 minute). Ostavite pločicu na magnetskom stalku i TWB2 u jažicama da biste spriječili isušivanje pri izvođenju trećeg ispiranja. Uklonite i bacite supernatant nakon pripreme mješavine PCR Master Mix.
 - h. S pomoću višekanalne pipete od 200 μ l postavljene na 100 μ l uklonite i bacite supernatant.
 - i. Uklonite s magnetskog stalka i polako dodajte 100 μ l TWB2 izravno na zrnca.
 - j. Ponovite korake „h“ i „i“ u inkrementima od 1 ili 2 kolone dok se ne obrade sve kolone.
 - k. Dvaput ponovite korake e – h, čime ćete ukupno izvesti tri ispiranja.
8. Držite na magnetskom stalku do koraka 4 u odjeljku *Postupak poglavlja Amplificiranje tagmentirane DNA*. TWB2 ostaje u jažicama radi sprječavanja isušivanja zrnaca.

Amplificiranje tagmentirane DNA

U ovom se koraku amplificira tagmentirana DNA s pomoću PCR programa ograničenog ciklusa. Korak PCR-a dodaje adaptore za Index 1 (i7), Index 2 (i5) i sekvence potrebne za generiranje klastera za sekvenciranje.

Potrošni materijal

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Pločica s indeksnim adapterima
- PCR pločica s 96 jažica
- Voda bez nukleaze
- Ljepljiva brtva
- Epruvete za mikrocentrifugiranje od 1,5 ml
- Vrhovi za pipetu
 - Višekanalne pipete od 20 µl
 - Višekanalne pipete od 200 µl

O reagensima

- Pločice s indeksnim adapterima
 - Jažica može sadržavati > 10 µl indeksnih adaptera.
 - Nemojte dodavati uzorke na pločicu s indeksnim adapterima.
 - Svaka jažica pločice za indekse namijenjena je isključivo jednokratnoj upotrebi.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
EPM	od -5 °C do -15 °C	Otapajte na 4 °C ili na ledu 1 sat. Preokrenite da biste promiješali, a zatim kratko centrifugirajte.
Pločica s indeksnim adapterima	od -5 °C do -15 °C	Otapajte 30 minuta na sobnoj temperaturi.

2. Spremite sljedeći program eBLTS PCR na termocikleru koristeći odgovarajući broj PCR ciklusa naveden u tablici u nastavku.
 - Odaberite mogućnost s predgrijavanjem poklopca i postavite na 100 °C
 - Postavite reakcijski volumen na 50 µl
 - 72 °C tijekom 3 minute

- 98 °C tijekom 3 minute
- X ciklusa na:
 - 98 °C tijekom 20 sekundi
 - 60 °C tijekom 30 sekundi
 - 72 °C tijekom 1 minute
- 72 °C tijekom 3 minute
- Zadržite na 10 °C

Ukupno vrijeme obrade je ~38 minuta za 9 ciklusa i ~46 minuta za 12 ciklusa.

Vrsta ulaznog uzorka	Broj PCR ciklusa (X)
10 – 49 ng gDNA	12
50 – 1000 ng gDNA	9
50 – 1000 ng gDNA izdvojeno iz FFPE-a	12
gDNA izdvojena iz krvi	9

Postupak

1. Kombinirajte sljedeće da biste pripremili PCR Master Mix. Pomnožite svaki volumen s brojem uzoraka koji se obrađuju.
 - EPM (23 µl)
 - Voda bez nukleaze (23 µl)

Volumen obuhvaća i višak reagensa.
2. Pipetirajte PCR Master Mix 10 puta da biste promiješali, a zatim kratko centrifugirajte.
3. S pločicom na magnetskom stalku upotrijebite višekanalnu pipetu od 200 µl da biste uklonili i bacili TWB2. Pjena koja ostaje na stjenkama jažica ne utječe negativno na biblioteku.
4. Skinite s magnetskog stalka.
5. Odmah dodajte 40 µl reagensa PCR Master Mix izravno na zrnca u svakoj jažici.
6. Odmah pipetirajte da biste promiješali dok se zrnca posve ponovno ne suspendiraju. Ili zabrtvite pločicu i tresite pri 1600 okr./min 1 minutu.

7. Zabrtvite pločicu s uzorkom i 10 sekundi centrifugirajte na 280 × g.
8. Centrifugirajte 1 minutu pločicu s indeksnim adapterima pri 1000 × g.
9. Pripremite pločicu s indeksnim adapterima.
 - [< 96 uzoraka] Novim vrhom pipete za svaku jažicu probušite foliju za brtvljenje na pločici s indeksnim adapterima samo za onaj broj uzoraka koji će se obrađivati.
 - [96 uzoraka] Poravnajte novu poluzastrtu PCR pločicu iznad pločice s indeksnim adapterima i pritisnite dolje da biste probušili foliju za brtvljenje. Bacite u otpad PCR pločicu upotrijebljenu za bušenje folije za brtvljenje.
10. Koristeći novi vrh pipete, u svaku jažicu dodajte 10 µl unaprijed uparenih indeksnih adaptera.
11. S pomoću pipete postavljene na 40 µl, pipetirajte 10 puta da biste promiješali. Ili zabrtvite pločicu i tresite pri 1600 okr./min 1 minutu.
12. Zabrtvite pločicu pa 10 sekundi centrifugirajte pri 280 × g.
13. Stavite u termocikler i pokrenite program eBLTS PCR.

TOČKA SIGURNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako se zaustavljate, pohranite na temperaturi od –25 °C do –15 °C najviše 30 dana.

Pročišćavanje biblioteka

U tom se koraku za pročišćavanje amplificiranih biblioteka koristi postupak dvostranog pročišćavanja zrcima.

Potrošni materijal

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (pufer za resuspendiranje)
- Svježe pripremljen 80-postotni etanol (EtOH)
- Propilenska pločica za pohranu s 96 dubokih jažica od 0,8 ml (MIDI pločica)
- PCR pločica s 96 jažica
- Magnetski stalak za MIDI pločicu
- Magnetski stalak za PCR pločicu
- Epruvete za mikrocentrifugiranje od 1,5 ml
- Voda bez nukleaze

O reagensima

- Cleanup Beads
 - Prije svake upotrebe promiješajte na vrtložnoj miješalici.
 - Često promiješajte na vrtložnoj miješalici da biste osigurali jednoličnu raspodjelu zrnaca.
 - Polako aspirirajte i izbacite zbog viskoznosti otopine.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
CB	Sobna temperatura	Promiješajte na vrtložnoj miješalici i preokrenite da biste promiješali dok boja tekućine ne postane homogena.
RSB	od 2 °C do 8 °C	Otapajte 30 minuta na sobnoj temperaturi. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.

Postupak

1. Tresite 1 minutu PCR pločicu s 96 jažica pri 1800 okr./min, a zatim kratko centrifugirajte.
2. Stavite na magnetski stalak za PCR pločicu i pričekajte da se tekućina razbistri (1 minutu).
3. Na vrtložnoj miješalici promiješajte CB 3 puta u trajanju 10 sekundi, a zatim preokrenite više puta da biste resuspendirali.
4. Za gDNA visoke kvalitete napravite sljedeće.
 - a. Dodajte 77 µl vode bez nukleaze u sve jažice nove MIDI pločice.
 - b. Dodajte 88 µl CB-a u sve jažice nove MIDI pločice.
 - c. Prenesite 45 µl supernatanta iz svake jažice PCR pločiceu odgovarajuću jažicu na MIDI pločici.
 - d. Bacite PCR pločicu.
 - e. Svaku jažicu pipetirajte 10 puta da biste promiješali. Ili zabrtvite pločicu i tresite pri 1800 okr./min u trajanju 1 minute.
 - f. Zabrtvite pločicu i 5 minuta inkubirajte na sobnoj temperaturi.
 - g. Provjerite da nema mjehurića zraka. Ako ih vidite, zavrtite dolje.
 - h. Stavite na magnetski stalak za MIDI pločicu i pričekajte da se tekućina razbistri (5 minuta).
 - i. Tijekom inkubacije temeljito promiješajte CB na vrtložnoj miješalici, a zatim dodajte 20 µl u svaku jažicu na *novoj* MIDI pločici.
 - j. Prenesite 200 µl supernatanta iz svake jažice prve MIDI pločice u odgovarajuću jažicu nove MIDI pločice (koja sadrži 20 µl CB-a).
 - k. Bacite prvu MIDI pločicu.
 - l. Pipetirajte svaku jažicu na *novoj* MIDI pločici 10 puta da biste promiješali. Ili zabrtvite pločicu i tresite pri 1800 okr./min u trajanju 1 minute.
5. Za izdvojeni FFPE napravite sljedeće.
 - a. Dodajte 81 µl CB-a u svaku jažicu nove MIDI pločice.
 - b. Prenesite 45 µl supernatanta iz svake jažice PCR pločiceu odgovarajuću jažicu na MIDI pločici.
 - c. Bacite PCR pločicu.

