

İN VİTRO TANI AMAÇLI KULLANIM İÇİNDİR  
YALNIZCA DIŞA AKTARIM İÇİN

## Kullanım Amacı

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit, insan hücreleri ve dokusundan türetilen genomik DNA'dan numune kütüphaneleri hazırlamak için kullanılan bir dizi reaktif ve sarf malzemesidir. Kullanıcı tarafından tedarik edilen prob panelleri, ilgilenilen belirli genomik bölgeleri hedefleyen kütüphanelerin hazırlanması için gereklidir. Oluşturulan numune kütüphaneleri Illumina sekanslama sistemlerinde kullanım içindir.

## Prosedür İlkeleri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, insan hücreleri ve dokusundan türetilen genomik DNA'da hedeflenen bölgeler için zenginleştirilmiş DNA sekanslama kütüphanelerinin hazırlanması için tasarlanmıştır.

Kullanıcı tarafından tedarik edilen biyotinlenmiş oligonükleotid panelleri hedef zenginleştirme için gereklidir. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit küçük panellerden (< 20.000 prob) büyük panellere (> 200.000 prob) kadar çeşitli panel boyutları ile uyumludur. Oluşturulan zenginleştirilmiş kütüphaneler Illumina sekanslama sistemlerinde sekanslama içindir.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit prosedürü aşağıdaki adımlardan oluşur:

- **Genomik DNA Tagmantasyonu**—DNA girdisinin tagmantasyonu için Enrichment BLT Small (eBLTS) kullanır. Tagmantasyon sırasında, tek adımda gDNA fragmanları etiketlenir ve adaptörlerle etiketlenir. eBLTS'yi tagmantasyon reaksiyonunda doyurmak için minimum 50 ng DNA girdisi gereklidir. Doymuş hale geldiğinde eBLTS, tutarlı fragman boyutu dağılımına sahip normalleştirilmiş kütüphaneler oluşturmak için belirli sayıda DNA molekülünü fragman eder.
- **Tagmantasyon Sonrası Temizleme**—Amplifikasyonda kullanmak için eBLTS üzerindeki adaptör etiketli DNA'yı temizler.
- **Tagmente DNA'yı Amplifiye Etme**—Sınırlı döngü PCR programı kullanarak tagmente DNA'yı amplifiye eder. Benzersiz çift (UD) dizinler, DNA fragmanlarının sonuna eklenerek DNA kütüphanelerinin çift benzersiz barkodlanmasına ve sekanslama esnasında küme oluşumuna olanak sağlar.
- **Kütüphaneleri Temizleme**—Amplifiye edilmiş DNA kütüphanelerini saflaştırmak ve boyut seçimi yapmak için bir boncuk saflaştırma prosedürü kullanır.
- **Kütüphaneleri Havuzlama**—Benzersiz dizinlere sahip DNA kütüphanelerini 12 kütüphaneye kadar içerebilen bir havuzda birleştirir. Kütüphaneleri hacme veya kütleyle göre havuzlayabilirsiniz.
- **Probları Hibritleştirme**—Çift zincirli DNA kütüphanelerinin denşirildiği ve biyotinlenmiş DNA problemlerinden oluşan bir panelin hedeflenen genomik bölgelere hibritleştirildiği bir hibritleştirme reaksiyonundan oluşur.
  - Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit birden fazla panel ile uyumludur. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit bir zenginleştirme paneli içermez. Prob panelleri kullanıcı tarafından tedarik edilir ve gerekli spesifikasyonları karşılamalıdır. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reaktifleri hem

Illumina hem de gerekli spesifikasyonları karşılayan üçüncü taraf zenginleştirme DNA oligonükleotid panelleri ile uyumludur. Üçüncü taraf panellere yönelik gerekli spesifikasyonlar hakkında bilgi için bkz. [Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri, sayfa 9](#).

- **Hibritleştirilmiş Problemleri Yakalama**—Hedeflenen ilgi alanlarına hibritleştirilmiş biyotinlenmiş problemleri yakalamak için Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) kullanır.
- **Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Amplifiye Etme**—Zenginleştirilmiş kütüphaneleri amplifiye etmek için PCR kullanır.
- **Amplifiye Edilmiş Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Temizleme**—Sekanslamaya hazır zenginleştirilmiş kütüphaneleri saflaştırmak için bir boncuk saflaştırma prosedürü kullanır.
- **Sekanslama**—Zenginleştirilmiş kütüphanelerin sekanslaması MiSeqDx, NextSeq 550Dx veya NovaSeq 6000Dx sekanslama sistemlerinde gerçekleştirilir. MiSeqDx ve NextSeq 550Dx için, entegre DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Modülü sekanslama çalıştırması ayarlama, çalıştırmayı izleme ve birincil analiz (baz aramalarından FASTQ oluşturma) için kullanılır. NovaSeq 6000Dx için, DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application, çalıştırma ayarlama ve çeşitli mevcut iş akışları ile ikincil analiz için kullanılır.

