

A SE UTILIZA LA DIAGNOSTICAREA IN VITRO  
NUMAI PENTRU EXPORT

## Utilizarea preconizată

Kitul Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx este un set de reactivi și de consumabile utilizate pentru a pregăti biblioteci de probe din ADN genomic derivat din țesut uman și din celule umane. Panelurile de probe furnizate sunt necesare pentru prepararea bibliotecilor care vizează anumite regiuni genomice de interes. Bibliotecile de probe generate vor fi utilizate pe sistemele de secvențiere Illumina.

## Principiile procedurii

Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este destinat preparării de biblioteci de ADN pentru secvențiere, îmbogățite pentru regiuni țintă din ADN genomic derivat din celule și țesuturi umane.

Paneluri de oligonucleotide biotinate sunt necesare pentru îmbogățirea țintă. Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu o gamă largă de mărimi ale panelurilor, inclusiv paneluri mici (< 20.000 de probe) până la paneluri mari (> 200.000 de probe). Bibliotecile îmbogățite generate vor fi utilizate pentru secvențiere pe sistemele de secvențiere Illumina.

Procedura pentru kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx constă din următoarele etape:

- **Fragmentarea de ADN genomic**—Utilizează Enrichment BLT Small (eBLTS) pentru a fragmenta intrarea de ADN. În timpul acestei etape, ADN-ul este fragmentat și etichetat cu adaptoare într-o singură etapă. O intrare minimă de ADN de 50 ng este necesară pentru a satura eBLTS în reacția de fragmentare. Atunci când este saturată, eBLTS fragmentează un număr setat de molecule ADN pentru a genera biblioteci normalizate, cu o distribuție constantă a mărimii fragmentelor.
- **Curățarea post-fragmentare**—Curăță ADN-ul etichetat de adaptor de pe eBLTS, pentru a fi utilizat în amplificare.
- **Amplificarea ADN fragmentat**—Amplifică ADN-ul fragmentat utilizând un program PCR cu cicluri limitate. Indexuri unice duale (UD) vor fi adăugate la capetele fragmentelor de ADN, care permit codarea cu coduri de bare unice duale a bibliotecilor de ADN și generarea de clustere în timpul secvențierii.
- **Curățarea bibliotecilor (Clean Up Libraries)**—Utilizează o procedură de purificare cu bile, pentru a purifica și a alege dimensiunea bibliotecilor de ADN amplificat.
- **Biblioteci grupate (Pool Libraries)**—Combină bibliotecile de ADN cu indexuri unice într-un singur cluster de până la 12 biblioteci. Puteți grupa bibliotecile în funcție de volum sau masă.
- **Hibridizarea probelor (Hybridize Probes)**—Constă într-o reacție de hibridizare, în timpul căreia bibliotecile de ADN dublu-catenar sunt denaturate și un panel de probe ADN biotinate este hibridizat în regiunile genomice țintă.

- Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu multiple tipuri de paneluri. Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu include un panel de îmbogățire. Panelurile de probe vor fi obținute de utilizator și trebuie să îndeplinească specificațiile impuse. Reactivii din kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sunt compatibili cu paneluri de oligonucleotide ADN de îmbogățire atât ale Illumina, cât și ale terților, care îndeplinesc specificațiile impuse. Pentru informații cu privire la specificațiile necesare privind panelurile de la terți, consultați [Cerințe pentru panelul de îmbogățire a probelor la pagina 10](#).
- **Captura probelor hibridizate**—Utilizează bile magnetice Streptavidin (Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)) pentru a captura probele hibridizate în regiunile țintă de interes.
- **Amplificarea bibliotecilor îmbogățite (Amplify Enriched Libraries)**—Utilizează PCR pentru a amplifica bibliotecile îmbogățite.
- **Curățarea bibliotecilor îmbogățite (Clean Up Amplified Enriched Libraries)**—Utilizează o procedură de purificare cu bile pentru a purifica bibliotecile îmbogățite pregătite pentru secvențiere.
- **Secvențiere**—Secvențierea bibliotecilor îmbogățite este efectuată pe sistemele de secvențiere MiSeqDx, NextSeq 550Dx sau NovaSeq 6000Dx. Pentru MiSeqDx and NextSeq 550Dx, modulul integrat DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager este utilizat pentru configurarea secvențierii, pentru monitorizarea rulării și pentru analiza primară (generarea FASTQ din nucleotide de bază). Pentru NovaSeq 6000Dx, DRAGEN pentru Aplicația Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este utilizat pentru configurarea rulării și analiza secundară cu mai multe fluxuri de lucru disponibile.

## Limitări ale procedurii

- A se utiliza la diagnosticarea *in vitro*.
- Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu ADN genomic derivat din celule și țesuturi umane.
- Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu intrări de gADN dublu-catenar de 50–1000 ng. Performanța nu este garantată pentru intrările care nu se încadrează în aceste limite.
- Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu include reactivi pentru extracția ADN. Rezultatele testelor analitice, inclusiv ale testelor de interferențe, furnizate în [Caracteristici de performanță la pagina 57](#) au fost obținute cu sânge integral și FFPE ca tipuri reprezentative de probe, cu kituri reprezentative de extracție a ADN-ului. Toate testele diagnostice dezvoltate pentru a fi utilizate cu reactivii din kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx necesită o validare completă a tuturor aspectelor de performanță cu kitul de extracție ADN ales.
- Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu este recomandat pentru probele FFPE de slabă calitate cu  $\Delta Cq > 5$ . Utilizarea probelor cu  $\Delta Cq > 5$  ar putea crește șansele de eșuare a pregătirii bibliotecii și ar putea scădea performanța testului.
- Reactivii din kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx au fost configurați și testați pentru intrările de probe, reacțiile de îmbogățire și plexitatea indicate în tabelul următor.

| Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx | Proba introdusă                         | Reacții de îmbogățire | Plexitate de îmbogățire |
|--|---|-----------------------|-------------------------|
| Kit pentru 16 probe                        | Calitate slabă (FFPE)                   | 16 reacții            | 1 plex                  |
| Kit pentru 96 de probe                     | Calitate înaltă (de ex. sânge integral) | 8 reacții             | 12 plexuri              |

- Procesarea intrărilor FFPE a fost testată și este recomandată exclusiv pentru reacțiile de îmbogățire cu 1 plex, prin utilizarea kitului cu 16 probe.
- Pentru kitul cu 96 de probe, plexități nonstandard (2 plexuri, până la 11 plexuri) sunt posibile, dar au următoarele limitări:
  - Procesarea de probe în reacții de îmbogățire în 2 plexuri până la 11 plexuri reduce productivitatea kitului.
  - Nu sunt garantate rezultate optime. Obținerea unui randament adecvat al îmbogățirii pentru plexități nonstandard poate necesita o optimizare adițională.
  - Pentru strategii de grupare cu plexități joase (2 până la 8 plexuri), este necesară selectarea de adaptoare index cu diverse secvențe, pentru a optimiza echilibrul de culori pentru o secvențiere și o analiză a datelor de succes. Modulul DNA GenerateFASTQ Dx pe MiSeqDx și NextSeq 550Dx asigură opțiuni pentru combinații index echilibrate cromatic pe parcursul ciclului de rulare. Pentru mai multe informații privind strategiile de grupare, consultați [Metode de grupare la pagina 33](#).
- Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este limitat la livrarea de biblioteci îmbogățite care sunt secvențiate doar pe MiSeqDx, NextSeq 550Dx și NovaSeq 6000Dx. Utilizarea altor sisteme de secvențiere necesită o validare completă a tuturor aspectelor de performanță.
- Panelurile de îmbogățire nu sunt incluse în acest produs. Rezultatele testelor analitice furnizate în [Caracteristici de performanță la pagina 57](#) au fost obținute cu paneluri de îmbogățire reprezentative și sunt furnizate doar în scop informativ. Caracteristicile performanțelor analitice servesc pentru a exemplifica performanțele generale ale testului, însă nu definesc performanțele sau conformitatea unei anumite caracteristici a testului. Toate testele diagnostice dezvoltate pentru a fi utilizate cu acești reactivi necesită o validare completă a tuturor aspectelor de performanță.
- Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu paneluri de îmbogățire atât de la Illumina, cât și de la terți. Cu toate acestea, nu este garantată performanța pentru paneluri de îmbogățire furnizate de terți care nu îndeplinesc cerințele pentru paneluri. Pentru informații privind cerințele pentru paneluri, consultați [Cerințe pentru panelul de îmbogățire a probelor la pagina 10](#).
- Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx necesită o perioadă de hibridizare de 2 ore. Utilizarea unei perioade mai lungi de hibridizare poate afecta parametrii de performanță.
- Modulele DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager pentru MiSeqDx și NextSeq 550Dx generează numai fișiere FASTQ. Dacă utilizați aceste module, este obligatoriu să efectuați validarea analizei secundare.

- DRAGEN pentru Aplicația Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este disponibil pe NovaSeq 6000Dx. Aplicația acceptă mai multe fluxuri de lucru de analiză secundară, inclusiv generarea FASTQ, generarea FASTQ și VCF pentru detectarea variantelor germinale și generarea FASTQ și VCF pentru detectarea variantelor somatice. Dacă utilizați aplicația pentru generarea VCF, nu este necesar să efectuați validarea analizei secundare.
- În legătură cu limitările DRAGEN pentru Aplicația Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, atunci când este utilizată cu NovaSeq 6000Dx, consultați *Broșura instrumentului NovaSeq 6000Dx (nr. document 200025276)*.

## Componentele produsului

Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx cuprinde următoarele componente.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx cu indexuri UD din Setul A, nr. de catalog 20051354 (16 probe) sau nr. de catalog 20051352 (96 probe)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx cu indexuri UD din Setul B, nr. de catalog 20051355 (16 probe) sau nr. de catalog 20051353 (96 probe)
- Modulul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx pentru NextSeq 550Dx nr. de catalog 20063024
- Modulul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx pentru MiSeqDx, nr. de catalog 20063022
- DRAGEN pentru Aplicația Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pentru NovaSeq 6000Dx, nr. de catalog 20074609

## Reactivi furnizați

Completarea Illumina DNA Prep with Enrichment Dx necesită Illumina DNA Prep with Enrichment Dx cu Setul A de indexuri UD sau Illumina DNA Prep with Enrichment Dx cu Setul B de indexuri UD. Puteți efectua următoarele reacții de pregătire a bibliotecilor și îmbogățire utilizând kiturile de 16 probe sau 96 de probe.

| <b>Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx</b> | <b>Proba introdusă</b>                  | <b>Reacții de îmbogățire</b> | <b>Plexitate de îmbogățire</b> |
|---|---|------------------------------|--------------------------------|
| Kit pentru 16 probe                               | Calitate slabă (FFPE)                   | 16 reacții                   | 1 plex                         |
| Kit pentru 96 de probe                            | Calitate înaltă (de ex. sânge integral) | 8 reacții                    | 12 plexuri                     |

## Illumina DNA Prep with Enrichment Dx cu indexuri UD Set A/B

### Reactivi de fragmentare Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, a se depozita la temperaturi cuprinse între 15°C și 30°C

Următorii reactivi sunt expediați la temperatura camerei. Depozitați cât mai curând reactivii la temperatura indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare.

| Nume reactiv  | Cantitate eprubete         |                               | Culoare capac | Volum de umplere | Ingrediente active   |
|---|----------------------------|-------------------------------|---------------|------------------|--|
|   | 16 probe<br>(Nr. 20050020) | 96 de probe<br>(Nr. 20050025) |               |                  |  |
| Tampon de oprire a fragmentării (Stop Tagment Buffer 2 (ST2))   | 1                          | 4                             | Roșu          | 350 μl           | Soluție detergent în apă.                                      |
| Tampon de spălare a fragmentării (Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)) | 1                          | 1                             | Verde         | 41 ml            | Soluție apoasă tamponată care conține detergent și sare.       |
| Bile de curățare (Cleanup Beads (CB))                           | 1                          | Nu se aplică*                 | Roșu          | 10 ml            | Bile paramagnetice în fază solidă în soluție apoasă tamponată. |

\* În Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (Nr. 20050030) sunt incluse bile de curățare pentru 96 de probe.

### Bile de curățare Illumina Prep Dx (96 de probe), a se depozita la temperaturi cuprinse între 15°C și 30°C

Pentru kiturile cu 96 de probe, bilele de curățare sunt incluse în Illumina Prep Dx Cleanup Beads (nr. de catalog 20050030). Următorul reactiv este expediat la temperatura camerei. Depozitați cât mai curând reactivii la temperatura indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare. Pentru kiturile cu 16 probe, bilele de curățare sunt incluse în pachetul cu reactivii de fragmentare Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (nr. de catalog 20050020).

| Nume reactiv                          | Cantitate | Culoare capac | Volum de umplere | Ingrediente active   |
|---------------------------------------|-----------|---------------|------------------|--|
| Bile de curățare (Cleanup Beads (CB)) | 4         | Roșu          | 10 ml            | Bile paramagnetice în fază solidă în soluție apoasă tamponată. |

## Reactivii de fragmentare Illumina ADN Prep Dx Tagmentation Reagents 2 se vor depozita la temperaturi cuprinse între 2°C și 8°C

Următorii reactivi vor fi livrați refrigerați. Depozitați cât mai curând reactivii la temperatura indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare. Depozitați eprubeta eBLTS în poziție verticală astfel încât bilele să fie mereu imersate în soluția tampon.

| Nume reactiv  | Cantitate eprubete         |                               | Culoare capac | Volum de umplere |             | Ingrediente active  |
|---|----------------------------|-------------------------------|---------------|------------------|-------------|---|
|   | 16 probe<br>(Nr. 20050021) | 96 de probe<br>(Nr. 20050026) |               | 16 probe         | 96 de probe |   |
| Enrichment BLT Small (EBLTS)                              | 1                          | 4                             | Galben        | 200 µl           | 290 µl      | Bile magnetice Streptavidin conectate cu transpozomi în soluție apoasă tamponată care conține glicerol, EDTA, ditiotritol, săruri și detergent. |
| Soluție tampon de resuspensie (Resuspension Buffer (RSB)) | 1                          | 4                             | Transparent   | 1,8 ml           | 1,8 ml      | Soluție apoasă tamponată.   |

## Reactivi de fragmentare Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, a se depozita la temperaturi cuprinse între -25°C și -15°C

Următorii reactivi vor fi livrați congelați. Depozitați cât mai curând reactivii la temperatura indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare.

| Nume reactiv  | Cantitate eprubete         |                               | Culoare capac | Volum de umplere |             | Ingrediente active  |
|---|----------------------------|-------------------------------|---------------|------------------|-------------|---|
|   | 16 probe<br>(nr. 20050022) | 96 de probe<br>(nr. 20050027) |               | 16 probe         | 96 de probe |   |
| Tampon de fragmentare 1 (Tagmentation Buffer 1 (TB1)) | 1                          | 4                             | Transparent   | 290 µl           | 290 µl      | Soluție apoasă tamponată care conține sare de magneziu și dimetilformamidă. |

| Nume reactiv                                     | Cantitate eprubete         |                               | Culoare capac | Volum de umplere |             | Ingrediente active                                      |
|--|----------------------------|-------------------------------|---------------|------------------|-------------|---|
|  | 16 probe<br>(nr. 20050022) | 96 de probe<br>(nr. 20050027) |               | 16 probe         | 96 de probe |   |
| Amestec PCR îmbunătățit (Enhanced PCR Mix (EPM)) | 2                          | 4                             | Transparent   | 200 μl           | 610 μl      | Polimerază ADN și dNTP-uri în soluție apoasă tamponată. |

### Reactivi de îmbogățire Illumina DNA Prep Dx 1 (16 probe), a se depozita la temperaturi cuprinse între 2°C și 8°C

Pentru kiturile cu 16 probe, următorii reactivi sunt incluși în Reactivi de îmbogățire Illumina DNA Prep Dx 1 (nr. de catalog 20050023). Pentru kiturile cu 96 de probe, reactivii sunt incluși în Reactivi de îmbogățire Illumina Prep Dx 1 (nr. de catalog 20050028).

Următorii reactivi vor fi livrați refrigerați. Depozitați cât mai curând reactivii la temperatura indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare.

| Nume reactiv   | Cantitate eprubete | Culoare capac | Volum de umplere | Ingrediente active  |
|--|--------------------|---------------|------------------|---|
| Bile magnetice Streptavidin (Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)) | 4                  | Transparent   | 1,2 ml           | Bile magnetice Streptavidin în soluție apoasă tamponată conținând formamidă, detergent și sare. |
| Soluție tampon de resuspensie (Resuspension Buffer (RSB))        | 1                  | Transparent   | 1,8 ml           | Soluție apoasă tamponată  |
| Tampon de îmbogățire Hyb 2 (EHB2)                                | 1                  | Transparent   | 200 μl           | Soluție apoasă tamponată care conține detergent și sare.  |
| Tampon de eluare țintă 2 (ET2)                                   | 1                  | Transparent   | 200 μl           | Soluție apoasă tamponată  |

### Reactivi de îmbogățire Illumina Prep Dx 1 (96 de probe), a se depozita la temperaturi cuprinse între 2°C și 8°C

Pentru kiturile cu 96 de probe, următorii reactivi sunt incluși în Reactivi de îmbogățire Illumina Prep Dx 1 (nr. de catalog 20050028). Pentru kiturile cu 16 de probe, reactivii sunt incluși în Reactivi de îmbogățire IlluminaDNA Prep Dx 1 (nr. de catalog 20050023).