- d. Svaku jažicu pipetirajte 10 puta da biste promiješali. Ili zabrtvite pločicu i tresite pri 1800 okr./min u trajanju 1 minute.
6. Inkubirajte 5 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Provjerite da nema mjehurića zraka. Ako ih vidite, zavrtite dolje.
8. Stavite na magnetski stalak za MIDI pločicu i pričekajte da se tekućina razbistri (5 minuta).
9. Uklonite i bacite supernatant tako da pritom ne uzbibate zrnca.
10. Isperite zrnca na sljedeći način.
 - a. S pločicom na magnetskom stalku dodajte 200 µl svježeg 80-postotnog EtOH bez miješanja.
 - b. Inkubirajte 30 sekundi.
 - c. Uklonite i bacite supernatant tako da pritom ne uzbibate zrnca.
11. **Drugi put isperite zrnca.**
12. Sušite na zraku 5 minuta na magnetskom stalku.
13. Tijekom sušenja na zraku s pomoću pipete od 20 µl uklonite i bacite preostali EtOH.
14. Skinite s magnetskog stalka.
15. Zrncima dodajte 17 µl RSB-a.
16. Zabrtvite pločicu i tresite 2 minute pri 1800 okr./min.
17. Inkubirajte 2 minute na sobnoj temperaturi.
18. Provjerite da nema mjehurića zraka. Ako ih vidite, zavrtite dolje.
19. Stavite pločicu na magnetski stalak za MIDI pločicu i pričekajte da se tekućina razbistri (2 minute).
20. Prenesite 15 µl supernatanta na novu PCR pločicu s 96 jažica.

TOČKA SIGURNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako se zaustavljate, zabrtvite pločicu i pohranite na temperaturi od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ najviše 30 dana.

Izrada skupova od unaprijed obogaćenih biblioteka

U ovom se koraku kombiniraju biblioteke DNA s jedinstvenim indeksima u jedan skup koji se sastoji od najviše 12 biblioteka.

Metode stvaranja skupova

Možete stvarati skupove po volumenu ili masi. S pomoću sljedeće tablice odredite odgovarajuću metodu za svoj ulaz.

Tablica 2 Preporučene metode stvaranja skupova

Ulazni uzorak	Metoda stvaranja skupova
10 – 49 ng gDNA	Masa

Ulazni uzorak	Metoda stvaranja skupova
50 – 1000 ng gDNA	Volumen
gDNA izdvojena iz FFPE-a	Masa
gDNA izdvojena iz krvi	Volumen

- Jednostruko obogaćivanje ne zahtijeva stvaranje skupova unaprijed obogaćenih biblioteka. No, možda će biti nužno dodati RSB.
- Nakon kvantifikacije unaprijed obogaćenih biblioteka, od svih se vrsta ulaznih uzoraka mogu napraviti skupovi prema masi radi postizanja optimalne ravnoteže indeksa.
- Završni prinos unaprijed obogaćenih biblioteka generiranih u odvojenim eksperimentalnim pripremama može se razlikovati. Stoga se preporučuje izrada skupova prema masi radi postizanja optimalne ravnoteže indeksa.
- U sljedećim situacijama koristite jednostruko obogaćivanje.
 - 10 – 49 ng gDNA
 - 50 – 1000 ng gDNA izdvojeno iz FFPE-a
 - Prepoznavanje minornih alela s niskom frekvencijom za određivanje somatskih varijanti.

Izrada skupova prema masi

U sljedećim situacijama kvantificirajte biblioteke tako da koriste masu DNA po biblioteci za obogaćivanje navedeno u odjeljku [Izrada skupova od unaprijed obogaćenih biblioteka u jednakoj koncentraciji na stranici 34](#).

- 10 – 49 ng ulaznog uzorka gDNA
- 50 – 1000 ng gDNA izdvojene iz ulaznog FFPE uzorka
- Prepoznavanje minornih alela s niskom frekvencijom za određivanje somatskih varijanti
- gDNA izdvojena iz krvi radi optimalne ravnoteže indeksa

Kvantifikacija unaprijed obogaćenih biblioteka

1. Obradite 1 µl unaprijed obogaćenih biblioteka s pomoću odabrane kvantifikacijske metode temeljene na fluorescenciji koja koristi interkalirajuće bojilo za dsDNA.
 - Za 50 – 1000 ng gDNA visoke kvalitete očekujte prinos unaprijed obogaćenih biblioteka \geq 500 ng.
 - Za 50 – 1000 ng gDNA izdvojene iz FFPE-a očekujte prinos unaprijed obogaćenih biblioteka od 500 – 6000 ng, ovisno o kvaliteti početnog uzorka.

NAPOMENA Kod kvantifikacijskih metoda s različitim sustavnim odstupanjima kvalificirajte metodu kvantifikacije za taj tijek rada. Rezultati koncentracija mogu se razlikovati ovisno o korištenoj metodi.

Izrada skupova od unaprijed obogaćenih biblioteka u jednakoj koncentraciji

S pomoću sljedeće tablice odredite masu DNA po biblioteci potrebnu za obogaćivanje u skladu s vrstom uzorka i višestrukošću obogaćivanja. Ne jamče se optimalni prinosi obogaćivanja ni radna svojstva analize kad se koriste manji prinosi unaprijed obogaćenih biblioteka od preporučenih.

Ukupna masa DNA u reakciji obogaćivanja ne smije prijeći 6000 ng.

Ulazni uzorak	Višestrukost obogaćivanja	Masa DNA po biblioteci (ng)	Ukupna masa DNA biblioteke (ng)
gDNA visoke kvalitete	12	25 – 500	3000 – 6000
gDNA izdvojena iz FFPE-a	1	200	200

- Zabilježite indekse za biblioteke od kojih u tom koraku planirate izraditi skupove.
- Na temelju koncentracije svake biblioteke izračunajte volumen koji se mora dodati u reakciju obogaćivanja da biste postigli potrebnu masu DNA.
 - gDNA visoke kvalitete: izračunajte volumen biblioteke potrebne za ulaz od 250 – 500 ng.
 - gDNA izdvojena iz FFPE-a: izračunajte volumen biblioteke potrebne za ulaz od 200 ng.
- Dodajte izračunati volumen za svaku biblioteku u istu jažicu na PCR pločici.
- Ako koristite gDNA visoke kvalitete, napravite nešto od sljedećeg, ovisno o ukupnom volumenu unaprijed obogaćenih biblioteka raspoređenih u skupove:
 - Ako je volumen unaprijed obogaćene biblioteke = 30 µl, prijedite na odjeljak [Hibridizacija sondi na stranici 36](#).
 - Ako je volumen unaprijed obogaćene biblioteke < 30 µl, dodajte RSB da biste dosegli ukupan volumen od 30 µl.
 - Ako je volumen unaprijed obogaćene biblioteke > 30 µl, upotrijebite neku metodu temeljenu na zrcima ili vakuumski koncentrador da biste koncentrirali uzorak raspoređen u skupove. Dodajte RSB koncentriranom uzorku raspoređenom u skupove da biste dosegli ukupan volumen od 30 µl.
- Ako koristite gDNA izdvojenu iz FFPE-a, napravite nešto od sljedećeg, ovisno o ukupnom volumenu unaprijed obogaćenih biblioteka raspoređenih u skupove.
 - Ako je volumen unaprijed obogaćene biblioteke = 7,5 µl, prijedite na odjeljak [Hibridizacija sondi na stranici 36](#).
 - Ako je volumen unaprijed obogaćene biblioteke < 7,5 µl, dodajte RSB da biste dosegli ukupan volumen od 7,5 µl.

TOČKA SIGURNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako se zaustavljate, zabrtvite pločicu i pohranite je na temperaturi od –25 °C do –15 °C najviše 30 dana.

Izrada skupova prema volumenu

Kad je ulaz 50 – 1000 ng gDNA, nije potrebno kvantificiranje ni normalizacija pojedinačnih biblioteka generiranih u istom eksperimentu.

Da biste postigli optimalna radna svojstva, izradite skupove samo iz uzoraka unaprijed obogaćenih biblioteka koje je pripremio isti korisnik, s istom serijom reagensa i pločicom s indeksnim adapterima.

1. Zabilježite indekse za biblioteku od kojih u tom koraku planirate izraditi skupove.
2. Kombinirajte sljedeću unaprijed obogaćenu biblioteku i volumene RSB-a za višestrukost obogaćivanja u istu jažicu na novoj PCR pločici.
Dobiveni volumen je 30 µl.

Višestrukost obogaćivanja *	Volumen svake unaprijed obogaćene biblioteka (µl)	Volumen RSB-a (µl)
jednostruko	14	16
dvostruko	14	2
trostruko	10	0
četverostruko	7,5	0
peterostruko	6	0
šesterostruko	5	0
sedmerostruko	4,2	0,6
osmerostruko	3,7	0,4
deveterostruko	3,3	0,3
deseterostruko	3	0
11-erostruko	2,7	0,3
12-erostruko	2,5	0

*Da biste saznali više o nestandardnim višestrukostima (od dvostrukosti do 11-strukosti), pročitajte odjeljak [Ograničenja postupka na stranici 2](#).