Următorii reactivi vor fi livrați refrigerați. Depozitați cât mai curând reactivii la temperatura indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare.

| Nume reactiv   | Cantitate eprubete | Culoare capac | Volum de umplere | Ingrediente active  |
|--|--------------------|---------------|------------------|---|
| Bile magnetice Streptavidin (Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)) | 2                  | Transparent   | 1,2 ml           | Bile magnetice Streptavidin în soluție apoasă tamponată conținând formamidă, detergent și sare. |
| Soluție tampon de resuspensie (Resuspension Buffer (RSB))        | 4                  | Transparent   | 1,8 ml           | Soluție apoasă tamponată.   |
| Tampon de îmbogățire Hyb 2 (EHB2)                                | 1                  | Transparent   | 200 μl           | Soluție apoasă tamponată care conține detergent și sare.  |
| Tampon de eluare țintă 2 (ET2)                                   | 1                  | Transparent   | 200 μl           | Soluție apoasă tamponată.   |

### Reactivii de îmbogățire Illumina DNA Prep Dx 2, a se depozita la temperaturi cuprinse între -25°C și -15°C

Următorii reactivi vor fi livrați congelați. Depozitați cât mai curând reactivii la temperatura indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare.

| Nume reactiv  | Cantitate eprubete      |                            | Culoare capac | Volum de umplere | Ingrediente active   |
|---|-------------------------|----------------------------|---------------|------------------|--|
|   | 16 probe (nr. 20050024) | 96 de probe (nr. 20050029) |               |                  |  |
| Tampon de eluare pentru îmbogățire 1 (EE1)            | 1                       | 1                          | Transparent   | 580 μl           | Soluție detergent în apă.                                  |
| Tampon de spălare pentru îmbogățire amplificată (EEW) | 4                       | 4                          | Auriu         | 4,1 ml           | Soluție apoasă tamponată care conține detergent și săruri. |
| PCR Primer Cocktail (PPC)                             | 1                       | 1                          | Transparent   | 320 μl           | Amestec de amorse PCR (oligonucleotide).                   |
| 2N NaOH (HP3)   | 1                       | 1                          | Transparent   | 200 μl           | Soluție de 2N hidroxid de sodiu (NaOH).                    |



| Nume reactiv                                     | Cantitate eprubete         |                               | Culoare capac | Volum de umplere | Ingrediente active  |
|--|----------------------------|-------------------------------|---------------|------------------|---|
|  | 16 probe<br>(nr. 20050024) | 96 de probe<br>(nr. 20050029) |               |                  |   |
| HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)           | 2                          | 1                             | Albastru      | 480 µl           | Soluție apoasă tamponată cu Cot-1 DNA, agent de aglomerare și formamidă |
| Amestec PCR îmbunătățit (Enhanced PCR Mix (EPM)) | 2                          | 1                             | Transparent   | 200 µl           | Polimerază ADN și dNTP-uri în soluție apoasă tamponată                  |

### Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, păstrați la -25°C până la -15°C

Următorii reactivi vor fi livrați congelați. Depozitați cât mai curând reactivii la temperatura indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare. Pentru indexul secvențelor adaptoare, consultați [Anexa: Secvențele adaptoarelor index Illumina UD la pagina 61](#).

| Componentă  | Cantitate |
|---|-----------|
| Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 indexuri), # 20050038 | 1         |
| Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 indexuri), # 20050039 | 1         |

## Reactivi nefurnizați

### Reactivi obligatorii, nefurnizați

- Reactivi de extracție și purificare ADN
- Reactivi de cuantificare ADN
- Etanol (200 pentru biologie moleculară)
- Apă fără nucleaze
- 1M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- Soluție NaOH 1N, gradată pentru biologie moleculară
- Dacă se utilizează sistemul de secvențiere NextSeq 550Dx:
  - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 de cicluri) (nr. de catalog 20028871)
- Dacă se utilizează sistemul de secvențiere MiSeqDx:
  - MiSeqDx Reagent Kit v3 (nr. de catalog 20037124)

- Dacă se utilizează sistemul de secvențiere NovaSeq 6000Dx:
  - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 de cicluri) (nr. catalog 20046931)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 de cicluri) (nr. catalog 20046933)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (nr. catalog 20062292)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (nr. catalog 20062293)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube (nr. catalog 20062290)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (nr. catalog 20062291)

## Cerințe pentru panelul de îmbogățire a probelor

Reactivii din kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sunt compatibili cu paneluri de oligonucleotide ADN de îmbogățire atât de la Illumina, cât și de la terți. Dacă utilizați probe ADN biotinilate ale terților (paneluri standard sau personalizate), asigurați-vă că îndeplinesc specificațiile indicate.

Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a fost optimizat și validat utilizând următoarele specificații pentru panelurile terților. Nu pot fi garantate performanțe comparabile dacă vor fi utilizate paneluri ale terților care nu îndeplinesc specificațiile.

- Lungimi ale probelor de 80 bp sau 120 bp
- Între 500 și 675.000 de probe
- ADN mono- sau dublu-catenar
- Intrarea totală a probei  $\geq 3$  pmols pentru îmbogățiri la plexități între 1-plex și 12-plexuri

## Depozitare și manipulare

- Temperatura camerei este definită ca fiind intervalul dintre 15°C și 30°C.
- Reactivii sunt stabili când sunt depozitați conform indicațiilor până la data de valabilitate specificată pe etichetele seturilor. Pentru temperaturile de depozitare, consultați [Reactivi furnizați la pagina 4](#).
- Reactivii congelați sunt stabili până la maximum patru cicluri înghețare-dezghețare care pot apărea înaintea datei de expirare.
- Procedura pentru kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx conține următoarele puncte de oprire în siguranță:
  - După [Amplificarea ADN-ului fragmentat la pagina 29](#), bibliotecile amplificate sunt stabile până la 30 de zile dacă sunt depozitate la temperaturi cuprinse între -25°C și -15°C.
  - După [Curățarea bibliotecilor la pagina 31](#), bibliotecile amplificate sunt stabile până la 30 de zile dacă sunt depozitate la temperaturi cuprinse între -25°C și -15°C.
  - După [Gruparea bibliotecilor pre-îmbogățite la pagina 33](#), bibliotecile amplificate sunt stabile până la 30 de zile dacă sunt depozitate la temperaturi cuprinse între -25°C și -15°C.

- După [Amplificarea bibliotecii îmbogățite la pagina 44](#), placa cu biblioteci amplificate îmbogățite poate rămâne pe ciclul termic până la 24 de ore. Ca alternativă, placa poate fi depozitată la temperaturi cuprinse între 2°C și 8°C până la 48 de ore.
- Bibliotecile îmbogățite finale curățate sunt stabile până la 7 zile dacă sunt stocate la temperaturi cuprinse între -25°C și -15°C.
- Dacă orice ambalaj sau conținut al kitului Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este deteriorat sau compromis, luați legătura cu departamentul Asistență clienți Illumina.
- Soluția tampon de oprire a fragmentării 2 (Stop Tagment Buffer 2 (ST2)) poate forma precipitate sau cristale vizibile. Dacă observați precipitate, încălziți până la 37°C timp de 10 minute, apoi agitați până la dizolvarea precipitatelor.
- Oligonucleotidele de hibridizare (HYB) și tamponul de spălare pentru amplificare (EEW) trebuie să fie preîncălzite la aceeași temperatură ca temperatura de menținere pentru hibridizări aplicabilă în funcție de tipul de probă și panelul de probe. Pentru mai multe informații privind manipularea NHB2 și a EEW, consultați [Note procedurale la pagina 16](#).
- Soluțiile tampon Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) și HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) pot dezvolta cristale și turbiditate. Dacă se observă cristalizarea sau tulburarea soluției, agitați sau pipetați în sus și în jos pentru a amesteca, până ce soluția devine clară. Asigurați-vă că ați preîncălzit NHB2 înainte de pipetare.
- Atunci când manipulați bilele de curățare (Cleanup Beads (CB)), respectați următoarele bune practici:
  - Nu congelați niciodată bilele.
  - Chiar înainte de utilizare, agitați bilele până când sunt corect suspendate și culoarea pare omogenă.
- Atunci când manipulați Enrichment BLT Small (eBLTS), respectați următoarele bune practici:
  - Depozitați eprubeta eBLTS în poziție verticală, în așa fel încât bilele să fie mereu imersate în soluția tampon.
  - Agitați temeinic eBLTS până când bilele sunt resuspendate. Pentru a evita reпозиționarea bilelor, nu este recomandată centrifugarea înainte de pipetare.
  - Dacă bilele aderă la marginile sau capacul plăcii cu 96 de godeuri, centrifugați la 280 × g timp de 3 secunde apoi pipetați pentru a resuspenda.
- Atunci când manipulați plăci de adaptoare index, respectați următoarele bune practici:
  - Nu adăugați probe pe placa de adaptor index.
  - Fiecare godeu al plăcii index este de unică folosință.

## Echipamentele și materialele obligatorii, nefurnizate

Pe lângă kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, asigurați-vă că dispuneți de echipamentele și materialele necesare, înainte de a începe protocolul.

## Echipament

Asigurați-vă că dispuneți de echipamentele necesare înainte de a începe protocolul.

Protocolul a fost optimizat și validat utilizând articole cu specificațiile enumerate. Nu pot fi garantate performanțe comparabile dacă vor fi utilizate alte echipamente decât cele specificate.

Unele articole sunt necesare doar pentru anumite fluxuri de lucru. Aceste articole sunt specificate în tabele separate.

- Termociclor cu următoarele specificații:
  - Capac încălzit
  - Intervalul minim de temperatură de control este între 10°C și 98°C
  - Precizia minimă a temperaturii este de  $\pm 0,25^\circ\text{C}$
  - Volumul maxim de reacție este de 100  $\mu\text{l}$
  - Compatibil cu plăci PCR cu 96 de godeuri și manta completă
- Incubator de microprobe cu următoarele specificații:
  - Intervalul de temperatură ambientală între +5,0°C și 99,0°C
  - Compatibil cu plăci MIDI cu 96 de godeuri
- Inserții ale incubatorului de microprobe compatibile cu plăcile MIDI cu 96 de godeuri
- Mixer de microplăci de viteză mare, cu viteze de amestecare cuprinse între 200–3000 rpm
- Suport magnetic compatibil cu plăci PCR cu 96 de godeuri
- Suport magnetic compatibil cu plăci MIDI cu 96 de godeuri
- Fluorometru compatibil cu metoda dvs. de cuantificare
- Analizator de fragmente ADN
- Pipete de precizie:
  - Pipete de 10  $\mu\text{l}$  monocanal și multicanal
  - Pipete de 20  $\mu\text{l}$  monocanal și multicanal
  - Pipete de 200  $\mu\text{l}$  monocanal și multicanal
  - Pipete monocanal de 1000  $\mu\text{l}$
  - Pipetele de precizie asigură o livrare precisă a reactantului și a probei. Pipetele monocanal sau multicanal pot fi utilizate dacă sunt calibrate în mod regulat și sunt precise în intervalul de 5% de la volumul precizat.
- Centrifugă pentru microplăci
- Microcentrifugă
- Unul dintre următoarele sisteme de secvențiere Illumina:
  - Instrumentul MiSeqDx, catalog # DX-410-1001
  - Instrumentul NextSeq 550Dx, nr. de catalog 20005715

- Instrumentul NovaSeq 6000Dx, nr. de catalog 20068232
- [Opțional] Concentrator vacuum
- [FFPE] Sistem de detecție PCR în timp real

## Materiale

Asigurați-vă că dispuneți de materialele necesare înainte de a începe protocolul.

Unele articole sunt necesare doar pentru anumite fluxuri de lucru. Aceste articole sunt specificate în tabele separate.

Protocolul a fost optimizat și validat, utilizând articolele listate. Nu este garantată o performanță comparabilă atunci când se folosesc materiale alternative.

- Vârfuri de pipetă filtrate
- Eprubete de centrifugă conice de 15 sau 50 ml
- Eprubete de 1,5 ml pentru microcentrifugă
- Rezervoare de reactivi multicanal fără RNază/DNază, de unică folosință
- Benzi și capace pentru 8 eprubete fără RNază/DNază
- Pipete serologice
- Placă de depozitare cu godeuri adânci, din polipropilenă, cu 96 de godeuri de 0,8 ml (placă MIDI)
- Plăci PCR cu 96 de godeuri, din material dur, cu manta completă
- [FFPE] plăci qPCR compatibile cu instrumentul qPCR
- Sigilii adezive pentru plăci cu 96 de godeuri cu următoarele specificații:
  - Poliester detașabil, transparent
  - Potrivit pentru plăci PCR cu manta
  - Adeziv puternic care rezistă la multiple modificări de temperatură, de la -40°C la 110°C
  - Fără DNază/RNază
- Consumabile din plastic compatibile cu metoda de cuantificare aleasă
- Kit de cuantificare fluorometric dsADN, compatibil cu sistemul de cuantificare ales:
  - Pentru a cuantifica biblioteci amplificate pre-îmbogățite, se poate utiliza un kit de cuantificare cu spectru larg.
  - Pentru a cuantifica biblioteci îmbogățite, spectrul kiturilor de cuantificare depinde de panelul de probe utilizat.
- Kitul de analiză a fragmentelor pentru calificare bibliotecilor cu sistemul de calificare ales:
  - Pentru a califica biblioteci amplificate pre-îmbogățite, se poate utiliza un kit cu spectru larg.
  - Pentru a califica biblioteci îmbogățite, spectrul kiturilor de calificare depinde de panelul de probe utilizat.

- [Opțional] Kit pentru extracție ADN din celule și țesuturi umane. Se poate utiliza orice metodă de extracție validată.

## Colectarea, transportul și depozitarea probei



### ATENȚIE

Manevrați toate probele ca și cum ar fi agenți cu potențial infecțios.

- Acest test este compatibil cu ADN genomic derivat din celule și țesuturi umane.
- Pentru gADN purificat disponibil în comerț, asigurați-vă că probele au fost transportate corespunzător și stocate conform instrucțiunilor producătorului. Respectați cele mai bune practici pentru stocare și cicluri de înghețare-dezghetare a ADN-ului.
- Pentru probele de sânge integral, respectați cerințele de recoltare, transport și depozitare aplicabile metodei alese de extracție a ADN-ului. Poate fi utilizată orice metodă de extracție validată. Transportarea sângelui integral trebuie să fie în conformitate cu toate reglementările naționale, federale, statale și locale în vigoare privind transportul de agenți etiologici.
- Pentru extracția de ADN din țesut FFPE, poate fi utilizată orice metodă de extracție validată. Respectați instrucțiunile și recomandările aplicabile metodei alese de extracție, pentru a determina următoarele practici:
  - Metode de fixare în formalină și de fixare în parafină pentru țesuturi, pentru a asigura cea mai bună calitate a ADN-ului extras.
  - Stocare în specimene FFPE.
  - Cerințe referitoare la materia primă, ca de exemplu numărul și grosimea secțiunilor FFPE. Cele mai multe metode de purificare recomandă utilizarea secțiunilor proaspăt tăiate.

## Avertizări și precauții

- Reactivii din kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx conțin substanțe chimice care pot fi periculoase. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Purtați echipament de protecție, inclusiv protecție pentru ochi, mănuși și halat de laborator corespunzătoare riscului de expunere. Manipulați reactivii folosiți ca deșeuri chimice și eliminați-i în conformitate cu legile și reglementările regionale, naționale și locale aplicabile. Pentru informații suplimentare privind mediul, sănătatea și siguranța, consultați Fișele cu date de securitate (SDS) la adresa [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- Manipulați toate probele de sânge ca și cum ar fi infecțioase pentru virusul imunodeficienței umane (HIV), virusul hepatitei B (HBV) și alți agenți patogeni transmisibili prin sânge (precauții universale).

- Utilizați măsurile de precauție obișnuite pentru activitățile de laborator. Nu pipetați cu gura. Nu mâncați, nu beți și nu fumați în spațiile de lucru desemnate. Purtați mănuși de unică folosință și halate de laborator atunci când manipulați specimene și reactivi din seturi. După ce manipulați specimene și reactivi din seturi, spălați-vă temeinic pe mâini.
- Pentru a preveni degradarea probei sau a reactivului, asigurați-vă că toți vaporii de hipoclorit de sodiu de la curățare s-au disipat complet înainte de a începe protocolul.
- Contaminarea probelor cu alte produse PCR /ampliconi poate duce la rezultate imprecise și greșite. Pentru a evita contaminarea, utilizați următoarele bune practici:
  - Respectați normele obișnuite pentru laborator și cele de igienă în laborator.
  - Executați etapele fluxului de lucru în zonele desemnate de pre- și post-amplificare.
  - Depozitați reactivii utilizați înainte de curățarea bibliotecilor în zona de pre-amplificare.
  - Separați reactivii de pre-amplificare de reactivii de post-amplificare.
  - Asigurați-vă că zonele de pre-amplificare și post-amplificare sunt echipate cu materiale adecvate (de ex. pipete, vârfuri de pipete, agitator și centrifugă).
- Evitați contaminarea încrucișată. Utilizați capete noi de pipete pentru fiecare probă și la dispensarea reactivilor. Utilizarea capetelor cu filtre reduce riscul de transporta ampliconi și reduce contaminarea de la o probă la alta.
  - Atunci când adăugați sau transferați probe sau amestecuri de reactivi, schimbați vârfurile pipetelor între probe.
  - Atunci când adăugați adaptoare index cu o pipetă multi-canal, schimbați vârfurile pipetelor înainte de fiecare rând sau fiecare coloană. Dacă utilizați o pipetă mono-canal, schimbați vârful după fiecare probă.
  - Îndepărtați plăcile de adaptoare index nefolosite din zona de lucru.
- Utilizați următoarele bune practici pentru spălarea etanolului:
  - Preparați întotdeauna etanol proaspăt de 80%. Etanolul poate absorbi apa din aer, ceea ce poate afecta rezultatele obținute.
  - Asigurați-vă că tot etanolul este îndepărtat de pe fundul godeurilor în timpul etapelor de spălare. Etanolul rezidual poate afecta rezultatele.
  - Respectați timpul de uscare specificat pentru suportul magnetic pentru a asigura o evaporare completă. Etanolul rezidual poate afecta performanța reacțiilor subsecvente.
- Preparați întotdeauna amestecuri master înainte de utilizare și nu păstrați niciodată soluțiile de lucru combinate.
- Performanța kitului Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu este garantată atunci când nu sunt respectate procedurile menționate în broșură.
- Nu utilizați nicio componentă a kitului care a depășit perioada de valabilitate indicată pe eticheta kitului.
- Nu interschimbați componentele din diferite kituri Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Kiturile sunt identificate prin eticheta de pe kit.

## Note procedurale

### Recomandări de intrări de ADN

Protocolul kitului Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu intrări de 50–1000 ng de ADN genomic (gADN) de înaltă calitate, dublu catenar.

Asigurați-vă că proba inițială de gADN nu conține > 1 mM EDTA și nu conține compuși de contaminare organici, ca de exemplu fenol și etanol. Aceste substanțe pot interfera cu reacția de fragmentare și pot produce eșecul testului.

#### gADN introdus $\geq$ 50 ng

Pentru introducerea de gADN cuprins între 50–1000 ng, cuantificarea și normalizarea probei gADN inițiale nu sunt necesare.

#### gADN introdus < 50 ng

Introducerea de ADN de 10–50 ng poate fi utilizată, cu următoarele precizări:

- Dacă introduceți 10–49 ng gADN, cuantificarea probei inițiale de gADN este recomandată, pentru a determina numărul de cicluri PCR necesare după fragmentare. Utilizați o metodă bazată pe fluorometrie pentru a cuantifica gADN dublu catenar introdus. Evitați metodele care utilizează acizi nucleici totali, ca de exemplu NanoDrop sau alte metode de absorbție UV.
- Acest protocol nu normalizează randamentul final al bibliotecii pre-îmbogățite de la 10–49 ng gADN, prin urmare sunt necesare cuantificarea și normalizarea bibliotecilor înainte și după îmbogățire.
- Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a fost caracterizat și verificat pentru intrări de ADN de 50–1000 ng. Performanțele produselor echivalente nu pot fi garantate pentru intrări de gADN < 50 ng.

### Recomandări de introducere pentru sânge

Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu gADN extras din sânge periferic integral. Poate fi utilizată orice metodă de extracție validată. Atunci când se extrage gADN din sânge integral, cuantificarea inițială a ADN-ului introdus nu este necesară, iar kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx produce randamente normalizate de biblioteci pre-îmbogățite.

Următorii factori pot afecta negativ cantitatea de ADN extras din probe de sânge integral și, prin urmare, și normalizarea bibliotecii:

- Vechimea probei de sânge
- Condițiile de depozitare
- Afecțiunile medicale preexistente care pot afecta numărul de leucocite



## Recomandări cu privire la introducerea de probe de țesut FFPE

Utilizați următoarele criterii de calitate pentru ADN FFPE pentru a stabili intrările adecvate, pentru o pregătire reușită a bibliotecii:

- Pentru probe FFPE cu o valoare  $\Delta Cq \leq 5$ , intrarea de ADN recomandată este de 50–1000 ng.
- Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu este recomandat pentru probele FFPE de slabă calitate cu  $\Delta Cq > 5$ . Utilizarea probelor cu  $\Delta Cq > 5$  este posibilă, dar ar putea crește șansele de eșuare a pregătirii bibliotecii sau ar putea scădea performanța testului.

### Extracția FFPE

Utilizați o metodă de izolare a acizilor nucleici care produce randamente cu recuperare mare, reduce consumul de probe și păstrează integritatea probelor. Poate fi utilizată orice metodă validată de extracție a ADN-ului din probe FFPE. Atunci când se extrage gADN din țesut FFPE, cuantificarea inițială a ADN-ului introdus este necesară, iar kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu produce randamente normalizate de bibliotecii pre-îmbogățite.

### Calificare ADN din FFPE

gADN extras din țesut FFPE va fi calificat înainte de utilizare. Pentru performanțe optime, evaluați calitatea probei de ADN utilizând o metodă de extracție validată pentru calificarea ADN extras din probe FFPE. Protocolul kitului Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu probele de ADN din FFPE cu valoarea  $\Delta Cq \leq 5$ . Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu este recomandat pentru probele FFPE de slabă calitate cu  $\Delta Cq > 5$ . Utilizarea probelor cu  $\Delta Cq > 5$  este posibilă, dar ar putea crește șansele de eșuare a pregătirii bibliotecii sau ar putea scădea performanța testului.

### [Opțional] Probe de referință FFPE

Utilizați materiale de referință caracterizate, ca de exemplu Horizon HD799 (DNA) ca o metodă de control pozitiv atunci când efectuați protocolul. Materialele calificate FFPE din xenogrefe derivate din linii celulare pot fi utilizate de asemenea ca referință. Utilizați o metodă bazată pe fluorometrie pentru a cuantifica materialele înainte de utilizare.

**NOTĂ** Rularea unei probe de control pozitiv sau control fără șablon consumă reactivi și reduce numărul total de probe necunoscute care pot fi procesate.

## Recomandări cu privire la introducerea de probe

Recomandările de intrări pentru probe pentru kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sunt sintetizate în tabelul de mai jos:

Tabelul 1 Recomandări cu privire la introducerea de probe

| Tipul de probă introdusă | Cantitatea de probe introduse | Cuantificarea intrării necesare de ADN | Calitatea intrării necesare de ADN | Randament normalizat al bibliotecii pre-îmbogățite |
|--------------------------|-------------------------------|--|------------------------------------|--|
| gADN                     | 10–49 ng                      | Da                                     | 260/280 raport de 1,8–2,0          | Nu   |
| gADN                     | 50–1000 ng                    | Nu                                     | 260/280 raport de 1,8–2,0          | Da   |
| gADN extras din sânge    | 50–1000 ng                    | Nu                                     | 260/280 raport de 1,8–2,0          | Da   |
| gADN extras din FFPE     | 50–1000 ng                    | Da                                     | Valoarea $\Delta Cq \leq 5$        | Nu   |

Ciclurile PCR recomandate pentru programul PCR eBLTS sunt ajustate în funcție de concentrația și calitatea probei. Pentru mai multe informații, consultați [Amplificarea ADN-ului fragmentat la pagina 29](#).

## Sfaturi și tehnici

### Evitarea contaminării încrucișate

- Atunci când adăugați sau transferați probe, schimbați vârful după *fiecare probă*.
- Atunci când adăugați adaptoare index cu o pipetă multi-canal, schimbați vârful pipetelor înainte de *fiecare rând* sau *fiecare coloană*. Dacă utilizați o pipetă mono-canal, schimbați vârful după fiecare probă.

### Sigilarea plăcii

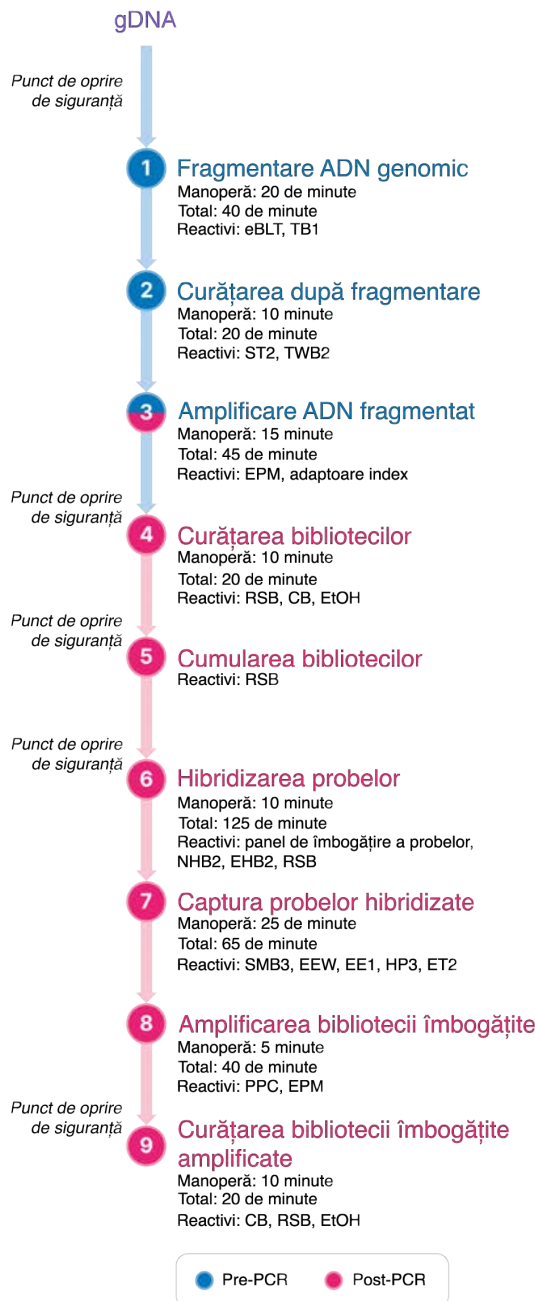
- Sigilați întotdeauna placa cu 96 de godeuri cu un sigiliu adeziv nou, folosind o rolă de cauciuc pentru a acoperi placa, înainte de următorii pași ai protocolului:
  - Pașii de agitare
  - Pașii de incubare. Dacă placa nu este sigilată corespunzător, se poate produce evaporare în timpul incubării.
  - Pașii de centrifugare
  - Pașii de hibridizare
- Asigurați-vă că marginile și godeurile sunt complet sigilate pentru a reduce riscul de contaminare încrucișată și de evaporare.
  - Dacă observați lichid sau condens pe sigiliu sau pe marginile godeurilor, centrifugați dacă este necesar înainte de a desigila.
- Puneți placa pe o suprafață plană înainte de a îndepărta încet sigiliul.

## Manipularea Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Depozitați eprubeta cu soluție stoc eBLTS în poziție verticală în așa fel încât bilele să fie mereu imersate în soluția tampon.
- Imediat înainte de utilizare, agitați temeinic eprubeta cu soluție stoc eBLTS până ce bilele sunt resuspendate. Pentru a evita re poziționarea bilelor, nu este recomandată centrifugarea înainte de pipetare.
- Dacă bilele aderă la marginile sau capacul plăcii cu 96 de godeuri, centrifugați la  $280 \times g$  timp de 3 secunde apoi pipetați pentru a resuspenda.
- Atunci când spălați eBLTS:
  - Asigurați-vă că folosiți suportul magnetic potrivit pentru placa dvs.
  - Păstrați placa pe suportul magnetic până la momentul la care este specificată îndepărtarea ei.
  - Dacă sunt aspirate bile în vârful de pipetă, pipetați-le înapoi pe placa de pe suportul magnetic și așteptați până ce lichidul devine clar (2 minute).

# Fluxul de lucru pentru kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Următoarea diagramă ilustrează fluxul de lucru pentru kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Punctele de oprire în siguranță sunt marcate între etape. Estimarea timpului se bazează pe procesarea îmbogățirilor a 12 probe în 12 plexuri.



# Instrucțiuni de utilizare

Acest capitol descrie protocolul kitului Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

- Revedeți întregul flux de lucru planificat pentru secvențiere, de la probe la analiză, pentru a asigura compatibilitatea produselor și parametrilor experimentali.
- Înainte de a începe, confirmați conținutul kitului și asigurați-vă că aveți toate componentele, echipamentele și materialele necesare.
  - Probele biotinite vândute de terți trebuie să respecte specificațiile impuse. Consultați [Cerințe pentru panelul de îmbogățire a probelor la pagina 10](#) pentru a vă asigura că probele vândute de terți respectă specificațiile impuse.
- Urmați protocolul în ordinea descrisă, utilizați volumele specificate și parametri de incubare.
- Dacă în protocol nu se specifică un punct de oprire în siguranță, continuați imediat cu pasul următor.
- Atunci când creați un amestec master, surplusul este inclus în volumele furnizate.
- Asigurați-vă că folosiți suportul magnetic potrivit pentru tipul dvs. de placă.

## Pregătirea pentru grupare

Această etapă este necesară pentru a asigura o secvențiere reușită a bibliotecilor îmbogățite. Gruparea bibliotecilor poate fi făcută înainte de îmbogățire sau înainte de secvențiere.

**Înainte de îmbogățire**—Bibliotecile amplificate indexate individual sunt grupate pentru îmbogățirea cu panelul de probe ales. Aceasta va crea un cluster multiplexat de biblioteci îmbogățite. Pentru intrările FFPE, procesarea a fost testată și este recomandată exclusiv pentru reacțiile de îmbogățire cu 1 plex. Pentru gADN de înaltă calitate, au fost testate 12 plexuri, însă sunt posibile, de asemenea, 2 plexuri până la 11 plexuri.

**Înainte de secvențiere**—Bibliotecile îmbogățite într-un singur plex și/sau bibliotecile îmbogățite multiplex sunt grupate înainte de secvențiere. Numărul de biblioteci îmbogățite care pot fi secvențiate depinde de adâncimea de citire țintă pentru fiecare probă, pe sistemul dvs. de secvențiere.

## Indexarea duală unică

Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx utilizează indexări duale unice

- Bibliotecile indexate dual adaugă secvențe Index 1 (i7) și Index 2 (i5) pentru a genera biblioteci etichetate unic.
- Indexările UD au secvențe de indexare distincte, neasociate pentru citirile index i7 și i5. Indexările au lungimi de 10 baze.

Selectarea de adaptoare index cu diverse secvențe pentru biblioteci grupate optimizează echilibrul de culori, pentru o secvențiere și o analiză a datelor de succes. Clusterelor de plexități care au peste 10 plexuri sunt în mod inerent echilibrate din punct de vedere al culorilor, astfel încât puteți utiliza orice combinație de adaptoare

index. În timpul secvențierii, modulul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager sugerează opțiuni pentru combinații index echilibrate din punct de vedere al culorilor și vă notifică dacă nu este suficientă diversitate în combinațiile index selectate.

Pentru informații cu privire la secvențele de adaptoare index Illumina UD și la configurațiile plăcilor consultați [Anexa: Secvențele adaptoarelor index Illumina UD la pagina 61](#).

## Plexități de îmbogățire suportate

Reactivii din kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sunt configurați și testați la plexități de îmbogățire de 1 plex și de 12 plexuri. Deși sunt posibile și alte plexități de îmbogățire, unele plexități necesită o preparare suplimentară a bibliotecii pre-îmbogățite și alți reactivi de îmbogățire a probelor.

Obținerea unui randament adecvat al îmbogățirii pentru plexități nonstandard poate necesita o optimizare adițională. Nu sunt garantate rezultate optime.

- **Plexitate de îmbogățire**– Numărul bibliotecilor pre-îmbogățite (1–12) grupate într-o singură reacție de îmbogățire pentru hibridizare cu panelurile de probe de îmbogățire. De exemplu, combinarea a 12 biblioteci pre-îmbogățite creează un cluster de îmbogățire de 12 plexuri.
- **Reacția de îmbogățire (Enrichment reaction)**– Numărul de preparări unice ale reacțiilor de îmbogățire, indiferent de numărul bibliotecilor pre-îmbogățite grupate per reacție. De exemplu, o singură reacție de îmbogățire poate prepara un cluster de îmbogățire de 1 plex sau de 12 plexuri.

Pentru a calcula numărul total de biblioteci post-îmbogățire, înmulțiți plexitatea de îmbogățire per reacție cu numărul reacțiilor de îmbogățire. De exemplu, o singură reacție de îmbogățire a unui cluster de 12 plexuri produce un cluster de 12 biblioteci post-îmbogățire.

Atunci când sunt grupate biblioteci post-îmbogățire, reactivii din kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx suportă următoarele reacții de îmbogățire și plexități.

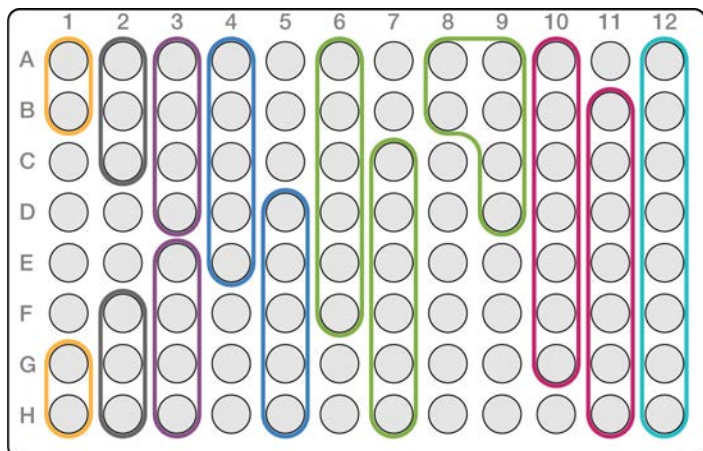
| Reactivi din Kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx | Reacții de îmbogățire | Plexitate de îmbogățire |
|---|-----------------------|-------------------------|
| Kit pentru 16 probe                                     | 16 reacții            | 1 plex                  |
| Kit pentru 96 de probe                                  | 8 reacții             | 12 plexuri              |

## Strategii de grupare de două plexuri până la opt plexuri

Următorul tabel indică adaptoarele index (godeuri) care pot fi combinate într-un cluster de 2–8plexuri, iar figura cu codurile de culoare ilustrează fiecare combinație.

Grupați orice plexitate  $\geq 2$  din capătul de sus sau de jos al unei coloane. Nu grupați elementele de pe un rând.

| Plexitate | Combi-nații  | Culoarea din figură |
|-----------|--|---------------------|
| 2         | Primele două sau ultimele două<br>godeuri dintr-o coloană:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• A și B</li> <li>• G și H</li> </ul> Rândurile C–F nu sunt folosite.   | Portocaliu          |
| 3         | Primele trei sau ultimele trei<br>godeuri dintr-o coloană:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• A–C</li> <li>• F–H</li> </ul> Rândurile D și E nu sunt folosite.  | Gri                 |
| 4         | Primele patru sau ultimele patru<br>godeuri dintr-o coloană:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• A–D</li> <li>• E–H</li> </ul>   | Violet              |
| 5         | Primele cinci sau ultimele cinci<br>godeuri dintr-o coloană:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• A–E</li> <li>• D–H</li> </ul>   | Albastru            |
| 6         | [Opțiunea 1] Primele șase sau<br>ultimele șase godeuri dintr-o<br>coloană:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• A–F</li> <li>• C–H</li> </ul> [Opțiunea 2] Primele două godeuri<br>(A și B) sau ultimele două godeuri<br>(G și H) dintr-o coloană și oricare<br>patru godeuri dintr-o coloană<br>adiacentă. | Verde               |
| 7         | Primele șapte sau ultimele șapte<br>godeuri dintr-o coloană:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>• A–G</li> <li>• B–H</li> </ul>   | Roz                 |
| 8         | Întreaga coloană.  | Albastru-verzui     |

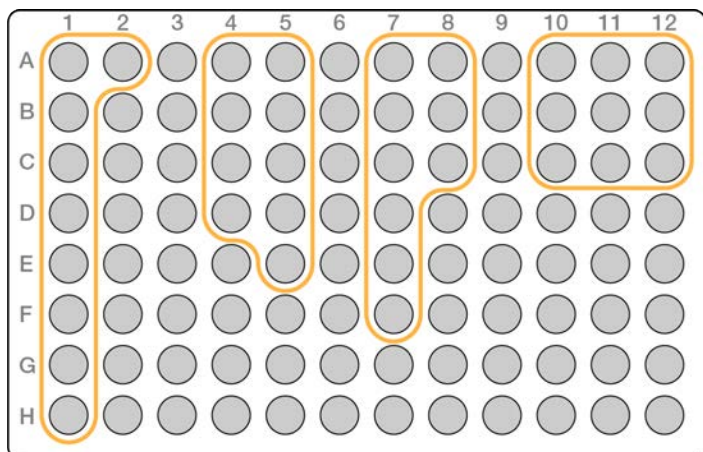


## Strategii de grupare în nouă plexuri

Utilizați adaptoare index din orice godeuri care optimizează echilibrul de culori într-un ciclu de secvențiere, ca de exemplu:

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

Următoarea figură ilustrează toate cele patru exemple.