TOČKA SIGURNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako se zaustavljate, zabrtvite pločicu i pohranite je na temperaturi od –25 °C do –15 °C najviše 30 dana.

[Neobavezno] Kvalificiranje unaprijed obogaćenih biblioteka

Pri izradi skupova prema volumenu, da biste kvantificirali unaprijed obogaćene biblioteka, upotrijebite neku od metoda temeljenih na fluorometriji koja koristi interkalirajuće bojilo za dsDNA. Da biste kvalificirali unaprijed obogaćene biblioteka, upotrijebite analizator fragmenata DNA s odgovarajućim kompletom za analizu fragmenata.

Upotrijebite ukupno 1 µl za kvalifikaciju biblioteka. Unaprijed obogaćene biblioteka dovoljno su koncentrirane da omogućuju mala razrjeđivanja radi kvantifikacije ili analize fragmenata.

Hibridizacija sondi

U tom se koraku vežu ciljne regije DNA. sa sondama za hvatanje.

Reagensi iz kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilni su s panelima DNA oligonukleotida za obogaćivanje tvrtke Illumina i drugih proizvođača. Da biste saznali više o odgovarajućim specifikacijama za panele drugih proizvođača, pogledajte odjeljak [Zahtjevi za panele sa sondama za obogaćivanje na stranici 9](#).

Potrošni materijal

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT blokatori) (plavi čep)
- Panel sa sondama za obogaćivanje
- PCR pločica s 96 jažica
- Ljepljiva brtva
- Pripremite za daljnji postupak:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (žuti čep)

O reagensima

- NHB2 se taloži i odvaja tijekom pohrane.
- Panel sa sondama za obogaćivanje odnosi se na odabrani panel s oligonukleotidima za obogaćivanje podizvođača tvrtke Illumina.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
EHB2	od 2 °C do 8 °C	Zagrijte na sobnu temperaturu. Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Ako primijetite kristaliće ili zamućenost, ponovite miješanje na vrtložnoj miješalici ili pipetirajte gore i dolje da biste promiješali dok se otopina ne razbistri.
Panel sa sondama za obogaćivanje	od -25 °C do -15 °C (Illumina)	Za panele tvrtke Illumina i one drugih proizvođača zagrijte na sobnu temperaturu. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.
NHB2 (plavi čep)	od -5 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Kad dosegne sobnu temperaturu, 5 minuta zagrijte u inkubatoru za mikrouzorke na istu temperaturu na kojoj je sonda koju koristite. Promiješajte na vrtložnoj miješalici na maksimalnoj brzini 3 puta u trajanju od 10 sekundi da biste resuspendirali. Kratko centrifugirajte. Pipetirajte gore i dolje s dna epruvete. Ako primijetite kristaliće ili zamućenost, ponovite miješanje na vrtložnoj miješalici ili pipetirajte gore i dolje da biste promiješali dok se otopina ne razbistri. Upotrijebite toplo da biste izbjegli ponovno stvaranje taloga.
SMB3*	od 2 °C do 8 °C	Ako nastavljate sa sljedećim postupkom odmah nakon 90-minutnog čekanja u programu HYB, zagrijte na sobnu temperaturu barem 2 sata prije pokretanja programa HYB.
EEW* (žuti čep)	od -5 °C do -15 °C	Ako nastavljate sa sljedećim postupkom odmah nakon 90-minutnog čekanja u programu HYB, zagrijte na sobnu temperaturu barem 2 sata prije pokretanja programa HYB. Kad dosegne sobnu temperaturu, 30 minuta zagrijte u inkubatoru mikrouzoraka na primjenjivu temperaturu hibridizacije i hvatanja prije završetka programa HYB.

*Ako se zaustavljate prije sljedećeg postupka, odgodite pripremu tog reagensa za trenutak kad dođe red na taj postupak.

2. Spremite sljedeći program HYB na termocikleru koristeći odgovarajući broj ciklusa, a oni su navedeni u [Tablica 3](#).
 - Odaberite mogućnost s predgrijavanjem poklopca i postavite na 100 °C
 - Postavite reakcijski volumen
 - [gDNA visoke kvalitete] 100 µl
 - [gDNA izdvojena iz FFPE-a] 25 µl
 - 98 °C u trajanju 5 minuta

- X ciklusa, svaki u trajanju od 1 minute, počevši od 98 °C za prvi ciklus, a zatim uz podizanje za 2 °C po ciklusu
- Zaustavite 90 minuta pri odgovarajućoj temperaturi:
 - [gDNA izdvojena iz FFPE-a] 58 °C
 - [paneli sa sondama od 80 mer] 58 °C
 - [određivanje somatskih varijanti] 58 °C
 - [sve ostalo] 62 °C

Ukupno vrijeme obrade jest ~115 minuta.

Tablica 3 Broj ciklusa po uzorku ili panelu

Vrsta uzorka i panela	Broj ciklusa (X)
gDNA izdvojena iz FFPE (bez obzira na vrstu panela)	20
paneli sa sondama od 80 mer (bez obzira na vrstu uzorka)	20
Određivanje somatskih varijanti	20
Svi drugi uzorci i paneli	18

Postupak

1. **[gDNA visoke kvalitete]** Dodajte sljedeće reagense *navedenim redoslijedom* u svaku skupljenu biblioteku na PCR pločici.
Nemojte stvarati glavnu mješavinu. Stvaranje glavne mješavine reagensa NHB2 i EHB2 negativno utječe na radna svojstva obogaćivanja.
 - NHB2 (plavi čep) (50 µl)
 - Panel sa sondama za obogaćivanje (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. **[gDNA visoke kvalitete]** S pomoću pipete postavljene na 90 µl pipetirajte svaku jažicu 10 puta da biste promiješali.
3. **[gDNA izdvojena iz FFPE-a]** Dodajte sljedeće reagense *navedenim redoslijedom* u svaku skupljenu biblioteku na PCR pločici.
Nemojte stvarati glavnu mješavinu. Stvaranje glavne mješavine reagensa NHB2 i EHB2 negativno utječe na radna svojstva obogaćivanja.
 - NHB2 (plavi čep) (12,5 µl)
 - Panel sa sondama za obogaćivanje (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[gDNA izdvojena iz FFPE-a]** S pomoću pipete postavljene na 20 µl pipetirajte svaku jažicu 10 puta da biste promiješali.
5. Zabrtvite pločicu i 10 sekundi centrifugirajte pri 280 × g.

6. Stavite pločicu s uzorcima na unaprijed programirani termocikler i pokrenite program HYB.
7. Nastavite odmah sa sljedećim postupkom kad istekne vrijeme zadržavanja temperature programa HYB.



OPREZ

Taloženje se javlja ako temperatura reakcije hibridizacije padne ispod sobne temperature.

Hvatanje hibridiziranih sondi

U tom se koraku koriste zrnca Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) za hvatanje sondi hibridiziranih s ciljnim područjima od interesa.

Potrošni materijal

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (žuti čep)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- Epruveta za mikrocentrifugiranje od 1,5 ml
- MIDI pločica s 96 jažica
- PCR pločica s 96 jažica
- Ljepljiva brtva
- Magnetski stalak za MIDI pločicu
- Pripremite za daljnji postupak:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

O reagensima

- EEW
 - Pripazite da se EEW otapa na sobnoj temperaturi najmanje 2 sata prije zagrijavanja u inkubatoru mikrouzoraka.
 - Pripazite da se EEW 30 minuta zagrijava u inkubatoru mikrouzoraka prije završetka programa HYB.
 - EEW ostavite u inkubatoru mikrouzoraka kad ga ne koristite. EEW treba ostati zagrijan tijekom protokola.
 - Može biti mutan kad dosegne sobnu temperaturu.
 - Može izgledati žuto.
- SMB3
 - SMB3 mora prije upotrebe biti na sobnoj temperaturi.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal.

Stavka	Skladištenje	Upute
SMB3	od 2 °C do 8 °C	Neka stoji 2 sata kako bi poprimio sobnu temperaturu. Preokrenite, a zatim promiješajte na vrtložnoj miješalici dok se posve ne resuspendira.
EEW (žuti čep)	od -5 °C do -15 °C	Nakon 2 sata inkubacije na sobnoj temperaturi 30 minuta zagrijte u inkubatoru mikrouzoraka na primjenjivu temperaturu hibridizacije i hvatanja prije završetka programa HYB.
EE1	od -5 °C do -15 °C	Otopite na sobnoj temperaturi, a zatim promiješajte na vrtložnoj miješalici.
HP3	od -5 °C do -15 °C	Otopite na sobnoj temperaturi, a zatim promiješajte na vrtložnoj miješalici.
ET2	od 2 °C do 8 °C	Zagrijte na sobnu temperaturu. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.
EPM	od -5 °C do -15 °C	Otapajte na ledu jedan sat. Preokrenite da biste promiješali, a zatim kratko centrifugirajte. Odložite na led.
PPC	od -25 °C do -15 °C	Otapajte na ledu jedan sat. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim kratko centrifugirajte. Odložite na led.