## Fragmentare ADN genomic

Această etapă utilizează Enrichment BLT Small (eBLTS) pentru a fragmenta ADN, care este un proces care fragmentează și etichetează ADN-ul cu secvențe ale adaptorului.



## Consumabile

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (capacul galben)
- Tampon de fragmentare 1 (Tagmentation Buffer 1 (TB1))
- Apă fără nucleaze
- Placă PCR pentru 96 de godeuri
- Sigiliu adeziv
- Eprubete de 1,7 ml pentru microcentrifugă
- Bandă pentru 8 eprubete
- Capete pentru pipetare
  - Pipete multi-canal de 200 µl



### ATENȚIE

**Acest set de reactivi conține substanțe chimice potențial periculoase. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Purtați echipament de protecție, inclusiv protecție pentru ochi, mănuși și halat de laborator corespunzătoare riscului de expunere. Manipulați reactivii folosiți ca deșeuri chimice și eliminați-i în conformitate cu legile și reglementările regionale, naționale și locale aplicabile.** Pentru informații suplimentare privind mediul, sănătatea și siguranța, consultați Fișele cu date de securitate (SDS) la adresa [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Despre reactivi

- eBLTS trebuie depozitat la temperaturi între 2°C și 8°C. Nu utilizați eBLTS care a fost depozitat la temperaturi sub 2°C.
- Nu centrifugați eBLTS.

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

| Articol              | Depozitare           | Instrucțiuni   |
|----------------------|----------------------|--|
| eBLTS (capac galben) | între 2°C și 8° C    | Aduceți la temperatura camerei. Agitați imediat înainte de utilizare pentru a amesteca. Nu centrifugați înainte de pipetare. |
| TB1                  | între -25°C și -15°C | Aduceți la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca.   |

2. Agitați sau pipetați ADN-ul și apoi centrifugați pentru scurt timp.
3. Păstrați următorul program TAG pe ciclul termic:

- Alegeți opțiunea de capac preîncălzit și setați la 100°C
- Setați volumul de reacție la 50  $\mu$ l
- 55°C timp de 5 minute
- Păstrați la 10°C

## Procedura

1. Adăugați 2–30  $\mu$ l ADN în fiecare godeu al plăcii PCR cu 96 de godeuri astfel încât cantitatea totală să fie de 50–1000 ng.  
Dacă volumul ADN < 30  $\mu$ l, adăugați apă fără nucleaze în probele de ADN pentru a aduce volumul total la 30  $\mu$ l.
2. Agitați temeinic eBLTS până când bilele sunt complet resuspendate.
3. Combinați următoarele volume într-o eprubetă pentru a pregăti Amestecul master de fragmentare. Înmulțiți fiecare volum cu numărul de probe care sunt procesate.
  - eBLTS (11,5  $\mu$ l)
  - TB1 (11,5  $\mu$ l)Surplusul de reactiv este inclus în volum.
4. Pipetați amestecul master de fragmentare temeinic pentru a amesteca.
5. Împărțiți cantitatea de amestec master de fragmentare în mod egal într-o bandă cu 8 eprubete.
6. Utilizând o pipetă multicanal de 200  $\mu$ l, transferați 20  $\mu$ l din amestecul master de fragmentare în fiecare godeu al plăcii PCR care conține o probă. Utilizați capete de pipetă noi pentru fiecare coloană sau rând de probe.
7. Aruncați fâșia cu 8 eprubete după ce amestecul master de fragmentare a fost distribuit.
8. Utilizați o pipetă multi-canal de 200  $\mu$ l setată la 40  $\mu$ l, pipetați fiecare probă de 10 ori pentru a amesteca. Utilizați capete de pipetă noi pentru fiecare coloană de probe.  
Ca alternativă, închideți ermetic placa PCR și utilizați un agitator de plăci la 1600 rpm timp de 1 minut.
9. Sigilați placa și apoi plasați pe ciclul termic programat anterior și rulați programul TAG.
10. Așteptați până când programul TAG a atins temperatura de menținere de 10°C, apoi îndepărtați imediat placa.
11. Lăsați placa PCR de 96 de godeuri la temperatura camerei timp de 2 minute, apoi treceți la etapa următoare.

## Curățarea după fragmentare

Această etapă presupune spălarea ADN-ului fragmentat de adaptor pe eBLTS înainte de amplificarea PCR.

### Consumabile

- Tampon de oprire a fragmentării (Stop Tagment Buffer 2 (ST2))
- Tampon de spălare a fragmentării (Tagment Wash Buffer 2 (TWB2))

- Suport magnetic pentru placa PCR cu 96 de godeuri
- Sigiliu adeziv
- Bandă pentru 8 eprubete
- Capete pentru pipetare
  - Pipete multi-canal de 20 µl
  - Pipete multi-canal de 200 µl
- Pregătirea pentru proceduri ulterioare:
  - EPM (Enhanced PCR Mix, Amestec PCR îmbunătățit)
  - Placă de adaptor Index

## Despre reactivi

- Asigurați-vă că folosiți suportul magnetic potrivit pentru placa dvs. Utilizarea unui suport magnetic pentru placă MIDI la o placă PCR poate împiedica aderarea TWB2 la bile.
- Pipetați TWB2 încet, pentru a reduce formarea de spumă, pentru a evita aspirarea incorectă a volumului și amestecarea incompletă.

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

| Articol                | Depozitare              | Instrucțiuni   |
|------------------------|-------------------------|--|
| EPM                    | între<br>-25°C și -15°C | Decongelați pe gheață timp de 1 oră.<br>Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.   |
| ST2                    | între<br>15°C și 30°C   | Dacă observați precipitate, încălziți până la 37°C timp de 10 minute, apoi agitați până la dizolvarea precipitatelor. A se utiliza la temperatura camerei. |
| TWB2                   | între<br>15°C și 30°C   | A se utiliza la temperatura camerei.   |
| Placă de adaptor Index | între<br>-25°C și -15°C | Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute.   |

## Procedura

1. Adăugați 10 µl ST2 la fiecare reacție de fragmentare. Dacă utilizați o pipetă multi-canal, pipetați ST2 în banda cu 8 eprubete, apoi transferați volumele necesare în placa PCR. Utilizați capete de pipetă noi pentru fiecare coloană sau rând de probe.
2. Utilizând o pipetă de 200 µl, setată la 50 µl, pipetați încet fiecare godeu de 10 ori, pentru a resuspenda bilele.  
Ca alternativă, închideți ermetic placa și agitați la 1600 rpm timp de 1 minut. Repetați dacă este necesar.

3. Închideți ermetic placa și apoi centrifugați la  $280 \times g$  timp de 10 secunde.
4. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute.
5. Plasați pe un suport magnetic pentru plăci PCR și așteptați până ce lichidul devine clar (3 minute).
6. [ $\leq 48$  probe] Spălați de trei ori după cum urmează.
  - a. Utilizând o pipetă de 200  $\mu$ l, setată la 60  $\mu$ l, îndepărtați și aruncați supernatantul, fără a modifica poziția bilelor.
  - b. Îndepărtați de pe suportul magnetic.
  - c. Imediat după aceea, adăugați încet 100  $\mu$ l TWB2 direct pe bile.
  - d. Pipetați încet până ce bilele sunt complet resuspendate. Ca alternativă, închideți ermetic placa și agitați la 1600 rpm timp de 1 minut.
  - e. Dacă se produc stropiri, reduceți viteza la  $280 \times g$  timp de 10 secunde.
  - f. Plasați pe un suport magnetic pentru plăci PCR și așteptați până ce lichidul devine clar (3 minute). Lăsați placa pe suportul magnetic și adăugați TWB2 în godeuri pentru a preveni uscarea excesivă atunci când efectuați cea de-a treia spălare. Îndepărtați și aruncați supernatantul după ce ați preparat Amestecul master PCR.
  - g. Utilizând o pipetă multicanal de 200  $\mu$ l, setată la 100  $\mu$ l, îndepărtați și aruncați supernatantul.
  - h. Repetați etapele c–f de două ori pentru un total de trei spălări.
7. [ $> 48$  probe] Spălați de trei ori după cum urmează.
  - a. Efectuați etapele b și c în trepte de 1-coloană până la 2 coloane, până ce toate coloanele au fost procesate, pentru a preveni uscarea excesivă.
  - b. Utilizând o pipetă multicanal de 200  $\mu$ l, setată la 60  $\mu$ l, îndepărtați și aruncați supernatantul.
  - c. Îndepărtați de pe suportul magnetic.
  - d. Imediat după aceea, adăugați încet 100  $\mu$ l TWB2 direct pe bile.
  - e. Pipetați încet până ce bilele sunt complet resuspendate. Ca alternativă, închideți ermetic placa și agitați la 1600 rpm timp de 1 minut.
  - f. Dacă se produc stropiri, reduceți viteza la  $280 \times g$  timp de 10 secunde.
  - g. Plasați pe un suport magnetic pentru plăci PCR și așteptați până ce lichidul devine clar (3 minute). Lăsați placa pe suportul magnetic și adăugați TWB2 în godeuri pentru a preveni uscarea excesivă atunci când efectuați cea de-a treia spălare. Îndepărtați și aruncați supernatantul după ce ați preparat Amestecul master PCR.
  - h. Utilizând o pipetă multicanal de 200  $\mu$ l, setată la 100  $\mu$ l, îndepărtați și aruncați supernatantul.
  - i. Îndepărtați de pe suportul magnetic și adăugați încet 100  $\mu$ l TWB2 direct pe bile.
  - j. Repetați etapele h și i în creșteri de 1- sau 2-coloane, până ce toate coloanele au fost procesate.
  - k. Repetați etapele e–h de două ori pentru un total de trei spălări.
8. Mențineți pe suportul magnetic până la etapa 4 a secțiunii *Procedura din Amplificarea ADN-ului fragmentat (Amplify Tagmented DNA)*.  
TWB2 trebuie să rămână în godeuri pentru a preveni uscarea excesivă a bilelor.

## Amplificarea ADN-ului fragmentat

Această etapă amplifică ADN-ul fragmentat utilizând un program PCR cu cicluri limitate. Etapa PCR adaugă adaptoare Index 1 (i7), adaptoare Index 2 (i5) și secvențele necesare pentru a secvenția generația de clustere.

### Consumabile

- EPM (Enhanced PCR Mix, amestec PCR îmbunătățit)
- Placă de adaptor Index
- Placă PCR pentru 96 de godeuri
- Apă fără nucleaze
- Sigiliu adeziv
- Eprubete de 1,5 ml pentru microcentrifugă
- Capete pentru pipetare
  - Pipete multi-canal de 20  $\mu$ l
  - Pipete multi-canal de 200  $\mu$ l

### Despre reactivi

- Plăci de adaptor Index
  - Un cluster poate conține > 10  $\mu$ l de adaptoare index.
  - Nu adăugați probe pe placa de adaptor index.
  - Fiecare godeu al plăcii index este de unică folosință.

### Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

| Articol                   | Depozitare              | Instrucțiuni  |
|---------------------------|-------------------------|---|
| EPM                       | între<br>-25°C și -15°C | Decongelați la 4°C sau pe gheață timp de 1 oră.<br>Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp. |
| Placă de adaptor<br>Index | între<br>-25°C și -15°C | Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute.  |

2. Mențineți următorul program eBLTS PCR pe un ciclor termic, utilizând numărul adecvat de cicluri PCR indicat în tabelul de mai jos.
- Alegeți opțiunea de capac preîncălzit și setați la 100°C
  - Setați volumul de reacție la 50  $\mu$ l
  - 72°C timp de 3 minute
  - 98°C timp de 3 minute
  - X cicluri de:
    - 98°C timp de 20 de secunde
    - 60°C timp de 30 de secunde
    - 72°C timp de 1 minut
  - 72°C timp de 3 minute
  - Păstrați la 10°C

Durata totală de funcționare este de ~38 minute pentru 9 cicluri și ~46 minute pentru 12 cicluri.

| Tipul de probă introdusă        | Numărul de cicluri PCR (X) |
|---------------------------------|----------------------------|
| 10–49 ng gADN                   | 12                         |
| 50–1000 ng gADN                 | 9                          |
| 50–1000 ng gADN extras din FFPE | 12                         |
| gADN extras din sânge           | 9                          |

## Procedura

1. Combinați următoarele pentru a pregăti Amestecul master PCR. Înmulțiți fiecare volum cu numărul de probe care sunt procesate.
  - EPM (23  $\mu$ l)
  - Apă fără nucleaze (23  $\mu$ l)
 Surplusul de reactiv este inclus în volum.
2. Pipetați de 10 ori amestecul master PCR, apoi centrifugați scurt.
3. Menținând placa pe suportul magnetic, utilizați o pipetă multicanal de 200  $\mu$ l pentru a îndepărta și a arunca TWB2.  
Spuma care rămâne pe pereții godeului nu afectează biblioteca.
4. Îndepărtați de pe suportul magnetic.
5. Adăugați imediat 40  $\mu$ l amestec master PCR direct pe bilele din fiecare godeu.
6. Pipetați imediat amestecul până când bilele sunt complet resuspendate. Ca alternativă, închideți ermetic placa și agitați la 1600 rpm timp de 1 minut.

7. Închideți ermetic placa probei și centrifugați la 280 × g timp de 10 secunde.
8. Centrifugați placa adaptorului de index la 1000 × g timp de 1 minut.
9. Pregătiți placa adaptorului de index.
  - [ $< 96$  de probe] Perforați folia sigiliu de pe placa adaptorului de index cu un capăt nou de pipetă pentru fiecare godeu doar pentru numărul de probe care vor fi procesate.
  - [96 de probe] Poziționați o placă PCR semi-pregătită deasupra plăcii adaptorului de index și apăsați pentru a perfora folia sigiliu. Aruncați placa PCR folosită pentru a perfora folia sigiliu.
10. Cu un capăt de pipetă nou, adăugați 10  $\mu$ l de adaptoare de index pre-împerecheate în fiecare godeu.
11. Utilizați o pipetă setată la 40  $\mu$ l și pipetați de 10 ori pentru a amesteca. Ca alternativă, închideți ermetic placa și amestecați la 1600 rpm timp de 1 minut.
12. Închideți ermetic placa și apoi centrifugați la 280 × g timp de 10 secunde.
13. Așezați pe ciclorul termic și rulați programul PCR eBLTS.

### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, depozitați la o temperatură cuprinsă între  $-25^{\circ}\text{C}$  și  $-15^{\circ}\text{C}$  timp de până la 30 de zile.

## Curățarea bibliotecilor

Această etapă utilizează o procedură de purificare cu bile în doi pași pentru a purifica bibliotecile amplificate.

### Consumabile

- Bile de curățare (CB, Cleanup Beads)
- Soluție tampon de resuspensie (RSB, Resuspension Buffer)
- Etanol de 80% proaspăt preparat (EtOH)
- Placă de depozitare cu godeuri adânci, din polipropilenă, cu 96 de godeuri de 0,8 ml (placă MIDI)
- Placă PCR pentru 96 de godeuri
- Suport magnetic pentru placa MIDI
- Suport magnetic pentru placa PCR
- Eprubete de 1,5 ml pentru microcentrifugă
- Apă fără nucleaze

### Despre reactivi

- Bile de curățare
  - Agitați înainte de fiecare utilizare.
  - Agitați frecvent pentru a vă asigura că bilele sunt distribuite în mod uniform.
  - Aspirați și picurați încet, din cauza vâscozității soluției.

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

| Articol | Depozitare          | Instrucțiuni  |
|---------|---------------------|---|
| CB      | Temperatura camerei | Agitați și răsturnați eprubeta până ce culoarea lichidului este omogenă.            |
| RSB     | între 2°C și 8°C    | Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute. Agitați pentru a amesteca. |

## Procedura

1. Amestecați placa PCR de 96 de godeuri la 1800 rpm timp de 1 minut, apoi centrifugați scurt.
2. Plasați pe un suport magnetic pentru plăci PCR și așteptați până ce lichidul devine clar (1 minut).
3. Agitați CB de 3 ori timp de 10 secunde, apoi răsturnați de mai multe ori pentru a resuspenda.
4. Pentru gADN de înaltă calitate, procedați după cum urmează.
  - a. Adăugați 77 μl apă fără nucleaze în fiecare godeu al unei noi plăci MIDI.
  - b. Adăugați 88 μl CB în fiecare godeu al plăcii MIDI.
  - c. Transferați 45 μl supernatant din fiecare godeu al plăcii PCR în godeul corespunzător al plăcii MIDI.
  - d. Aruncați placa PCR.
  - e. Pipetați în fiecare godeu de 10 ori pentru a amesteca. Ca alternativă, închideți ermetic placa și agitați la 1800 rpm timp de 1 minut.
  - f. Sigilați și incubați la temperatura camerei timp de 5 minute.
  - g. Verificați să nu existe bule de aer. Dacă le observați, răsturnați.
  - h. Plasați pe un suport magnetic pentru plăci MIDI și așteptați până ce lichidul devine clar (5 minute).
  - i. Pe parcursul incubării, agitați temeinic CB, apoi adăugați 20 μl în fiecare godeu al unei noi plăci MIDI.
  - j. Transferați 200 μl supernatant din fiecare godeu al primei plăci MIDI în godeul corespunzător al noii plăcii MIDI (conținând 20 μl CB).
  - k. Aruncați prima placă MIDI.
  - l. Pipetați în fiecare godeu al noii plăci MIDI de 10 ori pentru a amesteca. Ca alternativă, închideți ermetic placa și agitați la 1800 rpm timp de 1 minut.
5. Pentru FFPE extras, procedați după cum urmează.
  - a. Adăugați 81 μl CB în fiecare godeu al unei noi plăci MIDI.
  - b. Transferați 45 μl supernatant din fiecare godeu al plăcii PCR în godeul corespunzător al plăcii MIDI.
  - c. Aruncați placa PCR.
  - d. Pipetați în fiecare godeu de 10 ori pentru a amesteca. Ca alternativă, închideți ermetic placa și agitați la 1800 rpm timp de 1 minut.
6. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute.



7. Verificați să nu existe bule de aer. Dacă le observați, răsturnați.
8. Plasați pe un suport magnetic pentru plăci MIDI și așteptați până ce lichidul devine clar (5 minute).
9. Fără a modifica poziția bilelor, îndepărtați și aruncați supernatantul.
10. Spălați bilele după cum urmează.
  - a. Cu placa pe suportul magnetic, adăugați 200  $\mu$ l EtOH de 80% proaspăt, fără a amesteca.
  - b. Incubați timp de 30 de secunde.
  - c. Fără a modifica poziția bilelor, îndepărtați și aruncați supernatantul.
11. Spălați bilele pentru a **doua** oară.
12. Uscați la aer pe suportul magnetic timp de 5 minute.
13. În timp ce uscați la aer, utilizați o pipetă de 20  $\mu$ l pentru a îndepărta și a arunca EtOH rezidual.
14. Îndepărtați de pe suportul magnetic.
15. Adăugați 17  $\mu$ l RSB la bile.
16. Închideți ermetic placa și agitați la 1800 rpm timp de 2 minute.
17. Incubați la temperatura camerei timp de 2 minute.
18. Verificați să nu existe bule de aer. Dacă le observați, răsturnați.
19. Plasați pe un suport magnetic pentru plăci MIDI și așteptați până ce lichidul devine clar (2 minute).
20. Transferați 15  $\mu$ l supernatant într-o nouă placă PCR de 96 de godeuri.

#### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa și depozitați-o la o temperatură între  $-25^{\circ}\text{C}$  și  $-15^{\circ}\text{C}$  timp de până la 30 de zile.

## Gruparea bibliotecilor pre-îmbogățite

Această etapă combină bibliotecile de ADN cu indexuri unice într-un singur cluster de până la 12 biblioteci.

### Metode de grupare

Puteți grupa în funcție de volum sau masă. Utilizați următorul tabel pentru a determina cea mai bună metodă pentru datele dvs.

Tabelul 2 Metode de grupare recomandate

| Proba introdusă       | Metode de grupare |
|-----------------------|-------------------|
| 10–49 ng gADN         | Masa              |
| 50–1000 ng gADN       | Volum             |
| gADN extras din FFPE  | Masa              |
| gADN extras din sânge | Volum             |

- Îmbogățirea într-un singur plex nu necesită gruparea bibliotecilor pre-îmbogățite. Totuși, poate fi necesară adăugarea de RSB.
- După cuantificarea bibliotecilor pre-îmbogățite, toate tipurile de intrare pot fi grupate în funcție de masă, pentru a obține un echilibru index optim.
- Randamentul final al bibliotecilor pre-îmbogățite generate în soluții experimentale separate poate varia. Prin urmare, gruparea în funcție de masă este recomandată pentru a obține echilibrul index optim.
- Utilizați o îmbogățire într-un singur plex pentru următoarele situații.
  - 10–49 ng gADN
  - 50–1000 ng gADN extras din FFPE
  - Detecție redusă a frecvențelor alelice minore pentru variantele somatice

## Gruparea în funcție de masă

Pentru următoarele situații, cuantificați bibliotecile pentru a utiliza o masă de ADN per bibliotecă, pentru îmbogățirea specificată în [Gruparea bibliotecilor pre-îmbogățite la concentrații egale la pagina 34](#).

- Intrare probă de 10–49 ng gADN
- Intrare probă de 50–1000 ng gADN extras din FFPE
- Detecție redusă a frecvențelor alelice minore pentru variantele somatice
- gADN extras din sânge pentru un echilibru index optim

## Cuantificarea bibliotecilor pre-îmbogățite

1. Analizați 1  $\mu$ l de biblioteci pre-îmbogățite utilizând metoda dvs. de cuantificare preferată bazată pe fluorescență, care utilizează vopsea intercalantă pentru ADN dublu-catenar.
  - Pentru 50–1000 ng de gADN de înaltă calitate, puteți aștepta un randament al bibliotecii pre-îmbogățite  $\geq 500$  ng.
  - Pentru 50–1000 ng gADN extras din FFPE, puteți aștepta un randament al bibliotecii pre-îmbogățite de 500–6000 ng, în funcție de calitatea probei inițiale.

**NOTĂ** Pentru metode de cuantificare cu diferiți factori de confuzie, definiți metoda de cuantificare pentru acest flux de lucru. Rezultatele de concentrații pot varia în funcție de metoda aleasă.

## Gruparea bibliotecilor pre-îmbogățite la concentrații egale

Utilizați următorul tabel pentru a stabili masa de ADN per bibliotecă necesară pentru îmbogățire, în funcție de tipul de probă și plexitatea de îmbogățire. Randamentele optime de îmbogățire și performanța testelor nu sunt garantate dacă se utilizează randamente ale bibliotecilor pre-îmbogățite mai mici decât cele recomandate.

Masa totală de ADN în reacția de îmbogățire nu trebuie să depășească 6000 ng.

| Proba introdusă         | Plexitate de îmbogățire | Masa de ADN per bibliotecă (ng) | Masa totală a bibliotecii de ADN (ng) |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| gADN de înaltă calitate | 12                      | 250–500                         | 3000–6000                             |
| gADN extras din FFPE    | 1                       | 200                             | 200                                   |

- Înregistrați indexurile pentru bibliotecile pe care intenționați să le grupați în această etapă.
- În funcție de concentrația fiecărei biblioteci, calculați volumul care trebuie adăugat în reacția de îmbogățire pentru a ajunge la masa dorită de ADN.
  - gADN de înaltă calitate: calculați volumul bibliotecii necesar pentru intrări 250–500 ng.
  - gADN extras din FFPE: calculați volumul bibliotecii necesar pentru intrări 200 ng.
- Adăugați volumul calculat pentru fiecare bibliotecă în același godeu al plăcii PCR.
- Dacă utilizați gADN de înaltă calitate, efectuați una din următoarele operațiuni, în funcție de volumul total de biblioteci pre-îmbogățite:
  - Dacă volumul bibliotecii pre-îmbogățite = 30 μl, treceți la [Hibridizarea probelor la pagina 36](#).
  - Dacă volumul bibliotecii pre-îmbogățite < 30 μl, adăugați RSB pentru a ajunge la un volum total de 30 μl.
  - Dacă volumul bibliotecii pre-îmbogățite > 30 μl, utilizați o metodă bazată pe bile sau un concentrator cu vacuum, pentru a concentra probele grupate. Adăugați RSB în proba concentrată pentru a ajunge la un volum total de 30 μl.
- Dacă utilizați gADN extras din FFPE, efectuați una din următoarele operațiuni, în funcție de volumul total de biblioteci pre-îmbogățite:
  - Dacă volumul bibliotecii pre-îmbogățite = 7,5 μl, treceți la [Hibridizarea probelor la pagina 36](#).
  - Dacă volumul bibliotecii pre-îmbogățite < 7,5 μl, adăugați RSB pentru a ajunge la un volum total de 7,5 μl.

## PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa și depozitați-o la o temperatură cuprinsă între -25°C și -15°C timp de până la 30 de zile.

## Gruparea în funcție de volum

Atunci când intrarea este de 50–1000 ng gADN, cuantificarea și normalizarea bibliotecilor individuale generate în cadrul aceluiași experiment nu este necesară.

Pentru a atinge performanțe optime, grupați doar probe de biblioteci pre-îmbogățite preparate de același utilizator, cu același lot de reactivi și aceeași placă adaptor index.

- Înregistrați indexurile pentru bibliotecile pe care intenționați să le grupați în această etapă.
- Combinați următoarea bibliotecă pre-îmbogățită și volume RSB pentru plexitatea de îmbogățire, în același godeu al unei noi plăci PCR.

Volumul care rezultă este de 30  $\mu$ l.

| Plexitate de îmbogățire * | Fiecare volum de bibliotecă pre-îmbogățită ( $\mu$ l) | Volum RSB ( $\mu$ l) |
|---------------------------|---|----------------------|
| 1 plex                    | 14  | 16                   |
| 2 plexuri                 | 14  | 2                    |
| 3 plexuri                 | 10  | 0                    |
| 4 plexuri                 | 7,5   | 0                    |
| 5 plexuri                 | 6   | 0                    |
| 6 plexuri                 | 5   | 0                    |
| 7 plexuri                 | 4,2   | 0,6                  |
| 8 plexuri                 | 3,7   | 0,4                  |
| 9 plexuri                 | 3,3   | 0,3                  |
| 10 plexuri                | 3   | 0                    |
| 11 plexuri                | 2,7   | 0,3                  |
| 12 plexuri                | 2,5   | 0                    |

\*Pentru informații privind plexitățile non-standard (de la 2 până la 11 plexuri), consultați [Limitări ale procedurii la pagina 2](#).

### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa și depozitați-o la o temperatură cuprinsă între -25°C și -15°C timp de până la 30 de zile.

## [Opțional] Calificarea bibliotecilor pre-îmbogățite

Dacă gruparea se va face în funcție de volum, pentru a cuantifica bibliotecile pre-îmbogățite, utilizați o metodă bazată pe fluorometrie care utilizează vopsea intercalantă pentru ADN dublu-catenar. Pentru a califica bibliotecile pre-îmbogățite, utilizați un analizator de fragmente ADN cu un kit de analiză a fragmentelor adecvat.

Utilizați  $\leq 1 \mu$ l în total pentru calificarea bibliotecilor. Bibliotecile pre-îmbogățite sunt suficient de concentrate pentru a permite diluții mici pentru cuantificare sau analiza fragmentelor.

## Hibridizarea probelor

Această etapă leagă regiunile țintă ale ADN-ului cu probe de captură.

Reactivii din kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sunt compatibili cu paneluri de oligonucleotide ADN de îmbogățire atât de la Illumina, cât și de la terți. Pentru informații cu privire la specificațiile necesare privind panelurile de la terți, consultați [Cerințe pentru panelul de îmbogățire a probelor la pagina 10](#).

## Consumabile

- Tampon de îmbogățire Hyb 2 (Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2))
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (capacul albastru)
- Panel de îmbogățire a probelor
- Placă PCR pentru 96 de godeuri
- Sigiliu adeziv
- Pregătirea pentru proceduri ulterioare:
  - Bile magnetice Streptavidin (Streptavidin Magnetic Beads (SMB3))
  - Tampon de spălare pentru amplificare (Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)) (capacul auriu)

## Despre reactivi

- NHB2 precipită și se separă pe parcursul depozitării.
- Panelul de îmbogățire a probelor se referă la panelul de oligonucleotide de îmbogățire ales de la Illumina.

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

| Articol                        | Depozitare                      | Instrucțiuni   |
|--------------------------------|---------------------------------|--|
| EHB2                           | între 2°C și 8°C                | Aduceți la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca. Dacă se observă cristalizarea sau tulburarea soluției, repetați agitarea sau pipetați în sus și în jos pentru a amesteca, până ce soluția devine clară. |
| Panel de îmbogățire a probelor | între -25°C și -15°C (Illumina) | Atât panelurile Illumina, cât și ale terților vor fi aduse la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca.  |

| Articol                    | Depozitare           | Instrucțiuni   |
|----------------------------|----------------------|--|
| NHB2<br>(capacul albastru) | între -25°C și -15°C | <p>A se dezgheța la temperatura camerei.</p> <p>Atunci când au fost aduse la temperatura camerei, preîncălziți într-un incubator de microprobe la aceeași temperatură ca a probei pe care o utilizați, timp de 5 minute.</p> <p>Agitați la viteza maximă de 3 ori, timp de 10 secunde fiecare, pentru a resuspenda.</p> <p>Centrifugați scurt.</p> <p>Pipetați în sus și în jos de pe fundul eprubetei.</p> <p>Dacă se observă cristalizarea sau tulburarea soluției, repetați agitarea sau pipetați în sus și în jos pentru a amesteca, până ce soluția devine clară.</p> <p>Utilizați soluția cât timp este caldă, pentru a evita formarea precipitatelor.</p> |
| SMB3*                      | între 2°C și 8°C     | <p>Dacă treceți la următoarea procedură imediat după cele 90 de minute de menținere în programul HYB, aduceți la temperatura camerei timp de cel puțin 2 ore înainte de a demara programul HYB.</p>  |
| EEW*<br>(eprubeta aurie)   | între -25°C și -15°C | <p>Dacă treceți la următoarea procedură imediat după cele 90 de minute de menținere în programul HYB, aduceți la temperatura camerei timp de cel puțin 2 ore înainte de a demara programul HYB.</p> <p>După aducerea la temperatura camerei, preîncălziți într-un incubator de microprobe până la temperatura de hibridizare și capturare aplicabilă timp de 30 de minute înainte de terminarea programului HYB.</p>   |

\*Dacă vă opriți înainte de următoarea procedură, amânați prepararea acestui reactiv până ce ajungeți la procedura respectivă.

2. Păstrați următorul program HYB pe un ciclor termic, utilizând numărul adecvat de cicluri, indicat în [Tabelul 3](#).

- Alegeți opțiunea de capac preîncălzit și setați la 100°C
- Setați volumul de reacție
  - [gADN de înaltă calitate] 100 µl
  - [gADN extras din FFPE] 25 µl
- 98°C timp de 5 minute
- X cicluri de 1 minut fiecare, începând la 98°C pentru primul ciclu, apoi scăzând 2°C per ciclu
- Mențineți timp de 90 de minute la temperatura aplicabilă:
  - [gADN extras din FFPE] 58°C
  - [80 mer paneluri de probe] 58°C
  - [Variante somatice] 58°C
  - [Toate celelalte] 62°C

Timpul total de rulare este de ~115 minute.

Tabelul 3 Numărul de cicluri per probă sau panel

| Tipul probei și al panelului                         | Numărul de cicluri (X) |
|--|------------------------|
| gADN extras din FFPE (indiferent de tipul de panel)  | 20                     |
| 80 mer paneluri probe (indiferent de tipul de probă) | 20                     |
| Variante somatice                                    | 20                     |
| Toate celelalte probe și paneluri                    | 18                     |

## Procedura

1. [gADN de înaltă calitate] Adăugați următorii reactivi *în ordinea precizată* în fiecare cluster de biblioteci din placa PCR.  
Nu creați un amestec master. Crearea unei amestec master de NHB2 și EHB2 afectează în mod negativ performanța de îmbogățire.
  - NHB2 (capac albastru) (50 µl)
  - Panel de îmbogățire a probelor (10 µl)
  - EHB2 (10 µl)
2. [gADN de înaltă calitate] Utilizând o pipetă setată la 90 µl, pipetați fiecare godeu de 10 ori pentru a amesteca.
3. [gADN extras din FFPE] Adăugați următorii reactivi *în ordinea precizată* în fiecare cluster de biblioteci din placa PCR.  
Nu creați un amestec master. Crearea unei amestec master de NHB2 și EHB2 afectează în mod negativ performanța de îmbogățire.

- NHB2 (capac albastru) (12,5 µl)
  - Panel de îmbogățire a probelor (2,5 µl)
  - EHB2 (2,5 µl)
4. **[gADN extras din FFPE]** Utilizând o pipetă setată la 20 µl, pipetați fiecare godeu de 10 ori pentru a amesteca.
  5. Închideți ermetic placa și centrifugați la 280 × g timp de 10 secunde.
  6. Plasați placa de probe pe ciclul termic programat anterior și rulați programul HYB.
  7. Treceți imediat la următoarea procedură atunci când perioada de menținere a temperaturii a programului HYB se încheie.

**ATENȚIE**

Se vor produce precipitări dacă temperatura reacției de hibridizare scade sub temperatura camerei.

## Captura probelor hibridizate

Această etapă presupune utilizarea bilelor magnetice Streptavidin (Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)) pentru a captura probele hibridizate în regiunile țintă de interes.

### Consumabile

- Tampon de spălare pentru amplificare (Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)) (capacul auriu)
- Tampon de eluare pentru îmbogățire 1 (Enrichment Elution Buffer 1 (EE1))
- Tampon de eluare țintă (Elute Target Buffer 2 (ET2))
- HP3 (2N NaOH)
- Bile magnetice Streptavidin (Streptavidin Magnetic Beads (SMB3))
- Eprubetă de microcentrifugă de 1,5 ml
- Placă MIDI pentru 96 de godeuri
- Placă PCR pentru 96 de godeuri
- Sigiliu adeziv
- Suport magnetic pentru placa MIDI
- Pregătirea pentru proceduri ulterioare:
  - Amestec PCR îmbunătățit (Enhanced PCR Mix (EPM))
  - PCR Primer Cocktail (PPC)



## Despre reactivi

- EEW
  - Asigurați-vă că EEW a fost decongelat la temperatura camerei timp de cel puțin 2 ore înainte de a fi preîncălzit într-un incubator de microprobe.
  - Asigurați-vă că EEW a fost încălzit într-un incubator de microprobe timp de 30 de minute înainte de încheierea programului HYB.
  - Lăsați EEW în incubatorul de microprobe atunci când nu este utilizat. EEW trebuie să rămână încălzit pe parcursul protocolului.
  - Poate avea un aspect tulbure după ce ajunge la temperatura camerei.
  - Poate părea de culoare galbenă.
- SMB3
  - SMB3 trebuie să fie la temperatura camerei înainte de utilizare.