2. Zagrijte u inkubatoru mikrouzoraka s umetkom MIDI bloka za zagrijavanje da biste inkubirali pločicu s uzorcima do neke od sljedećih temperatura. Može se koristiti neobavezni drugi inkubator mikrouzoraka za predgrijavanje EEW-a. Odložite EEW na umetak MIDI bloka za zagrijavanje.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer po panelima sa sondama] 58 °C
 - [određivanje somatskih varijanti] 58 °C
 - [sve ostalo] 62 °C

Postupak

Hvatanje

1. Dodajte SMB3 u odgovarajuću jažicu nove MIDI pločice na sljedeći.
 - [gDNA visoke kvalitete] Dodajte 250 µl SMB3.
 - [gDNA izdvojena iz FFPE-a] Dodajte 62,5 µl reagensa SMB3.
2. S pomoću pipete postavljene na 100 µl za gDNA visoke kvalitete ili 25 µl za FFPE s PCR pločice s 96 jažica u odgovarajuću jažicu nove MIDI pločice.
3. Zabrtvite pločicu i tresite pri 1200 okr./min 4 minute.

- U slučaju prskanja kratko centrifugirajte pločicu.
- Stavite pločicu sa skupljenim bibliotekama na umetak MIDI bloka za zagrijavanje na inkubatoru mikrouzoraka, ispod epruvete s EEW-om, zatvorite poklopac pa inkubirajte 15 minuta na odgovarajućoj temperaturi:
 - [FFPE] 58 °C
 - [panel sa sondama od 80 mer] 58 °C
 - [određivanje somatskih varijanti] 58 °C
 - [sve ostalo] 62 °C
- Uklonite pločicu sa skupljenim bibliotekama i centrifugirajte pri 280 × g u trajanju 30 sekundi.
- Odmah stavite na magnetski stalak za MIDI pločicu i čekajte da se tekućina razbistri (2 minute).
- [gDNA visoke kvalitete] S pomoću pipete postavljene na 200 µl uklonite i bacite supernatant iz svih jažica tako da pritom ne uzbivate zrnca.
- [gDNA izdvojena iz FFPE-a] S pomoću pipete postavljene na 90 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svih jažica a da pritom ne uzbivate zrnca.
- Uklonite i bacite sav preostali supernatant.

Ispiranje

- Skinite s magnetskog stalka.
- [gDNA visoke kvalitete] Brzo uklonite EEW iz inkubatora mikrouzoraka i u svaku jažicu dodajte 200 µl.
- [gDNA izdvojena iz FFPE-a] Brzo uklonite EEW iz inkubatora mikrouzoraka i dodajte 50 µl u svaku jažicu.
- Vratite neupotrijebljeni EEW u inkubator mikrouzoraka da ostane zagrijan.
- Zabrtvite i tresite 4 minute pri 1800 okr./min.
- Stavite pločicu s uzorkom na umetku MIDI bloka za zagrijavanje u inkubator mikrouzoraka, ispod epruvete s EEW-om, zatvorite poklopac pa inkubirajte 5 minuta na odgovarajućoj temperaturi:
 - [FFPE] 58 °C
 - [paneli sa sondama od 80 mer] 58 °C
 - [određivanje somatskih varijanti] 58 °C
 - [svi drugi paneli] 62 °C
- Odmah stavite na magnetski stalak za MIDI pločicu i čekajte da se tekućina razbistri (2 minute).
- S pomoću pipete postavljene na 200 µl za gDNA visoke kvalitete ili 50 µl za FFPE uklonite i bacite sav supernatant iz svih jažica.
- Ponovite korake 1 – 8 dvaput za ukupno tri ispiranja.

Ispiranje prije prijenosa

1. Skinite s magnetskog stalka.
2. [gDNA visoke kvalitete] Brzo uklonite EEW iz inkubatora mikrouzoraka i dodajte 200 µl u svaku jažicu.
3. [gDNA izdvojena iz FFPE-a] Brzo uklonite EEW iz inkubatora mikrouzoraka i dodajte 50 µl u svaku jažicu.
4. Zabrtvite i tresite 4 minute pri 1800 okr./min. U slučaju prskanja, smanjite brzinu na 1600 okr./min.
5. Prenesite resuspendiranu otopinu sa zrcima na novu MIDI pločicu.
Nešto uzorka možda će ostati u jažicama.



OPREZ

Prenošenjem reagensa minimizira se prijenos ostataka reagensa koji mogu inhibirati silazni PCR.

6. Stavite pločicu s uzorkom na umetku MIDI bloka za zagrijavanje u inkubator mikrouzoraka, zatvorite poklopac, a zatim inkubirajte 5 minuta na odgovarajućoj temperaturi:
 - [FFPE] 58 °C
 - [paneli sa sondama od 80 mer] 58 °C
 - [određivanje somatskih varijanti] 58 °C
 - [sve ostalo] 62 °C
7. Odmah stavite na magnetski stalak za MIDI pločicu i čekajte da se tekućina razbistri (2 minute).
8. S pomoću pipete postavljene na 200 µl za gDNA visoke kvalitete ili 50 µl za FFPE uklonite i bacite sav supernatant iz svih jažica.
9. Centrifugirajte pločicu pri 280 × g 30 sekundi.
10. Stavite na magnetski stalak za MIDI pločicu na 10 sekundi.
11. S pomoću pipete od 20 µl uklonite i bacite u otpad ostatak tekućine iz svih jažica.
12. Odmah prijedite na korak [Elucija na stranici 42](#) da biste spriječili isušivanje zrnaca i gubitak prinosa biblioteka.

Elucija

1. Kombinirajte sljedeće volumene da biste pripremili Elution Master Mix. Pomnožite svaki volumen s brojem skupova biblioteka koji se obrađuju.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Volumen obuhvaća i višak reagensa.
2. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim kratko centrifugirajte.
3. Skinite MIDI pločicu s magnetskog stalka.
4. Dodajte 23 µl mješavine Elution Master Mix u svaku jažicu.
5. Zabrtvite pločicu i tresite pri 1800 okr./min u trajanju 2 minute.

6. Inkubirajte pločicu 2 minute na sobnoj temperaturi.
7. Centrifugirajte pri 280 × g u trajanju 30 sekundi.
8. Stavite na magnetski stalak za MIDI pločicu i čekajte da se tekućina razbistri (2 minute).
9. Prenesite 21 µl supernatanta s MIDI pločice u odgovarajuću jažicu na novoj PCR pločici s 96 jažica.
10. Bacite MIDI pločicu.
11. Dodajte 4 µl ET2 u svaku jažicu koja sadrži 21 µl supernatanta.
12. Postavite pipetu na 20 µl i polako pipetirajte svaku jažicu 10 puta da biste promiješali.
13. Zabrtvite pločicu pa centrifugirajte pri 280 × g u trajanju 10 sekundi.
14. Inkubirajte pločicu 1 minutu na sobnoj temperaturi.

Amplificiranje obogaćene biblioteke

U tom se koraku upotrebljava PCR za amplifikaciju obogaćene biblioteke.

Potrošni materijal

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Ljepljiva brtva

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
EPM	od -5 °C do -15 °C	Otapajte na 4 °C ili na ledu 1 sat. Preokrenite da biste promiješali, a zatim kratko centrifugirajte. Odložite na led.
PPC	od -25 °C do -15 °C	Otapajte na 4 °C na ledu 1 sat. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim kratko centrifugirajte. Odložite na led.

2. Spremite sljedeći AMP program na termocikleru s pomoću odgovarajućeg broja PCR ciklusa, koji su navedeni u sljedećoj tablici.
 - Odaberite mogućnost s predgrijavanjem poklopca i postavite na 100 °C
 - Postavite reakcijski volumen na 50 µl
 - 98 °C u trajanju 45 sekundi
 - (X) ciklusa na:
 - 98 °C u trajanju 30 sekundi
 - 60 °C tijekom 30 sekundi

- 72°C u trajanju 30 sekundi
- 72°C u trajanju 5 minuta
- Zadržite na 10 °C

Ukupno vrijeme obrade jest ~35 minuta.

Vrsta uzorka i panela	(X) Ciklusi
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) za gDNA visoke kvalitete	10
Illumina Exome Panel (CEX) za FFPE	12
Svi drugi uzorci i paneli	12 ¹²³⁴

¹ Daljnjom optimizacijom može se prilagoditi na najviše 15 ciklusa za male panele drugih proizvođača. Ako se koristi FFPE, broj ciklusa može se prilagoditi na najviše 17.

² Može se prilagoditi na najviše 17 ciklusa za panele drugih proizvođača koji imaju samo 500 sondi. Ako se koristi FFPE, broj ciklusa može se prilagoditi na najviše 19.

³ Može se prilagoditi na najviše 14 ciklusa za FFPE uzorke.

⁴ Povećavanje broja PCR ciklusa može dovesti do većeg broja duplikata i manjih veličina fragmenata za FFPE uzorke.