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile.

| Articol                 | Depozitare               | Instrucțiuni   |
|-------------------------|--------------------------|--|
| SMB3                    | între 2°C și 8°C         | Lăsați să stea timp de 2 ore pentru a ajunge la temperatura camerei. Răsturnați eprubeta, apoi amestecați până la resuspendare completă.   |
| EEW<br>(eprubeta aurie) | între<br>-25°C și -15°C  | După 2 ore de incubare la temperatura camerei, preîncălziți într-un incubator de microprobe până la hibridizarea aplicabilă și capturați temperatura timp de 30 de minute înainte de terminarea programului HYB. |
| EE1                     | între<br>-25°C și -15°C  | Decongelați la temperatura camerei, apoi amestecați.   |
| HP3                     | între<br>-25°C și -15°C  | Decongelați la temperatura camerei, apoi amestecați.   |
| ET2                     | între 2°C și 8°C         | Aduceți la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca.   |
| EPM                     | între<br>-25°C și -15°C  | Decongelați pe gheață timp de 1 oră. Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați scurt. Puneți deoparte pe gheață.   |
| PPC                     | între -<br>25°C și -15°C | Decongelați pe gheață timp de 1 oră. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp. Puneți deoparte pe gheață.  |

2. Preîncălziți un incubator de microprobe cu un bloc încălzit MIDI pentru a incuba aceeași placă la una dintre temperaturile următoare. Un al doilea incubator de microprobe, opțional, poate fi utilizat pentru a preîncălzi EEW. Așezați EEW pe blocul încălzit MIDI:
  - [FFPE] 58°C

- [80 mer per paneluri de probe] 58°C
- [Variante somatice] 58°C
- [Toate celelalte] 62°C

## Procedura

### Captura

1. Adăugați SMB3 în godeul corespunzător al unei plăci MIDI noi după cum urmează.
  - **[gADN de calitate înaltă]** Adăugați 250 μl SMB3.
  - **[gADN extras din FFPE]** Adăugați 62,5 μl SMB3.
2. Utilizând o pipetă setată la 100 μl pentru gADN de calitate înaltă sau la 25 μl pentru FFP, transferați fiecare bibliotecă grupată din placa PCR de 96 de godeuri în godeul corespunzător al noii plăci MIDI.
3. Închideți ermetic placa și agitați la 1200 rpm timp de 4 minute.
4. Dacă se produc stropiri, centrifugați placa pentru scurt timp.
5. Poziționați placa de biblioteci grupate pe blocul încălzit MIDI în incubatorul de microprobe, sub tubul EEW, închideți capacul, apoi incubați timp de 15 minute la temperatura aplicabilă:
  - [FFPE] 58°C
  - [80 mer panel de probe] 58°C
  - [Variante somatice] 58°C
  - [Toate celelalte] 62°C
6. Îndepărtați placa de biblioteci grupate și centrifugați la 280 × g timp de 30 de secunde.
7. Plasați imediat pe un suport magnetic pentru plăci MIDI și așteptați până ce lichidul devine clar (2 minute).
8. **[gADN de calitate înaltă]** Utilizând o pipetă setată la 200 μl, îndepărtați și aruncați supernatantul din fiecare godeu fără a modifica poziția bilelor.
9. **[gADN extras din FFPE]** Utilizând o pipetă setată la 90 μl, îndepărtați și aruncați tot supernatantul din fiecare godeu fără a perturba peleții de bile.
10. Îndepărtați și aruncați supernatantul care a rămas.

### Spălați

1. Îndepărtați de pe suportul magnetic.
2. **[gADN de calitate înaltă]** Îndepărtați rapid EEW din incubatorul de microprobe și adăugați 200 μl în fiecare godeu.
3. **[gADN extras din FFPE]** Îndepărtați rapid EEW din incubatorul de microprobe și adăugați 50 μl în fiecare godeu.
4. Reintroduceți EEW nefolosit în incubatorul de microprobe și păstrați-l încălzit.

5. Sigilați și amestecați la 1800 rpm timp de 4 minute.
6. Poziționați placa de probe pe blocul încălzit MIDI în incubatorul de microprobe, sub tubul EEW, închideți capacul, apoi incubați timp de 5 minute la temperatura aplicabilă:
  - [FFPE] 58°C
  - [80 mer paneluri de probe] 58°C
  - [Variante somatice] 58°C
  - [Toate celelalte] 62°C
7. Plasați imediat pe un suport magnetic pentru plăci MIDI și așteptați până ce lichidul devine clar (2 minute).
8. Utilizând o pipetă setată la 200 μl pentru gADN de înaltă calitate sau 50 μl pentru FFPE, îndepărtați și aruncați tot supernatantul din fiecare godeu.
9. Repetați etapele 1–8 de două ori pentru un total de trei spălări.

### Spălarea transferului

1. Îndepărtați de pe suportul magnetic.
2. [gADN de înaltă calitate ] Îndepărtați rapid EEW din incubatorul de microprobe și adăugați 200 μl în fiecare godeu.
3. [gADN extras din FFPE] Îndepărtați rapid EEW din incubatorul de microprobe și adăugați 50 μl în fiecare godeu.
4. Sigilați și amestecați la 1800 rpm timp de 4 minute. Dacă se produc stropiri, reduceți viteza la 1600 rpm.
5. Transferați soluția de bile resuspendate pe o nouă placă MIDI.

Unele probe pot rămâne în godeuri.



#### ATENȚIE

Transferul reactivului reduce riscul de a păstra reactivi reziduali care pot inhiba reacția PCR din aval.

6. Poziționați placa de probe pe blocul încălzit MIDI în incubatorul de microprobe, închideți capacul, apoi incubați timp de 5 minute la temperatura aplicabilă:
  - [FFPE] 58°C
  - [80 mer paneluri de probe] 58°C
  - [Variante somatice] 58°C
  - [Toate celelalte] 62°C
7. Plasați imediat pe un suport magnetic pentru plăci MIDI și așteptați până ce lichidul devine clar (2 minute).
8. Utilizând o pipetă setată la 200 μl pentru gADN de înaltă calitate sau 50 μl pentru FFPE, îndepărtați și aruncați tot supernatantul din fiecare godeu.
9. Centrifugați placa la 280 × g timp de 30 de secunde.
10. Plasați pe un suport magnetic pentru plăci MIDI timp de 10 secunde.

11. Utilizați o pipetă de 20  $\mu$ l pentru a îndepărta și a arunca lichidul rezidual din fiecare godeu.
12. Treceți imediat la etapa [Eluați la pagina 44](#) pentru a preveni uscarea excesivă a bilelor și pierderile de randament al bibliotecilor.

## Eluați

1. Combinați următoarele volume pentru a prepara amestecul de eluare (Elution Master Mix). Înmulțiți fiecare volum cu numărul de biblioteci care sunt procesate.
  - EE1 (28,5  $\mu$ l)
  - HP3 (1,5  $\mu$ l)Surplusul de reactiv este inclus în volum.
2. Agitați și apoi centrifugați scurt.
3. Îndepărtați placa MIDI de pe suportul magnetic.
4. Adăugați 23  $\mu$ l din amestecul de eluare în fiecare godeu.
5. Sigilați placa și amestecați la 1800 rpm timp de 2 minute.
6. Incubați placa la temperatura camerei timp de 2 minute.
7. Centrifugați la 280  $\times$  g timp de 30 de secunde.
8. Plasați pe un suport magnetic pentru plăci MIDI și așteptați până ce lichidul devine clar (2 minute).
9. Transferați 21  $\mu$ l supernatant din placa MIDI în godeul corespunzător al unei noi plăci PCR cu 96 de godeuri.
10. Aruncați placa MIDI.
11. Adăugați 4  $\mu$ l ET2 în fiecare godeu care conține 21  $\mu$ l de supernatant.
12. Setati pipeta la 20  $\mu$ l și pipetați ușor în fiecare godeu de 10 ori pentru a amesteca.
13. Închideți ermetic placa și apoi centrifugați la 280  $\times$  g timp de 10 secunde.
14. Incubați placa la temperatura camerei timp de 1 minut.

## Amplificarea bibliotecii îmbogățite

Această etapă utilizează PCR pentru a amplifica biblioteca îmbogățită.

### Consumabile

- EPM (Enhanced PCR Mix, Amestec PCR îmbunătățit)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Sigiliu adeziv

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

| Articol | Depozitare           | Instrucțiuni   |
|---------|----------------------|--|
| EPM     | între -25°C și -15°C | Decongelați la 4°C sau pe gheață timp de 1 oră. Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați scurt. Puneți deoparte pe gheață.          |
| PPC     | între -25°C și -15°C | Decongelați la 4°C sau pe gheață timp de 1 oră. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp. Puneți deoparte pe gheață. |

2. Păstrați următorul program AMP pe un ciclor termic, utilizând numărul adecvat de cicluri PCR, care este indicat în tabelul de mai jos.

- Alegeți opțiunea de capac preîncălzit și setați la 100°C
- Setați volumul de reacție la 50 µl
- 98°C timp de 45 de secunde
- (X) cicluri de:
  - 98°C timp de 30 de secunde
  - 60°C timp de 30 de secunde
  - 72°C timp de 30 de secunde
- 72°C timp de 5 minute
- Păstrați la 10°C

Timpul total de funcționare este de ~35 de minute.

| Tipul probei și al panelului                              | (X) Cicluri        |
|---|--------------------|
| FPPE  | 14                 |
| Illumina Exome Panel (CEX) pentru gADN de înaltă calitate | 10                 |
| Illumina Exome Panel (CEX) pentru FFPE                    | 12                 |
| Toate celelalte probe și paneluri                         | 12 <sup>1234</sup> |

<sup>1</sup> Poate fi ajustat până la 15 cicluri pentru paneluri mici de la terți prin optimizare subsecventă. Dacă se utilizează FFPE, numărul de cicluri poate fi ajustat până la 17.

<sup>2</sup> Poate fi ajustat până la 17 cicluri pentru paneluri de la terți care au doar 500 probe. Dacă se utilizează FFPE, numărul de cicluri poate fi ajustat până la 19.

<sup>3</sup> Poate fi ajustat până la 14 cicluri pentru probe FFPE.

<sup>4</sup> Creșterea numărului de cicluri PCR poate duce la o rată mai mare a duplicărilor și la dimensiuni mai mici ale fragmentelor pentru probele FFPE.

## Procedura

1. Adăugați 5  $\mu$ l PPC la fiecare godeu.
2. Adăugați 20  $\mu$ l EPM la fiecare godeu.
3. Sigilați placa și amestecați la 1200 rpm timp de 1 minut.
4. Centrifugați placa la  $280 \times g$  timp de 10 secunde.
5. Plasați pe ciclul termic programat anterior și rulați programul AMP.

## PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, depozitați la o temperatură între 2°C și 8°C timp de până la două zile. Ca alternativă, lăsați pe ciclul termic până la 24 de ore.

## Curățarea bibliotecii îmbogățite amplificate

Această etapă utilizează bile de curățare (Cleanup Beads) pentru a purifica librăria îmbogățită și pentru a îndepărta produsele nedorite.

## Consumabile

- Bile de curățare (CB, Cleanup Beads)
- Soluție tampon de resuspensie (RSB, Resuspension Buffer)
- Etanol de 80% proaspăt preparat (EtOH)
- Sigilii adezive
- Placă MIDI pentru 96 de godeuri
- Placă PCR pentru 96 de godeuri
- Suport magnetic pentru placa MIDI

## Despre reactivi

- Bile de curățare
  - Agitați înainte de fiecare utilizare.
  - Agitați frecvent pentru a vă asigura că bilele sunt distribuite în mod uniform.
  - Aspirați și picurați încet, din cauza vâscozității soluției.

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile.

| Articol | Depozitare          | Instrucțiuni   |
|---------|---------------------|--|
| CB      | Temperatura camerei | Agitați și răsturnați eprubeta până ce culoarea lichidului este omogenă. |
| RSB     | între 2°C și 8°C    | Aduceți la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca.               |

- Pregătiți EtOH de 80% din etanol absolut.

## Procedura

- Centrifugați placa PCR la 280 × g timp de 10 secunde.
- Agitați CB de 3 ori, timp de 10 secunde, apoi răsturnați.
- Adăugați 40,5 μl CB în fiecare godeu al unei noi **plăci** MIDI.
- Transferați 45 μl din fiecare godeu al plăcii PCR în godeul corespunzător al plăcii MIDI.
- Închideți ermetic placa și agitați la 1800 rpm timp de 1 minut.
- Incubați placa MIDI la temperatura camerei timp de 5 minute.
- Centrifugați la 280 × g timp de 10 secunde.
- Plasați pe un suport magnetic pentru plăci MIDI și așteptați până ce lichidul devine clar (5 minute).
- Utilizând o pipetă setată la 95 μl, îndepărtați și aruncați tot supernatantul din fiecare godeu.
- Spălați de două ori, după cum urmează.
  - Cu placa pe suportul magnetic, adăugați 200 μl EtOH de 80% proaspăt, fără a amesteca.
  - Incubați timp de 30 de secunde.
  - Fără a modifica poziția bilelor, îndepărtați și aruncați supernatantul.
- Uscați la aer pe suportul magnetic timp de 5 minute.
- În timp ce uscați la aer, utilizați o pipetă de 20 μl pentru a îndepărta și arunca EtOH rezidual din fiecare godeu.
- Îndepărtați suportul magnetic și adăugați 32 μl RSB în fiecare godeu.
- Închideți ermetic placa și agitați la 1800 rpm timp de 1 minut.
- Incubați placa la temperatura camerei timp de 5 minute.
- Centrifugați la 280 × g timp de 10 secunde.
- Plasați pe un suport magnetic pentru plăci MIDI și așteptați până ce lichidul devine clar (2 minute).
- Transferați 30 μl supernatant din placa MIDI de 96 de godeuri în godeul corespunzător al unei plăci PCR noi.
- Aruncați placa MIDI.

## PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa și depozitați-o la o temperatură între -25°C și -15°C timp de până la 7 zile.

## Verificați bibliotecile îmbogățite

Pentru a cuantifica gADN dublu catenar introdus, utilizați o metodă bazată pe fluorescență care utilizează vopsea intercalată. Evitați metodele care utilizează acizi nucleici totali, ca de exemplu NanoDrop sau alte metode de absorbție UV.

1. Amplificați 1 μl de bibliotecă îmbogățite utilizând metoda dvs. de cuantificare.

**NOTĂ** Molaritatea totală a probei influențează în mod proporțional randamentul post-îmbunătățire al bibliotecii.

Este de așteptat o dimensiune medie a fragmentelor de 125–235 bp și o distribuire a fragmentelor ADN într-o gamă de dimensiuni care variază de la ~200 bp la ~1000 bp.

## Diluați bibliotecile până la concentrația de începere.

Această etapă diluează bibliotecile până la concentrația de începere pentru sistemul dvs. de secvențiere și este prima etapă a diluției în serie. După diluarea la concentrația de începere, bibliotecile sunt gata pentru a fi denaturate și diluate la concentrația de încărcare finală.

Pentru secvențiere, indiferent de panelul de probe de îmbogățire pe care îl utilizați, Illumina recomandă inițierea unei rulări cu secvențiere la ambele capete, de 151 de cicluri per citire (2 × 151) și 10 cicluri per citire index. Dacă doriți mai puține citiri care se suprapun sau mai puțină acoperire neprelucrată, puteți secvenția până la 2 × 126 sau 2 × 101.

1. Calculați valoarea molarității bibliotecii sau bibliotecilor reunite utilizând următoarea formulă.

- Pentru bibliotecile calificate pe un analizator de fragmente ADN, utilizați dimensiunea medie obținută pentru bibliotecă.
- Pentru toate celelalte metode de calificare, utilizați 350 bp ca dimensiune medie a bibliotecii.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \frac{\text{dimensiunea medie a bibliotecii (bp)}}{a \text{ bibliotecii (bp)}}} = \text{Molaritate (nM)}$$

De exemplu, dacă concentrația bibliotecii este de 20 ng/μl și dimensiunea medie este de 350 bp, valoarea rezultantă a molarității este de 86,58 nM.

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

2. Utilizând valoarea molarității, calculați volumele de RSB și bibliotecă necesară pentru a dilua bibliotecile la concentrația de început pentru sistemul dvs.

| Sistemul de secvențiere | Volumul minim cerut al bibliotecii (μl) | Concentrația de început (nM) | Concentrația de încărcare finală (pM) |
|-------------------------|---|------------------------------|---------------------------------------|
| NextSeq 550Dx           | 10                                      | 2                            | 1,2                                   |



| Sistemul de secvențiere | Volumul minim cerut al bibliotecii (μl) | Concentrația de început (nM) | Concentrația de încărcare finală (pM) |
|-------------------------|---|------------------------------|---------------------------------------|
| MiSeqDx                 | 5                                       | 4                            | 11                                    |
| NovaSeq 6000Dx          | 150 (S2) sau 310 (S4)                   | 1,75                         | 350                                   |

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM este concentrația de pornire pentru o concentrație finală de încărcare de 350 pM. Dacă este necesar, ajustați concentrația finală de încărcare utilizând următorul tabel.

| Concentrația de încărcare finală (pM) | Concentrația bibliotecilor grupate (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. Diluați bibliotecile utilizând RSB:

- **Bibliotecile cuantificate ca cluster de biblioteci multiplexate**—Diluați clusterul până la concentrația de începere pentru sistemul dvs.
- **Bibliotecile cuantificate individual**—Diluați fiecare bibliotecă până la concentrația de începere pentru sistemul dvs. Adăugați 10 μl din fiecare bibliotecă diluată într-o eprubetă pentru a crea un cluster de biblioteci multiplexate.

4. Urmăriți instrucțiunile de denaturare și diluare pentru sistemul dvs. pentru a dilua la concentrația finală de încărcare.

- Pentru sistemul NextSeq 550Dx, consultați [Prepararea secvențierii prin NextSeq 550Dx la pagina 50](#).
- Pentru Sistemul MiSeqDx, consultați [Prepararea secvențierii prin MiSeqDx la pagina 51](#).
- Pentru Sistemul NovaSeq 6000Dx, consultați [Prepararea secvențierii prin NovaSeq 6000Dx la pagina 53](#).

Concentrațiile finale de încărcare sunt un punct de începere și reprezintă ghiduri generale. Optimizați concentrațiile pentru fluxul dvs. de lucru și metoda de cuantificare referitoare la rulările de secvențiere subsecvente sau prin titrare Flow Cell.

## Prepararea secvențierii prin NextSeq 550Dx

Utilizați următoarele instrucțiuni pentru denaturarea și diluarea bibliotecilor pentru secvențiere cu sistemul de secvențiere NextSeq 550Dx.

### Consumabile

- Tampon de hibridizare (Hybridization Buffer, HT1)
- 1N NaOH
- 200 mM Tris-HCl, pH7

### Pregătirea

Preparați o soluție *proaspăt* diluată de 0,2N NaOH pentru a denatura bibliotecile pentru secvențiere. Pentru a preveni ca micile erori de pipetare să afecteze concentrația finală de NaOH, preparați un volum suplimentar.



#### ATENȚIE

O soluție proaspăt diluată de 0,2N NaOH este esențială pentru procesul de denaturare. Denaturarea inadecvată poate reduce randamentul.

1. Combinați următoarele volume într-o eprubetă de microcentrifugă pentru a dilua 1N NaOH la 0,2N NaOH
1. Pregătiți următoarele consumabile.

| Articol | Depozitare              | Instrucțiuni   |
|---------|-------------------------|--|
| HT1     | între<br>-25°C și -15°C | A se dezgheța la temperatura camerei. Păstrați la 2-8°C până puteți dilua bibliotecile denaturate. |

2. Combinați următoarele volume într-o eprubetă de microcentrifugă pentru a prepara o diluție proaspătă de NaOH:
  - Apă de laborator (800 μl)
  - 1N NaOH (200 μl)
 Rezultatul este 1 ml 0,2N NaOH.
3. Răsturnați eprubeta de câteva ori pentru a amesteca.
4. Combinați următoarele volume într-o eprubetă de microcentrifugă pentru a prepara 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.
  - Apă de laborator (800 μl)
  - 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 μl)
 Rezultatul este 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

**NOTĂ** Păstrați eprubeta acoperită. Utilizați diluția proaspătă în termen de **12 ore**.

## Denaturarea bibliotecilor

1. Combinați următoarele volume de bibliotecă și 0,2N NaOH proaspăt diluat într-o eprubetă de microcentrifugă.
  - 10  $\mu$ l bibliotecă
  - 10  $\mu$ l 0,2N NaOH
2. Agitați pentru scurt timp, apoi centrifugați la 280  $\times$  g timp de 1 minut.
3. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute.
4. Adăugați 10  $\mu$ l 200 mM Tris-HCl, pH 7.

## Diluți bibliotecile denaturate până la 20 pM

1. Adăugați 970  $\mu$ l HT1 pre-răcit în eprubeta care conține bibliotecile denaturate. Rezultatul este o bibliotecă denaturată de 20 pM.
2. Agitați pentru scurt timp, apoi centrifugați la 280  $\times$  g timp de 1 minut.
3. Puneți bibliotecile de 20 pM pe gheață până când sunteți gata să treceți la diluția finală.

## Diluți bibliotecile până la concentrația de încărcare.

1. Adăugați următoarele volume pentru a dilua soluția de biblioteci denaturată de 20 pM până la 1,2 pM.
  - Soluție de biblioteci denaturată (78  $\mu$ l)
  - HT1 pre-răcit (1222  $\mu$ l)Volumul total este de 1,3 ml la 1,2 pM.
2. Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați în reprize scurte.
3. Treceți la secvențiere. Pentru instrucțiuni, consultați *Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx* (nr. document 1000000009513).

## Prepararea secvențierii prin MiSeqDx

Utilizați următoarele instrucțiuni pentru denaturarea și diluarea bibliotecilor pentru secvențiere cu sistemul de secvențiere MiSeqDx.

### Consumabile

- Tampon de hibridizare (Hybridization Buffer, HT1)
- 1N NaOH

### Pregătirea

Preparați o soluție *proaspăt* diluată de 0,2N NaOH pentru a denatura bibliotecile pentru secvențiere. Pentru a preveni ca micile erori de pipetare să afecteze concentrația finală de NaOH, preparați un volum suplimentar.

**ATENȚIE**

O soluție proaspăt diluată de 0,2N NaOH este esențială pentru procesul de denaturare. Denaturarea inadecvată poate reduce randamentul.

1. Combinați următoarele volume într-o eprubetă de microcentrifugă pentru a dilua 1N NaOH la 0,2N NaOH
1. Pregătiți următoarele consumabile.

| Articol | Depozitare           | Instrucțiuni   |
|---------|----------------------|--|
| HT1     | între -25°C și -15°C | A se dezgheța la temperatura camerei. Păstrați la 2-8°C până puteți dilua bibliotecile denaturate. |

2. Combinați următoarele volume într-o eprubetă de microcentrifugă pentru a prepara o diluție proaspătă de NaOH:
  - Apă de laborator (800 μl)
  - 1N NaOH (200 μl)
 Rezultatul este 1 ml 0,2N NaOH.

**NOTĂ** Păstrați eprubeta acoperită. Utilizați diluția proaspătă în termen de **12 ore**.

**Denurați o Bibliotecă 4 nM**

1. Combinați următoarele volume într-o eprubetă de microcentrifugă.
  - bibliotecă 4 nM (5 μl)
  - 0,2N NaOH (5 μl)
2. Agitați pentru scurt timp, apoi centrifugați la 280 × g timp de 1 minut.
3. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute.
4. Adăugați 990 μl HT1 pre-răcit în eprubeta care conține biblioteca denaturată.  
Rezultatul este 1 ml de bibliotecă denaturată de 20 pM.

**Diluati biblioteca denaturată de 20 pM**

1. Diluați până la concentrația dorită utilizând următoarele volume.

| Concentrație            | 6 pM   | 8 pM   | 10 pM  | 11 pM  | 12 pM  | 15 pM  | 20 pM  |
|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>Bibliotecă 20 pM</b> | 180 μl | 240 μl | 300 μl | 330 μl | 360 μl | 450 μl | 600 μl |
| <b>HT1 pre-răcit</b>    | 420 μl | 360 μl | 300 μl | 270 μl | 240 μl | 150 μl | 0 μl   |

2. Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați în reprize scurte.
3. Treceți la secvențiere. Pentru instrucțiuni, consultați *Ghidul de referință al instrumentului MiSeqDx pentru MOS v4 (nr. document 1000000157953)*.

## Prepararea secvențierii prin NovaSeq 6000Dx

Utilizați următoarele instrucțiuni pentru denaturarea și diluarea bibliotecilor pentru secvențiere cu sistemul de secvențiere NovaSeq 6000Dx.

### Consumabile

- HP3 (2N NaOH)
- Soluție tampon de resuspensie (RSB, Resuspension Buffer)
- 1N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- Eprubetă de bibliotecă NovaSeq 6000Dx

### Pregătirea

Preparați o soluție *proaspăt* diluată de 0,2N NaOH pentru a denatura bibliotecile pentru secvențiere. Pentru a preveni ca micile erori de pipetare să afecteze concentrația finală de NaOH, preparați un volum suplimentar.



#### ATENȚIE

O soluție proaspăt diluată de 0,2N NaOH este esențială pentru procesul de denaturare. Denaturarea inadecvată poate reduce randamentul.

1. Combinați următoarele volume într-o eprubetă de microcentrifugă pentru a dilua 1N NaOH la 0,2N NaOH

Tabelul 4 Mod S2

| Reactiv                 | Volumul pentru o celulă de măsură (μl) | Volumul pentru două celule de măsură (μl) |
|-------------------------|--|---|
| Apă de laborator        | 40                                     | 80  |
| Soluție stoc<br>1N NaOH | 10                                     | 20  |

Aceste volume au ca rezultat 50 μl de 0,2N NaOH pentru o celulă de măsură sau 100 μl de 0,2N NaOH pentru două celule de măsură.

Tabelul 5 Mod S4

| Reactiv                 | Volumul pentru o celulă de măsură (μl) | Volumul pentru două celule de măsură (μl) |
|-------------------------|--|---|
| Apă de laborator        | 80                                     | 160                                       |
| Soluție stoc<br>1N NaOH | 20                                     | 40  |

Aceste volume au ca rezultat 100  $\mu$ l de NaOH 0,2N pentru o celulă de măsură sau 200  $\mu$ l de 0,2N NaOH pentru două celule de măsură.

2. Răsturnați eprubeta de câteva ori pentru a amesteca sau agitați temeinic.

**NOTĂ** Păstrați eprubeta acoperită. Utilizați diluția proaspătă în termen de **12 ore**.

## Crearea unui grup de biblioteci normalizate

Concentrația de încărcare poate varia în funcție de pregătirea bibliotecii, de cuantificare și de metodele de normalizare.

Utilizați următoarele instrucțiuni pentru a normaliza bibliotecile la concentrația corespunzătoare și pentru a le grupa apoi. Bibliotecile secvențiate pe aceeași celulă de măsură (Flow Cell) trebuie combinate într-un singur grup normalizat.

**NOTĂ** Numărul maxim de probe care pot fi rulate pe o bandă cu kitul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este de 192. Limita se datorează numărului total de indexuri UD din setul A și B.

## Normalizarea bibliotecilor pentru grupare

1. Stabiliți concentrația necesară a bibliotecii grupate pe baza concentrației finale de încărcare dorite.
  - Pentru a obține o concentrație finală de încărcare de 350 pM, concentrația necesară a bibliotecii grupate este de 1,75 nM.
  - Pentru a stabili concentrația bibliotecii grupate pentru o concentrație finală de încărcare diferită, consultați [Diluți bibliotecile până la concentrația de începere. la pagina 48](#).
2. Normalizați bibliotecile la concentrația dorită a bibliotecii grupate folosind 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Pentru asistență privind diluarea bibliotecilor la concentrația corespunzătoare, consultați [Calculatorul pentru grupare \(Pooling Calculator\)](#) de pe site-ul web Illumina.

### Concentrații de încărcare recomandate

Concentrația optimă de încărcare a ADN-ului depinde de tipul bibliotecii și de mărimea introdusă. Pentru bibliotecile > 450 bp, pot fi necesare concentrații de încărcare mai mari.

## Grupați bibliotecile normalizate și adăugați Optional PhiX Control

1. Combinați volumul corespunzător al fiecărei biblioteci normalizate într-o nouă eprubetă de microcentrifugă pentru a obține unul dintre următoarele volume finale:

| Mod | Volum final ( $\mu$ l) |
|-----|------------------------|
| S2  | 150                    |
| S4  | 310                    |

2. **[Opțional]** Adăugați controlul spike-in PhiX> nendenurat de 1% după cum urmează.
  - a. Diluați 10 nM PhiX la 2,5 nM utilizând 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
  - b. Adăugați volumul corespunzător de 2,5 nM PhiX nendenurat în eprubeta cu grupul de biblioteci nendenurate.

| Mod | 2,5 nM PhiX nendenurat (μl) | Grup de biblioteci nendenurate (μl) |
|-----|-----------------------------|-------------------------------------|
| S2  | 0,9                         | 150                                 |
| S4  | 1,9                         | 310                                 |

1% este cantitatea recomandată atunci când introduceți control spike-in în PhiX. Pentru bibliotecile cu diversitate redusă, poate fi necesară o cantitate mai mare. Pentru a utiliza un control PhiX cu bibliotecile cu diversitate redusă, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru îndrumare.

## Denaturarea grupului de biblioteci și a controlului PhiX opțional

1. Adăugați 0,2N NaOH în eprubeta cu grupul de biblioteci nendenurate și în PhiX opțional după cum urmează.

| Celulă de măsură | 0,2N NaOH | Grupul de biblioteci nendenurate (μl) | Volumul rezultat            |
|------------------|-----------|---------------------------------------|-----------------------------|
| S2               | 37        | 150                                   | 187 μl sau 187,9 μl cu PhiX |
| S4               | 77        | 310                                   | 387 μl sau 388,9 μl cu PhiX |

2. Puneți capacul și agitați pentru scurt timp.
3. Centrifugați la 280 ×g timp de 1 minut.
4. Incubați la temperatura camerei timp de 8 minute pentru a denatura.
5. Adăugați 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 după cum urmează pentru a neutraliza.

| Mod | 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (μl) | Volumul rezultat            |
|-----|------------------------------|-----------------------------|
| S2  | 38                           | 225 μl sau 225,9 μl cu PhiX |
| S4  | 78                           | 465 μl sau 466,9 μl cu PhiX |

6. Puneți capacul și agitați pentru scurt timp.
7. Centrifugați la 280 ×g timp de 1 minut.
8. Transferați întregul volum al bibliotecii denaturate sau bibliotecă denaturată și PhiX în eprubeta de bibliotecă NovaSeq 6000Dx.
9. Treceți la secvențiere. Pentru instrucțiuni, consultați *Documentația de produs a instrumentului NovaSeq 6000Dx* (nr. document 200010105).

## Depanarea

Utilizați următorul tabel pentru probleme care pot apărea în cadrul fluxului de lucru. Dacă o rulare de secvențiere sau prepararea bibliotecii pentru o probă eșuează de două ori, poate fi necesară o depanare suplimentară.

Contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.

| Observație   | Cauze posibile   | Acțiune recomandată  |
|--|--|--|
| Secvențierea nu trece de Specificațiile de control al calității  | Eroare a utilizatorului sau a echipamentului de laborator în fluxul de lucru al testului | <p>Calificați bibliotecile îmbogățite pentru a asigura un randament adecvat al bibliotecii și o distribuire adecvată a dimensiunilor fragmentelor Repetați prepararea bibliotecilor începând cu una din etapele următoare, în funcție de momentul la care presupuneți că a survenit eroarea. Dacă acest moment este necunoscut, sau dacă au survenit și alte erori, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru a depana rularea.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Resecvențierea bibliotecilor. Consultați <a href="#">Prepararea secvențierii prin NextSeq 550Dx la pagina 50</a>, <a href="#">Prepararea secvențierii prin MiSeqDx la pagina 51</a> sau <a href="#">Prepararea secvențierii prin NovaSeq 6000Dx la pagina 53</a>.</li> <li>• Biblioteci re-îmbogățite. Consultați <a href="#">Hibridizarea probelor la pagina 36</a>.</li> <li>• Începeți pregătirea bibliotecilor de la începutul fluxului de lucru. Consultați <a href="#">Instrucțiuni de utilizare la pagina 21</a>.</li> </ul> |
|  | Probleme ale instrumentelor  | Contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.  |
| Eroare cu generarea FASTQ sau eroare de sistem general de secvențiere (de ex. erori de rețea, erori cu privire la încărcarea/descărcarea reactivilor etc.) | Probleme de software sau instrumente   | <p>Consultați <i>Ghidul software-ului Local Run Manager (nr. document 100000002702)</i> pentru ajutor la generarea FASTQ sau consultați <i>Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000009513)</i>, <i>Ghidul de referință al instrumentului MiSeqDx pentru MOS v4 (nr. document 1000000157953)</i> sau <i>Documentația de produs a instrumentului NovaSeq 6000Dx (nr. document 200010105)</i>.</p> <p>Contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru ajutor suplimentar.</p>   |



| Observație   | Cauze posibile  | Acțiune recomandată   |
|--|---|---|
| Biblioteca ADN nu generează randament suficient pentru încărcarea secvențierii | Specificațiile pentru introducerea probelor nu au fost respectate           | Asigurați-vă că proba a fost introdusă în mod corespunzător și repetați prepararea bibliotecii.<br>Consultați <a href="#">Recomandări cu privire la introducerea de probe la pagina 17</a> .  |
|  | Eroare a utilizatorului sau a echipamentului în fluxul de lucru al testului | Repetăți prepararea bibliotecilor începând cu una din etapele următoare, în funcție de momentul la care presupuneți că a survenit eroarea. Dacă acest moment este necunoscut, sau dacă au survenit și alte erori, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru a depana rularea.<br><br><ul style="list-style-type: none"> <li>• Resecvențierea bibliotecilor. Consultați <a href="#">Prepararea secvențierii prin NextSeq 550Dx la pagina 50</a>, <a href="#">Prepararea secvențierii prin MiSeqDx la pagina 51</a> sau <a href="#">Prepararea secvențierii prin NovaSeq 6000Dx la pagina 53</a>.</li> <li>• Biblioteci re-îmbogățite. Consultați <a href="#">Hibridizarea probelor la pagina 36</a>.</li> <li>• Începeți pregătirea bibliotecilor de la începutul fluxului de lucru. Consultați <a href="#">Instrucțiuni de utilizare la pagina 21</a>.</li> </ul> |
|  | Specificațiile pentru panelul de probe îmbogățite nu au fost respectate     | Asigurați-vă că proba a fost îmbogățită în mod corespunzător și repetați prepararea bibliotecii.<br>Consultați <a href="#">Cerințe pentru panelul de îmbogățire a probelor la pagina 10</a> .   |

## Caracteristici de performanță

Caracteristicile de performanță ale DRAGEN pentru Aplicația Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pentru NovaSeq 6000Dx sunt prezentate în *Broșura instrumentului NovaSeq 6000Dx (nr. document 200025276)*.

### Performanța cu paneluri de exomi

Performanța panelului de exomi a fost testată utilizând cea mai mică (50 ng) și cea mai mare (1000 ng) intrare recomandată de gADN NA12878 de linie celulară Coriell, cu un set cunoscut pentru detectarea variantelor de linie germinală (Coriell platinum genome). Panelul de exomi 1 (45 Mb) și panelul de exomi 2 (36,8 Mb) au fost utilizate drept paneluri reprezentative. Au fost testate 24 de replicare tehnice prin testul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, utilizând panelul de exomi 1 (45 Mb) în două reacții de îmbogățire cu 12 plexuri. Au fost testate

12 replicate tehnice prin testul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, utilizând panelul de exomi 2 (36,8 Mb) într-o singură reacție de îmbogățire cu 12 plexuri. Bibliotecile îmbogățite au fost apoi secvențiate în instrumentul NextSeq 550Dx, cu modulul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

Următorul tabel conține valorile medii ale celei de-a doua secvențieri și parametrii de performanță pentru replicatele tehnice testate cu fiecare panel.

Tabelul 6 Performanța testului cu doua paneluri de exomi

| Panel                      | Îmbogățire cu o singură citire | Uniformitate de acoperire | Mediana lungimii fragmentelor | SNV Recall <sup>1</sup> | SNV Precision <sup>2</sup> | Indel Recall <sup>1</sup> | Indel Precision <sup>2</sup> |
|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Panel de exomi 1 (45 Mb)   | 80%                            | 96%                       | 186 bp                        | 96%                     | 99%                        | 90%                       | 89%                          |
| Panel de exomi 2 (36,8 Mb) | 93%                            | 98%                       | 188 bp                        | 96%                     | 99%                        | 92%                       | 93%                          |

<sup>1</sup>Recall=Pozitive/(adevărat pozitive + fals pozitive)

<sup>2</sup>Precision=Adevărat pozitive/(adevărat pozitive + fals pozitive)

## Limita de detecție

Standardul de referință Horizon HD799 DNA a fost utilizat pentru a testa limita de detecție. HD799 constă din ADN moderat compromis, tratat cu formalină, cu SNV cunoscute în frecvențe alelice care variază între 1–24,5%. S-a utilizat valoarea minimă recomandată pentru intrările de ADN (50 ng) și s-a evaluat rata de detecție pentru SNV-uri cu frecvența alelelor variante (VAF)  $\geq 5,0\%$ . Au fost testate 16 replicate tehnice prin testul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, utilizând fluxul de lucru FFPE, îmbogățite cu un panel de îmbogățire pan-cancer (1,94 Mb) în 16 îmbogățiri (1 plex), apoi secvențiate cu instrumentul NextSeq 550Dx, cu modulul DNA GenerateFASTQ Dx.