Postupak

1. U svaku jažicu dodajte 5 µl PPC-a.
2. U svaku jažicu dodajte 20 µl EPM-a.
3. Zabrtvite pločicu i tresite pri 1200 okr./min 1 minutu.
4. Centrifugirajte pločicu pri 280 × g 10 sekundi.
5. Stavite u unaprijed programiran termocikler i pokrenite program AMP.

TOČKA SIGURNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako se zaustavljate, pohranite na temperaturi od 2 °C do 8 °C najviše dva dana. Ili ostavite u termocikleru do 24 sata.

Pročišćavanje amplificirane obogaćene biblioteke

U ovom se koraku koriste zrnca Cleanup Beads za pročišćavanje obogaćene biblioteke i uklanjanje neželjenih proizvoda.

Potrošni materijal

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (pufer za resuspendiranje)
- Svježe pripremljen 80-postotni etanol (EtOH)
- Ljepljive brtve

- MIDI pločica s 96 jažica
- PCR pločica s 96 jažica
- Magnetski stalak za MIDI pločicu

O reagensima

- Cleanup Beads
 - Prije svake upotrebe promiješajte na vrtložnoj miješalici.
 - Često promiješajte na vrtložnoj miješalici da biste osigurali jednoličnu raspodjelu zrnaca.
 - Polako aspirirajte i izbacite zbog viskoznosti otopine.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal.

Stavka	Skladištenje	Upute
CB	Sobna temperatura	Promiješajte na vrtložnoj miješalici i preokrenite da biste promiješali dok boja tekućine ne postane homogena.
RSB	od 2°C do 8°C	Zagrijte na sobnu temperaturu. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.

2. Iz apsolutnog etanola pripremite svježi 80-postotni EtOH.

Postupak

1. Centrifugirajte PCR pločicu pri 280 × g u trajanju 10 sekundi.
2. Promiješajte CB na vrtložnoj miješalici 3 puta u trajanju 10 sekundi, a zatim preokrenite.
3. Dodajte 40,5 µl CB-a u svaku jažicu nove **MIDI** pločice.
4. Prebacite 45 µl iz svake jažice PCR pločice u odgovarajuću jažicu MIDI pločice.
5. Zabrtvite pločicu i tresite pri 1800 okr./min u trajanju 1 minute.
6. Inkubirajte MIDI pločicu 5 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Centrifugirajte pri 280 × g u trajanju 10 sekundi.
8. Stavite na magnetski stalak za MIDI pločicu i pričekajte da se tekućina razbistri (5 minuta).
9. S pomoću pipete postavljene na 95 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svih jažica.
10. Isperite dvaput na sljedeći način.
 - a. S pločicom na magnetskom stalku dodajte 200 µl svježeg 80-postotnog EtOH bez miješanja.
 - b. Inkubirajte 30 sekundi.
 - c. Uklonite i bacite supernatant tako da pritom ne uzbibate zrnca.
11. Sušite na zraku 5 minuta na magnetskom stalku.
12. Tijekom sušenja na zraku upotrijebite pipetu od 20 µl da biste uklonili i bacili preostali EtOH iz svih jažica.

13. Skinite s magnetskog stalka i dodajte 32 μl RSB-a u svaku jažicu.
14. Zabrtvite pločicu i tresite pri 1800 okr./min u trajanju 1 minute.
15. Inkubirajte pločicu 5 minuta na sobnoj temperaturi.
16. Centrifugirajte pri $280 \times g$ u trajanju 10 sekundi.
17. Stavite na magnetski stalak za MIDI pločicu i pričekajte da se tekućina razbistri (2 minuta).
18. Prenesite 30 μl supernatanta iz MIDI pločice s 96 jažica u odgovarajuću jažicu na novoj PCR pločici.
19. Bacite MIDI pločicu.

TOČKA SIGURNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako se zaustavljate, zabrtvite pločicu i pohranite na temperaturi od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ najviše 7 dana.

Provjera obogaćenih biblioteka

Da biste kvantificirali ulaznu dvostruku gDNA, upotrijebite metodu utemeljenu na fluorescenciji koja koristi interkalirajuće bojilo. Izbjegavajte metode koje mjere ukupnu nukleinsku kiselinu, kao što je NanoDrop ili druge metode s apsorbancijom UV zračenja.

1. Obradite 1 μl obogaćenih biblioteka korištenjem svoje metode kvantifikacije.

NAPOMENA Ukupna molarnost sonde proporcionalno utječe na prinos biblioteke nakon obogaćivanja.

Očekujte srednju veličinu fragmenata od 125 – 235 bp i distribuciju fragmenata DNA s rasponom veličina od ~200 bp do ~1000 bp.

Razrjeđivanje biblioteka na početnu koncentraciju

U ovom se koraku razrjeđuju biblioteke na početnu koncentraciju za vaš sustav za sekvenciranje i to je prvi korak serijskog razrjeđivanja. Nakon razrjeđivanja na početnu koncentraciju biblioteke su spremne za denaturiranje i razrjeđivanje na završnu koncentraciju za umetanje.

Bez obzira na to koji panel sa sondama za obogaćivanje upotrebljavate, Illumina za sekvenciranje preporučuje postaviti obradu s uparenim krajevima s 151 ciklusa po očitavanju (2×151) i 10 ciklusa po indeksnom očitavanju. Ako želite manje preklopljenih očitavanja ili manje sirove pokrivenosti, možete sekvencirati 2×126 ili 2×101 .

1. Izračunajte molarnost biblioteke ili skupa biblioteka s pomoću sljedeće formule.
 - Za biblioteke kvalificirane na analizatoru fragmenata DNA upotrijebite prosječnu veličinu dobivenu za tu biblioteku.
 - Za sve druge metode kvalifikacije upotrijebite 350 bp kao prosječnu veličinu biblioteke.

$$\frac{\text{ng} / \mu\text{l} \times 10^6}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \frac{\text{prosječna veličina biblioteke (bp)}}{}} = \text{Molarnost (nM)}$$

Primjerice, ako je koncentracija vaše biblioteke 20 ng/ μl , a prosječna veličina je 350 bp, molarnost iznosi 86,58 nM.

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

2. S pomočju molarnosti izračunajte volumene RSB-a i potrebnih biblioteka za razrjeđivanje biblioteka na početnu koncentraciju za svoj sustav.

Sustav za sekvenciranje	Minimalan potrebni volumen biblioteka (μl)	Početna koncentracija (nM)	Završna koncentracija za umetanje (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) ili 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM početna je koncentracija za konačnu koncentraciju za umetanje od 350 pM. Ako je potrebno, prilagodite konačnu koncentraciju za umetanje s pomočju sljedeće tablice.

Završna koncentracija za umetanje (pM)	Koncentracija skupljene biblioteka (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. Razrijedite biblioteka s pomočju RSB-a:
- **Biblioteka kvantificirane kao multipleksirani skup biblioteka** – razrijedite skup na početnu koncentraciju za svoj sustav.
 - **Biblioteka kvantificirane pojedinačno** – razrijedite svaku biblioteku na početnu koncentraciju za svoj sustav. Dodajte 10 μl svake razrijedene biblioteka u epruvetu da biste stvorili multipleksirani skup biblioteka.
4. Slijedite upute za denaturiranje i razrjeđivanje za svoj sustav da biste razrijedili na završnu koncentraciju za umetanje.
- U slučaju sustava NextSeq 550Dx pogledajte odjeljak [Priprema za sekvenciranje na sustavu NextSeq 550Dx na stranici 48](#).

- U slučaju sustava MiSeqDx pogledajte odjeljak [Priprema za sekvenciranje na sustavu MiSeqDx na stranici 49](#).
- U slučaju sustava NovaSeq 6000Dx pogledajte odjeljak [Priprema za sekvenciranje na sustavu NovaSeq 6000Dx na stranici 51](#).

Završne koncentracije za umetanje početna su točka općih smjernica. Optimizirajte koncentracije za svoj tijek rada i metodu kvantifikacije tijekom daljnjih obrada sekvenciranjem ili titracijom protočnog članka.

Priprema za sekvenciranje na sustavu NextSeq 550Dx

Slijedite ove upute za denaturiranje i razrjeđivanje biblioteka za sekvenciranje na sustavu za sekvenciranje NextSeq 550Dx.

Potrošni materijal

- HT1 (pufer za hibridizaciju)
- 1N NaOH
- 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

Priprema

Pripremite *svježu* otopinu od 0,2N NaOH da biste denaturirali biblioteke za sekvenciranje. Da biste spriječili da male pogreške pri pipetiranju utječu na konačnu koncentraciju NaOH, priprema se veći volumen.



OPREZ

Svježe razrijeđen 0,2N NaOH ključan je za postupak denaturiranja. Nepravilno denaturiranje može smanjiti prinos.

1. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugiranje da biste razrijedili 1N NaOH na 0,2N NaOH:

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal.

Stavka	Skladištenje	Upute
HT1	od -5 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Pohranite na 2 °C – 8 °C do trenutka kad ste spremni za razrjeđivanje denaturiranih biblioteka.

2. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugiranje da biste pripremili svježu otopinu NaOH:

- Voda laboratorijske kvalitete (800 µl)
- 1N NaOH (200 µl)

Rezultat je 1 ml 0,2 N NaOH.

3. Preokrenite epruvetu nekoliko puta da biste promiješali.
4. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugiranje da biste pripremili 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

- Voda laboratorijske kvalitete (800 µl)
- 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

Rezultat je 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

NAPOMENA Epruveta mora biti začepljena. Upotrijebite svježu otopinu unutar **12 sati**.

Denaturiranje biblioteka

1. Kombinirajte sljedeće volumene biblioteka i svježe razrijeđenog 0,2N NaOH u epruveti za mikrocentrifugiranje.
 - 10 µl biblioteka
 - 10 µl 0,2N NaOH
2. Kratko promiješajte na vrtložnoj miješalici pa centrifugirajte pri 280 × g u trajanju 1 minute.
3. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
4. Dodajte 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Razrjeđivanje denaturiranih biblioteka na 20 pM

1. Dodajte 970 µl unaprijed ohlađenog HT1 u epruvetu s denaturiranim bibliotekama.
Rezultat je 20 pM denaturirana biblioteka.
2. Kratko promiješajte na vrtložnoj miješalici pa centrifugirajte pri 280 × g u trajanju 1 minute.
3. Stavite biblioteka 20 pM na led dok ne budete spremni za završno razrjeđivanje.

Razrjeđivanje biblioteka na koncentracije za umetanje

1. Dodajte sljedeće volumene da biste razrijedili denaturiranu 20 pM otopinu biblioteka na 1,2 pM.
 - Otopina denaturirane biblioteka (78 µl)
 - Unaprijed ohlađen HT1 (1222 µl)Ukupni volumen je 1,3 ml na 1,2 pM.
2. Preokrenite da biste promiješali, a zatim pulsno centrifugirajte.
3. Prijedite na sekvenciranje. Upute potražite u *Referentnom vodiču za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta 100000009513)*.

Priprema za sekvenciranje na sustavu MiSeqDx

Slijedite upute u nastavku za denaturiranje i razrjeđivanje biblioteka za sekvenciranje na sustavu za sekvenciranje MiSeqDx.

Potrošni materijal

- HT1 (pufer za hibridizaciju)
- 1N NaOH

Priprema

Pripremite *svježu* otopinu od 0,2N NaOH da biste denaturirali biblioteke za sekvenciranje. Da biste spriječili da male pogreške pri pipetiranju utječu na konačnu koncentraciju NaOH, priprema se veći volumen.



OPREZ

Svježe razrijeđen 0,2N NaOH ključan je za postupak denaturiranja. Nepravilno denaturiranje može smanjiti prinos.

1. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugiranje da biste razrijedili 1N NaOH na 0,2N NaOH:

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal.

Stavka	Skladištenje	Upute
HT1	od -5 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Pohranite na 2 °C – 8 °C do trenutka kad ste spremni za razrjeđivanje denaturiranih biblioteka.

2. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugiranje da biste pripremili svježu otopinu NaOH:

- Voda laboratorijske kvalitete (800 µl)
- 1N NaOH (200 µl)

Rezultat je 1 ml 0,2 N NaOH.

NAPOMENA Epruveta mora biti začepljena. Upotrijebite svježu otopinu unutar **12 sati**.

Denaturiranje biblioteke od 4 nM

1. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugiranje.
 - Biblioteka od 4 nM (5 µl)
 - 0,2N NaOH (5 µl)
2. Kratko promiješajte na vrtložnoj miješalici pa centrifugirajte pri 280 × g u trajanju 1 minute.
3. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
4. Dodajte 990 µl unaprijed ohlađenog HT1 u epruvetu s denaturiranom bibliotekom.
Rezultat je 1 ml 20 pM denaturirana biblioteka.

Razrjeđivanje denaturirane 20 pM biblioteke

1. Razrijedite na željenu koncentraciju koristeći sljedeće volumene.

Koncentracija	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM biblioteka	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Unaprijed ohlađen HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Preokrenite da biste promiješali, a zatim pulsno centrifugirajte.
3. Prijedite na sekvenciranje. Upute potražite u *Referentnom vodiču za instrument MiSeqDx za MOS v4 (broj dokumenta 1000000157953)*.

Priprema za sekvenciranje na sustavu NovaSeq 6000Dx

Slijedite ove upute za denaturiranje i razrjeđivanje biblioteka za sekvenciranje na sustavu za sekvenciranje NovaSeq 6000Dx.

Potrošni materijal

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (pufer za resuspendiranje)
- 1N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- epruveta za biblioteke NovaSeq 6000Dx

Priprema

Pripremite *svježu* otopinu od 0,2N NaOH da biste denaturirali biblioteke za sekvenciranje. Da biste spriječili da male pogreške pri pipetiranju utječu na konačnu koncentraciju NaOH, priprema se veći volumen.



OPREZ

Svježe razrijeđen 0,2N NaOH ključan je za postupak denaturiranja. Nepravilno denaturiranje može smanjiti prinos.

1. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugiranje da biste razrijedili 1N NaOH na 0,2N NaOH:

Tablica 4 Način rada S2

Reagens	Volumen za jedan protočni članak (µl)	Volumen za dva protočna članka (µl)
Voda laboratorijske kvalitete	40	80
Pripremite 1N NaOH	10	20

Ti volumeni daju 50 µl 0,2N NaOH za jedan protočni članak ili 100 µl 0,2N NaOH za dva protočna članka.

Tablica 5 Način rada S4

reagens	Volumen za jedan protočni članak (µl)	Volumen za dva protočna članka (µl)
Voda laboratorijske kvalitete	80	160
Pripremite 1N NaOH	20	40

Ti volumeni daju 100 µl 0,2N NaOH za jedan protočni članak ili 200 µl 0,2N NaOH za dva protočna članka.

2. Preokrenite nekoliko puta da biste promiješali ili temeljito promiješajte na vrtložnoj miješalici.

NAPOMENA Epruveta mora biti začepljena. Upotrijebite svježu otopinu unutar **12 sati**.

Stvaranje normaliziranog skupa biblioteka

Koncentracije za umetanje mogu se razlikovati ovisno o pripremi biblioteka, kvantifikaciji i metodama normalizacije.

S pomoću sljedećih uputa normalizirajte biblioteke do odgovarajuće koncentracije, a zatim od njih stvorite skupove. Biblioteke sekvencirane na istom protočnom članku moraju se kombinirati u jedan normalizirani skup.

NAPOMENA Maksimalan broj uzoraka koje je moguće obraditi po stazi s pomoću kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest 192. Razlog je tog ograničenja ukupan broj UD indeksa u skupu A i B.

Normaliziranje biblioteka radi stvaranja skupova

1. Odredite potrebnu koncentraciju skupljene biblioteka na temelju željene konačne koncentracije za umetanje.
 - Za konačnu koncentraciju za umetanje od 350 pM potrebna je koncentracija skupljene biblioteka od 1,75 nM.
 - Da biste odredili koncentraciju skupljene biblioteka za drugačiju konačnu koncentraciju za umetanje, pogledajte odjeljak [Razrjeđivanje biblioteka na početnu koncentraciju na stranici 46](#).
2. Normalizirajte biblioteke do željene koncentracije skupljene biblioteka s pomoću 10 mM reagensa Tris-HCl, pH 8,5.

Ako trebate pomoć u razrjeđivanju biblioteka na odgovarajuće koncentracije, potražite [Kalkulator za stvaranje skupova](#) na web-mjestu tvrtke Illumina.

Preporučene koncentracije za umetanje

Optimalna koncentracija DNA za umetanje ovisi o vrsti biblioteka i veličini umetka. Za biblioteke > 450 bp možda će biti nužne veće koncentracije za umetanje.

Stvaranje skupova normaliziranih biblioteka i dodavanje neobavezne kontrole PhiX

- Kombinirajte odgovarajući volumen svake normalizirane biblioteke u novoj epruveti za mikrocentrifugiranje da biste dobili jedan od sljedećih finalnih volumena:

Način rada	Finalni volumen (µl)
S2	150
S4	310

- [Neobavezno]** Na sljedeći način pripremite kontrolni (spike-in) 1-postotni nedenaturirani PhiX>.
 - Razrijedite 10 nM PhiX-a na 2,5 nM s pomoću 10 mM reagensa Tris-HCl, pH 8,5.
 - Dodajte odgovarajući volumen nedenaturiranog 2,5 nM PhiX-a u epruvetu nedenaturiranog skupa biblioteka.

Način rada	Nedenaturirani 2,5 nM PhiX (µl)	Nedenaturirani skup biblioteka (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Pri pripremi kontrolnog PhiX-a, 1 % je preporučena količina za dobro uravnotežene biblioteke. Biblioteke niske razine različitosti mogu zahtijevati više. Da biste upotrijebili kontrolu PhiX s bibliotekama niske razine različitosti, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina radi savjeta.

Denaturiranje skupova biblioteka i neobavezna PhiX kontrola

- Na sljedeći način dodajte 0,2N NaOH u epruvetu s nedenaturiranim kupom biblioteka i neobaveznim PhiX-om.

Protočni članak	0,2N NaOH	Nedenaturiran skup biblioteka (µl)	Dobiveni volumen
S2	37	150	187 µl ili 187,9 µl s PhiX-om
S4	77	310	387 µl ili 388,9 µl s PhiX-om

- Začepite i kratko promiješajte na vrtložnoj miješalici.
- Centrifugirajte na 280 × g najviše 1 minutu.
- Inkubirajte na sobnoj temperaturi 8 minuta da biste denaturirali.
- Na sljedeći način dodajte 400 mM reagens Tris-HCl, pH 8,0 da biste neutralizirali.

Način rada	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Dobiveni volumen
S2	38	225 µl ili 225,9 µl s PhiX-om
S4	78	465 µl ili 466,9 µl s PhiX-om

- Začepite i kratko promiješajte na vrtložnoj miješalici.

7. Centrifugirajte na $280 \times g$ najviše 1 minutu.
8. Prenesite cijeli volumen denaturirane biblioteke ili denaturirane biblioteke i PhiX-a u epruvetu za biblioteke na sustavu NovaSeq 6000Dx.
9. Prijedite na sekvenciranje. Upute potražite u *Dokumentaciji proizvoda za instrument NovaSeq 6000Dx (broj dokumenta 200010105)*.

Otklanjanje poteškoća

S pomoću sljedeće tablice otklanjajte poteškoće u tijeku rada. Ako obrada sekvenciranjem ili priprema biblioteke za uzorak dvaput ne uspije, možda će biti potrebno dodatno uklanjanje poteškoća. Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina.

Opazanje	Mogući uzrok	Preporučeno djelovanje
Obrada sekvenciranjem ne prolazi specifikacije kontrole kvalitete	Korisnička pogreška ili kvar laboratorijske opreme u tijeku analize	<p>Kvalificirajte obogaćene biblioteke da biste osigurali odgovarajući prinos biblioteka i raspodjelu veličina fragmenata. Ponovite pripremu biblioteka od jednog od sljedećih koraka, ovisno o tome kad se dogodila pretpostavljena pogreška u upotrebi ili kvar laboratorijske opreme. Ako to nije poznato ili su se dogodile druge pogreške, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina i zatražite otklanjanje poteškoća u obradi.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ponovno sekvencirajte biblioteke. Pogledajte Priprema za sekvenciranje na sustavu NextSeq 550Dx na stranici 48, Priprema za sekvenciranje na sustavu MiSeqDx na stranici 49 ili Priprema za sekvenciranje na sustavu NovaSeq 6000Dx na stranici 51. • Ponovno obogatite biblioteke. Pogledajte Hibridizacija sondi na stranici 36. • Pokrenite pripremu biblioteka od početka tijeka rada. Pogledajte Upute za upotrebu na stranici 20.
	Problem s instrumentom	Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina.
Pogreška pri generiranju FASTQ-a ili općenita pogreška sustava za sekvenciranje (npr. mrežna pogreška, pogreške pri umetanju/vađenju reagensa itd.)	Problem sa softverom ili instrumentom	<p>Pomoć s generiranjem FASTQ-a potražite u odjeljku <i>Vodič za softver Local Run Manager (broj dokumenta 100000002702)</i> ili pak pogledajte <i>Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta 1000000009513)</i>, <i>Referentni vodič za instrument MiSeqDx za MOS v4 (broj dokumenta 1000000157953)</i> ili <i>Dokumentacija proizvoda za instrument NovaSeq 6000Dx (broj dokumenta 200010105)</i>.</p> <p>Zatražite dodatnu pomoć od službe za tehničku podršku tvrtke Illumina.</p>

Opažanje	Mogući uzrok	Preporučeno djelovanje
DNA biblioteka ne generira dovoljan prinos za sekvenciranje	Nisu zadovoljeni zahtjevi za ulazni uzorak	Osigurajte odgovarajući ulazni uzorak i ponovite pripremu biblioteke. Pogledajte Preporuke za ulazne uzorke na stranici 17 .
	Pogreška u upotrebi ili kvar opreme u tijeku analize	<p>Ponovite pripremu biblioteka od jednog od sljedećih koraka, ovisno o tome kad se dogodila pretpostavljena pogreška u upotrebi ili kvar laboratorijske opreme. Ako to nije poznato ili su se dogodile druge pogreške, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina i zatražite otklanjanje poteškoća u obradi.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ponovno sekvencirajte biblioteke. Pogledajte Priprema za sekvenciranje na sustavu NextSeq 550Dx na stranici 48, Priprema za sekvenciranje na sustavu MiSeqDx na stranici 49 ili Priprema za sekvenciranje na sustavu NovaSeq 6000Dx na stranici 51. • Ponovno obogatite biblioteke. Pogledajte Hibridizacija sondi na stranici 36. • Pokrenite pripremu biblioteka od početka tijeka rada. Pogledajte Upute za upotrebu na stranici 20.
	Zahtjevi za panel sa sondama za obogaćivanje nisu zadovoljeni	Osigurajte odgovarajući panel sa sondama za obogaćivanje i ponovite pripremu biblioteke. Pogledajte odjeljak Zahtjevi za panele sa sondama za obogaćivanje na stranici 9 .

Karakteristike radnih svojstava

Karakteristike radnih svojstava aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za sustav NovaSeq 6000Dx navedene su u *Informativnom pregledu za instrument NovaSeq 6000Dx (broj dokumenta 200025276)*.

Radna svojstva s panelima cijelih egzoma

Radna svojstva panela za egzom testirana su uz korištenje najmanje (50 ng) i najveće (1000 ng) preporučene ulazne količine Coriell Cell Line gDNA NA12878, uz poznatu vrijednost postavljenu za prepoznavanje varijanti spolnih stanica (Coriell platinum genome). Panel za egzom 1 (45 Mb) i panel za egzom 2 (36,8 Mb) upotrijebljeni su kao reprezentativni paneli. Testirana su 24 tehnička replikata analizom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s pomoću panela za egzom 1 (45 Mb) u dvjema 12-erostrukim reakcijama obogaćivanja. Testirano je 12

tehničkih replikata analizom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s pomoću panela za egzom 2 (36,8 Mb) u jednoj 12-erostrukoj reakciji obogaćivanja. Obogaćene biblioteke sekvencirane su na sustavu za sekvenciranje NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

U sljedećoj tablici prikazane su srednje vrijednosti sekundarnog sekvenciranja i mjerni rezultati radnih svojstava određivanja varijanti za tehničke replikate testirane sa svakim panelom.

Tablica 6 Radna svojstva analize s dva panela za cijeli egzom

Panel	Obogaćivanje obrađenog jedinstvenog očitavanja	Uniformnost pokrivenosti	Medijan dužine fragmenta	Odziv SNV-a ¹	Preciznost SNV-a ²	Odziv indela ¹	Preciznost indela ²
Panel za egzom 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Panel za egzom 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹ Odziv = pozitivni rezultati / (pravi pozitivni rezultati + lažni negativni rezultati)

² Preciznost = pravi pozitivni rezultati / (pravi pozitivni rezultati + lažni pozitivni rezultati)

Granica prepoznavanja

Za testiranje granice prepoznavanja korišten je referentni standard Horizon HD799 DNA. HD799 čini umjereno kompromitiran DNA tretiran formalinom s poznatim SNV-ovima u alelnim frekvencijama u rasponu od 1 do 24,5 %. Upotrijebljena je najmanja preporučena količina ulazne DNA (50 ng) te je određena razina prepoznavanja SNV-a uz frekvenciju varijantnih alela (variant allele frequency, VAF) $\geq 5,0$ %. Testirano je 16 tehničkih replikata analizom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s pomoću tijeka rada s FFPE-om, obogaćenih svekarcinomnim panelom za obogaćivanje (1,94 Mb) u 16 (jednostrukih) obogaćivanja, a zatim su oni sekvencirani na instrumentu NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Svi su uzorci zadovoljili zahtjeve za radnim svojstvima uzorka specifičnim za panel, kao što je prikazano u tablici u nastavku.

Tablica 7 Radna svojstva uzorka za granicu prepoznavanja

Panel	Broj prepoznavanja varijanti SNV-ova od $\geq 5,0$ % VAF	Prosječna uniformnost pokrivenosti
Svekarcinomni panel za obogaćivanje (1,94 Mb, 523 gena)	100 %	99 %

Ometajuće tvari

Utjecaj potencijalnih interferenata procijenjen je u sustavu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx procjenom radnih svojstava analize u prisutnosti utjecajnih tvari.

Utjecaji u punoj krvi

Acetaminofen (egzogeni spoj, lijek), kreatinin i trigliceridi (endogeni metaboliti) testirani su tako da ih se dodavalo u uzorke pune humane krvi prije izdvajanja DNA. Da bi se procijenio utjecaj nastao pri uzimanju krvi (premali volumen), u uzorke pune krvi dodan je i EDTA. Uz to, da bi se procijenio utjecaj pripreme uzoraka, u DNA izdvojenu iz pune krvi dodan je etanol za primjenu u molekularnoj biologiji.