Toate probele au corespuns cerințelor de performanță a probei specifice panelului, conform tabelului următor.

Tabelul 7 Performanța probei pentru limita de detecție

| Panel   | Rata de detecție a variantelor pentru SNV cu VAF $\geq 5,0\%$ | Medie Uniformitate de acoperire |
|---|---|---------------------------------|
| Panel de îmbogățire pan-cancer (1,94 Mb, 523 de gene) | 100%  | 99%                             |

## Substanțe care interferează

Impactul substanțelor care pot interfera a fost evaluat în Illumina DNA Prep with Enrichment Dx prin evaluarea performanței testului în prezența unor astfel de substanțe.

### Interferențe în sângele integral

Acetaminofen (medicament, compus exogen), creatinina și trigliceridele (metaboliți endogeni) au fost testate prin introducerea lor în specimene de sânge uman integral, înainte de extracția ADN. Pentru a evalua interferențele rezultate din recoltările de sânge, a fost introdus de asemenea EDTA în speci­menele de sânge integral. De asemenea, pentru a evalua interferențele rezultate din prepararea probelor, a fost adăugat etanol de grad molecular în ADN-ul extras din sângele integral.

Următorul tabel indică concentrațiile test pentru fiecare interferent.

Tabelul 8 Substanțe cu potențiale interferențe și concentrații testate în sânge integral

| Substanță de testare     | Concentrația de testare   |
|--------------------------|---|
| Acetaminofenă            | 15,6 mg/dL*<br>De trei ori mai mare decât cea mai mare concentrație așteptată după o doză terapeutică a medicamentului. |
| Creatinină               | 15 mg/dL*<br>Cea mai mare concentrație observată în populație.  |
| Trigliceride             | 1,5 g/dL*<br>Cea mai mare concentrație observată în populație.  |
| EDTA                     | 6 mg/mL<br>De trei ori concentrația așteptată în sânge, colectat în eprubete EDTA.                                      |
| Etanol de grad molecular | 15% v/v<br>În eluatul post extracție ADN.   |

\*Conform CLSI EP37-ED1:2018

Pentru fiecare substanță de interferență, au fost testate 12 replicate tehnice prin testul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, îmbogățite cu panelul exom 1 (45 Mb) într-o singură îmbogățire (12 plexuri), apoi secvențiate cu instrumentul NextSeq 550Dx, cu modulul DNA GenerateFASTQ Dx.

Pentru substanțele testate, toate cele 12 specimene au îndeplinit cerințele de performanță și nu au fost observate interferențe în performanța testului.

### Interferență în țesutul FFPE

Două probe de țesut colo-rectal FFPE au fost testate în prezența și absența hemoglobinei, la 0,1 mg per secțiune FFPE de 10 μm, pentru a reprezenta cel mai rău scenariu, de contaminare în proporție de 50% a probei de țesut FFPE cu sânge cu nivel înalt de hemoglobină. Speci­menele au fost testate prin testul Illumina DNA Prep

with Enrichment Dx, utilizând panelul de amplificare pan-cancer 1 (1,94 Mb), ca panel reprezentativ în amplificările într-un singur plex. Bibliotecile îmbogățite au fost apoi secvențiate în instrumentul NextSeq 550Dx, cu modulul DNA GenerateFASTQ Dx. Toate specișenele au îndeplinit cerințele de performanță a probei și a fost dovedit faptul că hemoglobina nu interferează cu performanțele de testare.

Pentru a evalua interferențele rezultate din pregătirea probelor, doi compuși exogeni au fost introduși în ADN-ul extras dintr-un fragment de țesut FFPE de cancer de vezică urinară. Substanțele exogene testate sunt soluții de extracție utilizate frecvent în procesele de extracție a ADN-ului și sunt menționate împreună cu cantitățile testate în tabelul următor.

Soluțiile de testare sunt disponibile pentru a fi comercializate în kituri de izolare ADN bazate pe coloane.

Tabelul 9 Substanțe exogene cu potențiale interferențe și concentrații testate în FFPE

| Substanță de testare          | Concentrația de testare (μl /30 μl eluat) |
|-------------------------------|---|
| Soluție de deparafinare       | 113 x 10 <sup>-6</sup>                    |
| Soluție tampon de spălare AW2 | 0,417                                     |

Pentru fiecare substanță de interferență, au fost testate opt replicare tehnice prin testul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, îmbogățite cu un panel de îmbogățire pan-cancer (1,94 Mb) în îmbogățiri într-un singur plex, apoi secvențiate cu instrumentul NextSeq 550Dx, cu modulul DNA GenerateFASTQ Dx.

Pentru ambele substanțe testate, toate cele opt specișene au îndeplinit cerințele de performanță a probei și nu au fost observate interferențe în efectuarea testului.

## Contaminarea încrucișată

gADN din linie celulară Coriell NA12878 (sex feminin, 10 probe), gADN din linie celulară Coriell NA12877 (sex masculin, 12 probe), fără controale șablon (NTC, 2 probe) au fost testate prin testul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, într-un șablon de placă tip tablă de șah. Toate probele au utilizat cea mai mare recomandare de intrare de gADN (1000 ng), drept cea mai importantă condiție pentru evaluarea contaminărilor încrucișate între probe. Testarea a fost efectuată de două ori, de către doi operatori diferiți. Panelul exom 1 (45 Mb) a fost utilizat în reacții de îmbogățire în 12 plexuri. Bibliotecile îmbogățite au fost apoi secvențiate în instrumentul NextSeq 550Dx, cu modulul DNA GenerateFASTQ Dx. Evaluarea a fost efectuată prin stabilirea acoperirii cromozomului Y specific masculin în probele cu cromozomi de sex feminin, prin compararea cu nivelurile de bază ale unei plăci complete de probe de sex feminin, precum și cu reprezentarea index a probelor NTC.

Tabelul 10 Rezultatele contaminării încrucișate

| Acoperirea probelor de sex feminin cu cromozom Y masculin în < 3x Zgomot de referință | Reprezentare index în NTC |
|---|---------------------------|
| 100%  | < 0,0005%                 |

## Anexa: Secvențele adaptoarelor index Illumina UD

Aceste adaptoare index unice duale (UD) sunt aranjate pe placă pentru a facilita strategia recomandată de împerechere. Adaptoarele index au lungimi de 10 baze, în loc de lungimea obișnuită de opt baze.

### Adaptoare Index 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

### Adaptoare Index 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Următoarea secvență este utilizată pentru tăierea adaptoarelor Citire 1 și Citire 2

CTGTCTCTTATACACATCT

## Adaptoare index Placă A/Set 1

| Denumire index | i7 Baze în Adaptor | i5 Baze în Adaptor |
|----------------|--------------------|--------------------|
| 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         | GTGATAGTG          |
| UDP0010        | TCGTCTGACT         | ACCAGCGACA         |
| UDP0011        | GAACATACGG         | CATACACTGT         |
| UDP0012        | CCTATGACTC         | GTGTGGCGCT         |
| UDP0013        | TAATGGCAAG         | ATCACGAAGG         |
| UDP0014        | GTGCCGCTTC         | CGGCTCTACT         |
| UDP0015        | CGGCAATGGA         | GAATGCACGA         |
| UDP0016        | GCCGTAACCG         | AAGACTATAG         |
| UDP0017        | AACCATCTCT         | TCGGCAGCAA         |
| UDP0018        | GGTTGCTCT          | CTAATGATGG         |

| Denumire index | i7 Baze în Adaptor | i5 Baze în Adaptor |
|----------------|--------------------|--------------------|
| 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        | TGCGTGTAC          | GCTTACGGAC         |
| UDP0032        | CATACACTGT         | GAACATACGG         |
| UDP0033        | CGTATAATCA         | GTCGATTACA         |
| UDP0034        | TACGCGGCTG         | ACTAGCCGTG         |
| UDP0035        | GCGAGTTACC         | AAGTTGGTGA         |
| UDP0036        | TACGGCCGGT         | TGGCAATATT         |
| UDP0037        | GTCGATTACA         | GATCACCGCG         |
| UDP0038        | CTGTCTGCAC         | TACCATCCGT         |
| UDP0039        | CAGCCGATTG         | GCTGTAGGAA         |
| UDP0040        | TGACTACATA         | CGCACTAATG         |
| UDP0041        | ATTGCCGAGT         | GACAAC TGAA        |
| UDP0042        | GCCATTAGAC         | AGTGGTCAGG         |
| UDP0043        | GGCGAGATGG         | TTCTATGGTT         |
| UDP0044        | TGGCTCGCAG         | AATCCGGCCA         |
| UDP0045        | TAGAATAACG         | CCATAAGGTT         |
| UDP0046        | TAATGGATCT         | ATCTCTACCA         |
| UDP0047        | TATCCAGGAC         | CGGTGGCGAA         |
| UDP0048        | AGTGCCACTG         | TAACAATAGG         |

| Denumire index | i7 Baze în Adaptor | i5 Baze în Adaptor |
|----------------|--------------------|--------------------|
| 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        | GTTCGCGCCA         | AACTGATACT         |
| UDP0065        | AGACACATTA         | GTAAGGCATA         |
| UDP0066        | GCGTTGGTAT         | AATTGCTGCG         |
| UDP0067        | AGCACATCCT         | TTACAATTCC         |
| UDP0068        | TTGTTCCGTG         | AACCTAGCAC         |
| UDP0069        | AAGTACTCCA         | TCTGTGTGGA         |
| UDP0070        | ACGTCAATAC         | GGAATTCCAA         |
| UDP0071        | GGTGTACAAG         | AAGCGCGCTT         |
| UDP0072        | CCACCTGTGT         | TGAGCGTTGT         |
| UDP0073        | GTTCCGCAGG         | ATCATAGGCT         |
| UDP0074        | ACCTTATGAA         | TGTTAGAAGG         |
| UDP0075        | CGCTGCAGAG         | GATGGATGTA         |
| UDP0076        | GTAGAGTCAG         | ACGGCCGTCA         |
| UDP0077        | GGATACCAGA         | CGTTGCTTAC         |
| UDP0078        | CGCACTAATG         | TGACTACATA         |

| Denumire index | i7 Baze în Adaptor | i5 Baze în Adaptor |
|----------------|--------------------|--------------------|
| 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         |

## Adaptoare index Placă B/Set 2

| Denumire index | i7 Baze în Adaptor | i5 Baze în Adaptor |
|----------------|--------------------|--------------------|
| UDP0097        | CTGACCGGCA         | CCTGATACAA         |
| UDP0098        | GAATTGAGTG         | TTAAGTTGTG         |
| UDP0099        | GCGTGTGAGA         | CGGACAGTGA         |
| UDP0100        | TCTCCATTGA         | GCACTACAAC         |
| UDP0101        | ACATGCATAT         | TGGTGCCTGG         |
| UDP0102        | CAGGCGCCAT         | TCCACGGCCT         |
| UDP0103        | ACATAACGGA         | TTGTAGTGTA         |
| UDP0104        | TTAATAGACC         | CCACGACACG         |
| UDP0105        | ACGATTGCTG         | TGTGATGTAT         |



| Denumire index | i7 Baze în Adaptor | i5 Baze în Adaptor |
|----------------|--------------------|--------------------|
| 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        | GGCCTGTCCT         | CATTCCAGCT         |
| UDP0121        | TAGGTTCTCT         | GGTTATGCTA         |
| UDP0122        | ACACAATATC         | ACCACACGGT         |
| UDP0123        | TTCTGTACG          | TAGGTTCTCT         |
| UDP0124        | GGTAACGCAG         | TATGGCTCGA         |
| UDP0125        | TCCACGGCCT         | CTCGTGC GTT        |
| UDP0126        | GATACCTCCT         | CCAGTTGGCA         |
| UDP0127        | CAACGTCAGC         | TGTTTCGATT         |
| UDP0128        | CGGTTATTAG         | AACCGCATCG         |
| UDP0129        | CGCGCCTAGA         | CGAAGGTTAA         |
| UDP0130        | TCTTGGCTAT         | AGTGCCACTG         |
| UDP0131        | TCACACCGAA         | GAACAAGTAT         |
| UDP0132        | AACGTTACAT         | ACGATTGCTG         |
| UDP0133        | CGGCCTCGTT         | ATACCTGGAT         |
| UDP0134        | CATAACACCA         | TCCAATTCTA         |
| UDP0135        | ACAGAGGCCA         | TGAGACAGCG         |

| Denumire index | i7 Baze în Adaptor | i5 Baze în Adaptor |
|----------------|--------------------|--------------------|
| UDP0136        | TGGTGCCTGG         | ACGCTAATTA         |
| UDP0137        | TAGGAACCGG         | TATATTCGAG         |
| UDP0138        | AATATTGGCC         | CGGTCCGATA         |
| UDP0139        | ATAGGTATTC         | ACAATAGAGT         |
| UDP0140        | CCTTCACGTA         | CGGTTATTAG         |
| UDP0141        | GGCCAATAAG         | GATAACAAGT         |
| UDP0142        | CAGTAGTTGT         | AGTTATCACA         |
| UDP0143        | TTCATCCAAC         | TTCCAGGTAA         |
| UDP0144        | CAATTGGATT         | CATGTAGAGG         |
| UDP0145        | GGCCATCATA         | GATTGTCATA         |
| UDP0146        | AATTGCTGCG         | ATTCGGCTAT         |
| 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        | ATTCGGCTAT         | GCGCAGAGTA         |
| UDP0156        | TGAATATTGC         | GGCGCCAATT         |
| UDP0157        | CGCAATCTAG         | AGATATGGCG         |
| UDP0158        | AACCGCATCG         | CCTGCTTGGT         |
| UDP0159        | CTAGTCCGGA         | GACGAACAAT         |
| UDP0160        | GCTCCGTCAC         | TGGCGGTCCA         |
| UDP0161        | AGATGGAATT         | CTTCAGTTAC         |
| UDP0162        | ACACCGTTAA         | TCCTGACCGT         |
| UDP0163        | GATAACAAGT         | CGCGCCTAGA         |
| UDP0164        | CTGGTACACG         | AGGATAAGTT         |
| UDP0165        | CGAAGGTTAA         | AGGCCAGACA         |

| Denumire index | i7 Baze în Adaptor | i5 Baze în Adaptor |
|----------------|--------------------|--------------------|
| UDP0166        | ATCGCATATG         | CCTTGAACGG         |
| UDP0167        | ATCATAGGCT         | CACCACCTAC         |
| UDP0168        | GATTGTCATA         | TTGCTTGTAT         |
| UDP0169        | CCAACAACAT         | CAATCTATGA         |
| UDP0170        | TTGGTGGTGC         | TGGTACTGAT         |
| UDP0171        | GCGAACGCCCT        | 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         |

## Istoricul reviziilor

| Document                      | Data               | Descrierea modificării  |
|-------------------------------|--------------------|---|
| Nr. document<br>200019584 v02 | Septembrie<br>2022 | Conținut adăugat pentru a sprijini secvențierea cu instrumentul NovaSeq 6000Dx.   |
| Nr. document<br>200019584 v01 | Mai 2022           | Nume de sisteme de secvențiere și numere de catalog adăugate. Informații de indexare unice duale îndepărtate pentru bibliotecile cu o singură indexare. |
| Nr. document<br>200019584 v00 | Mai 2022           | Versiunea inițială.   |

## Brevete și mărci comerciale

Prezentul document și conținutul său constituie proprietatea Illumina, Inc. și a afiliaților săi („Illumina”) și sunt destinate exclusiv pentru utilizarea contractuală de către client în legătură cu folosirea produsului sau produselor descrise în prezentul document și în niciun alt scop. Acest document și conținutul său nu trebuie utilizate sau distribuite pentru niciun alt scop și/sau nici comunicate, divulgate sau reproduse în orice alt mod și în orice formă fără consimțământul prealabil acordat în scris de Illumina. Illumina nu transmite, în temeiul brevetelor sale, mărcilor sale comerciale, drepturilor sale de autor sau în temeiul dreptului comun, nicio licență și nici drepturi similare ale oricărui terți prin acest document.

Instrucțiunile din acest document trebuie respectate în mod strict și explicit de către personalul calificat și corespunzător instruit pentru a asigura utilizarea corespunzătoare și în siguranță a produsului descris/produselor descrise în acest document. Înainte de utilizarea acestui produs/acestor produse, întreg conținutul acestui document trebuie citit și înțeles în întregime.

FAPTUL DE A NU CITI COMPLET ȘI DE A NU RESPECTA ÎN MOD EXPLICIT TOATE INSTRUCȚIUNILE CUPRINSE ÎN PREZENTUL DOCUMENT POATE DUCE LA DETERIORAREA PRODUSULUI SAU PRODUSELOR, LA VĂTĂMAREA PERSOANELOR, INCLUSIV A UTILIZATORILOR SAU ALTOR PERSOANE ȘI LA DAUNE ALE ALTOR PROPRIETĂȚI ȘI VA ANULA ORICE GARANȚIE APLICABILĂ PRODUSULUI SAU PRODUSELOR.

ILLUMINA NU ÎȘI ASUMĂ NICIO RĂSPUNDERE CARE DECURGE DIN UTILIZAREA INADECVATĂ A PRODUSULUI SAU PRODUSELOR DESCRISE ÎN PREZENTUL DOCUMENT (INCLUSIV A COMPONENTELOR SAU SOFTWARE-ULUI ACESTORA).

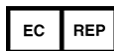
© 2022 Illumina, Inc. Toate drepturile rezervate.

Toate mărcile comerciale sunt proprietatea Illumina, Inc. sau a proprietarilor lor respectivi. Pentru informații specifice privind mărcile comerciale, consultați [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Informații de contact



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 S.U.A.  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (în afara Americii de Nord)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.  
Steenoven 19  
5626 DK Eindhoven  
Țările de Jos

### Sponsor australian

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

## Etichetarea produsului

Pentru referințele complete ale simbolurilor care apar pe ambalajele și etichetele produselor, consultați legenda simbolurilor de la adresa [support.illumina.com](http://support.illumina.com) din fila *Documentation (Documentație)* pentru setul dvs.