Sljedeća tablica donosi testne koncentracije po interferentu.

Tablica 8 Tvari i koncentracije s potencijalnim utjecajem testirane u punoj krvi

Testna tvar	Testna koncentracija
Acetaminofen	15,6 mg/dL* Trostruka najveća koncentracija očekivana nakon terapijske doze lijeka.
Kreatinin	15 mg/dL* Najveća zabilježena koncentracija u populaciji.
Trigliceridi	1,5 g/dL* Najveća zabilježena koncentracija u populaciji.
EDTA	6 mg/mL Tri puta veća koncentracija od očekivane u krvi, prikupljena u EDTA epruvete.
Etanol za primjenu u molekularnoj biologiji	15 % v/v U eluatu nakon izdvajanja DNA.

* Kao što navodi CLSI EP37-ED1:2018

Testirano je 12 tehničkih replikata po utjecajnoj tvari analizom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, obogaćenih panelom za egzom 1 (45 Mb) u jednom (12-strukom) obogaćivanju, a zatim sekvenciranih na instrumentu NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Za testirane tvari svih 12 uzoraka zadovoljilo je preduvjete radnih svojstava uzoraka i nije primijećen utjecaj na radna svojstva analize.

Interferencija u FFPE tkivu

Testirana su dva kolorektalna FFPE uzorka u prisutnosti i odsutnosti hemoglobina pri 0,1 mg na 10 µm FFPE prereza koji predstavljaju najgori scenarij 50-postotne kontaminacije FFPE uzorka tkiva krvlju s visokom razinom hemoglobina. Primjerci su testirani analizom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s pomoću svekarinomnog panela za obogaćivanje 1 (1,94 Mb) kao reprezentativnog panela za jednostruka obogaćivanja. Obogaćene

biblioteke zatim su sekvencirane na instrumentu NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx. Svi su primjerci zadovoljili preduvjete učinkovitosti uzorka te je dokazano da hemoglobin ne utječe na radna svojstva analize.

Da bi se procijenila interferencija uslijed pripreme uzorka, dva egzogena spoja dodana su u DNA izdvojenu iz FFPE uzorka tkiva karcinoma mjehura. Testirane egzogene tvari otopine su za izdvajanje koje se često koriste tijekom postupka izdvajanja DNA te su s testiranim količinama navedene u sljedećoj tablici.

Otopine testnih tvari komercijalno su dostupne u kompletima za izolaciju DNA utemeljenu na kolonama.

Tablica 9 Potencijalno interferirajuće egzogene tvari i koncentracije testirane u FFPE-u

Testna tvar	Testna koncentracija (µl / 30 µl eluata)
Otopina za deparafinizaciju	113 x 10 ⁻⁶
Wash Buffer AW2	0,417

S pomoću analize Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testirano je osam tehničkih replikata po interferirajućoj tvari, obogaćenih sa svekarcinomnim panelom za obogaćivanje (1,94 Mb) u jednostrukim obogaćenjima, a zatim sekvenciranim na instrumentu NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Za obje testirane tvari svih je osam uzoraka zadovoljilo učinkovitost uzorka i nisu primijećeni utjecaji na radna svojstva analize.

Međusobna kontaminacija

Testirani su Coriell Cell Line gDNA NA12878 (ženski, 10 uzoraka), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (muški, 12 uzoraka) i kontrole bez predložaka (NTC, 2 uzorka) analizom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx u rasporedu pločice „checkerboard”. Kod svih uzoraka korištena je najveća preporučena ulazna količina gDNA (1000 ng) kao najstroži uvjet za procjenjivanje međusobne kontaminacije uzorka. Dva različita rukovatelja dvaput su izvela testiranje. U 12-strukim reakcijama obogaćivanja korišten je panel za egzom 1 (45 Mb). Obogaćene biblioteke sekvencirane su na sustavu NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx. Ocjenjivanje je provedeno procjenom pokrivenosti kromosoma Y specifičnog za muške uzorke u ženskim uzorcima, i to usporedbom s pozadinskim razinama pune pločice ženskih uzoraka kao i reprezentacije indeksa u NTC uzorcima.

Tablica 10 Rezultati međusobne kontaminacije

Ženski uzorci s pokrivenosti muškim kromosomom Y u < 3x šuma na osnovnoj razini	Reprezentacija indeksa u NTC-u
100 %	< 0,0005 %

Dodatak: Sekvence indeksnih adaptera Illumina UD

Ti su jedinstveni dvostruki (UD) indeksni adapteri tako raspoređeni na pločici da olakšavaju primjenu preporučene strategije uparivanja. Indeksni adapteri dugi su 10 baza umjesto uobičajenih 8 baza.

Index 1 (i7) Adapters

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (i5) Adapters

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Sljedeća sekvenca koristi se za skraćivanje adaptera za očitavanja Read 1 i Read 2.

CTGTCTCTTATACACATCT

Plate A/Set 1 Index Adapters

Naziv indeksa	i7 baze u adapteru	i5 baze u adapteru
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

Naziv indeksa	i7 baze u adapteru	i5 baze u adapteru
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA

Naziv indeksa	i7 baze u adapteru	i5 baze u adapteru
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTGCGGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATAACCAGA	CGTTGCTTAC

Naziv indeksa	i7 baze u adapteru	i5 baze u adapteru
UDP0078	CGCACTAATG	TGACTACATA
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGGT	CTCATAGCGA
UDP0083	GTAAGGCATA	AGACACATTA
UDP0084	GTCCACTTGT	GCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	CATGAGTACT
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	CATGTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGAAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Plate B/Set 2 Index Adapters

Naziv indeksa	i7 baze u adapteru	i5 baze u adapteru
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG

Naziv indeksa	i7 baze u adapteru	i5 baze u adapteru
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA

Naziv indeksa	i7 baze u adapteru	i5 baze u adapteru
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT

Naziv indeksa	i7 baze u adapteru	i5 baze u adapteru
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGTAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Povijest revizija

Dokument	Datum	Opis promjene
Broj dokumenta 200019584 v02	rujan 2022.	Dodani sadržaji radi podrške sekvenciranja na instrumentu NovaSeq 6000Dx.
Broj dokumenta 200019584 v01	svibanj 2022.	Dodani nazivi i kataloški brojevi sustava za sekvenciranje. Uklonjena informacija o jedinstvenom dvostrukom indeksiranju za jednostruko indeksirane biblioteke.
Broj dokumenta 200019584 v00	svibanj 2022.	Početno izdanje.

Patenti i žigovi

Ovaj dokument i njegov sadržaj vlasništvo su tvrtke Illumina, Inc. i njezinih povezanih društava („Illumina“) te su namijenjeni isključivo za ugovornu upotrebu klijentima u vezi s proizvodima opisanim u njemu. Dokument i njegov sadržaj ne smiju se upotrebljavati ni distribuirati ni u koju drugu svrhu niti se smiju na neki drugi način prenositi, otkrivati ili reproducirati bez prethodnog pisanog odobrenja tvrtke Illumina. Illumina ovim dokumentom ne prenosi nikakve licence zaštićene svojim pravom na patent, žig, autorskim pravom ili običajnim pravom ni slična prava bilo koje treće strane.

Kvalificirano i odgovarajuće obučeno osoblje mora se strogo i bez iznimki pridržavati uputa u ovom dokumentu da bi se zajamčila pravilna i sigurna upotreba proizvoda opisanih u njemu. Prije upotrebe proizvoda nužno je s razumijevanjem pročitati cjelokupan sadržaj dokumenta.

AKO UPUTE U DOKUMENTU NE PROČITATE U CIJELOSTI TE IH SE NE PRIDRŽAVATE BEZ IZNIMKI, MOŽE DOĆI DO OŠTEĆENJA PROIZVODA, OZLJEDA KORISNIKA ILI DRUGIH OSOBA I DO OŠTEĆENJA DRUGE IMOVINE TE SE TIME PONIŠTAVAJU SVA JAMSTVA ZA PROIZVODE.

ILLUMINA NE PREUZIMA ODGOVORNOST ZA ŠTETE NASTALE USLIJED NEPRAVILNE UPOTREBE PROIZVODA KOJI SU OPISANI U OVOM DOKUMENTU (UKLJUČUJUĆI DIJELOVE TIH PROIZVODA I SOFTVER).

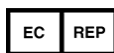
© 2022. Illumina, Inc. Sva prava pridržana.

Svi su žigovi vlasništvo tvrtke Illumina, Inc. ili svojih vlasnika. Konkretno informacije o žigovima potražite na adresi www.illumina.com/company/legal.html.

Podaci za kontakt



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 SAD
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (izvan Sjeverne Amerike)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

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

Oznaka proizvoda

Sveobuhvatno objašnjenje simbola koji se pojavljuju na pakiranju i naljepnicama proizvoda potražite u legendi simbola na web-mjestu support.illumina.com na kartici *Dokumentacija* za vaš komplet.