## Prosedür Kısıtlamaları

- *In vitro* tanı amaçlı kullanım içindir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, insan hücreleri ve dokusundan türetilen genomik DNA ile uyumludur.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit 50–1000 ng aralığındaki çift zincirli gDNA girdileri ile uyumludur. Bu eşiklerin dışındaki girdiler ile performans garanti edilmez.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit DNA ekstraksiyonu için reaktifleri içermez. [Performans Özellikleri, sayfa 55](#), içerisinde sunulan enterferans testleri dahil analitik test sonuçları temsili DNA ekstraksiyon kitleri ile temsili numune türleri olarak tam kan ve FFPE ile elde edilmiştir. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reaktifleri ile kullanım için geliştirilen tüm tanı amaçlı testler, seçilen DNA ekstraksiyon kiti ile performansın tüm yönleri için tam doğrulama gerektirir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit,  $\Delta Cq > 5$  olan düşük kalite FFPE numuneleri için önerilmez.  $\Delta Cq > 5$  olan numuneler kütüphane hazırlamada başarısızlık ve düşük test performansı şansını artırabilir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reaktifleri aşağıdaki tabloda belirtilen numune girdileri, zenginleştirme reaksiyonları ve çok zamanlılık için yapılandırılmış ve test edilmiştir.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Numune Girdisi	Zenginleştirme Reaksiyonları	Zenginleştirme Çok Zamanlılığı
16-sample kit	Düşük kalite (FFPE)	16 reaksiyon	1-plex
96-sample kit	Yüksek kalite (ör. tam kan)	8 reaksiyon	12-plex

- FFPE girdisi işleme, yalnızca 16 numunelik kitin kullanıldığı 1-plex zenginleştirme reaksiyonları için test edilmiş ve önerilmektedir.
- 96 numunelik kit için standart olmayan çok zamanlılıklar (2-plex ile 11-plex) mümkündür ancak aşağıdaki kısıtlamalar söz konusudur:
  - Numunelerin 2-plex ile 11-plex zenginleştirme reaksiyonlarında işlenmesi kitin iş hacmini azaltır.
  - İdeal sonuçlar garanti edilmez. Standart olmayan çok zamanlılıklar için uygun zenginleştirme veriminin elde edilmesi için ilave optimizasyon gerekebilir.
  - Düşük çok zamanlılık havuzlama stratejilerinde (2-plex ile 8-plex), başarılı sekanslama ve veri analizi için renk dengesini optimize etmek üzere çeşitli sekanslara sahip dizin adaptörleri seçmek gereklidir. MiSeqDx ve NextSeq 550Dx üzerinde DNA GenerateFASTQ Dx modülü çalıştırma ayarlama sırasında renk dengeli dizin kombinasyonları için seçenekler sunar. Havuzlama stratejileri hakkında daha fazla bilgi için bkz. [Havuzlama Yöntemleri, sayfa 32](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, yalnızca MiSeqDx, NextSeq 550Dx ve NovaSeq 6000Dx üzerinde sekanslanmış zenginleştirilmiş kütüphanelerin iletimi ile sınırlıdır. Diğer sekanslama sistemlerinin kullanımı, performansın tüm yönleri için tam doğrulama gerektirir.
- Zenginleştirme panelleri bu ürünün bir parçası olarak dahil değildir. [Performans Özellikleri, sayfa 55](#) içerisinde sunulan analitik test sonuçları temsili zenginleştirme panelleri ile elde edilmiştir ve yalnızca bilgi amaçlı verilmiştir. Analitik performans özellikleri, testin genel özelliklerini örneklemeye hizmet eder ve herhangi bir belirli test iddiasıyla ilgili özellikleri veya uygunluğu ortaya koymaz. Bu reaktifler ile kullanılmak üzere geliştirilen tüm tanı testleri, performansın tüm yönleri için tam doğrulama gerektirir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit hem Illumina hem üçüncü taraf zenginleştirme panelleri ile uyumludur. Ancak panel gerekliliklerini karşılamayan üçüncü taraf zenginleştirme panelleri ile performans garanti edilmez. Panel Gereklilikleri hakkında bilgi için bkz. [Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri, sayfa 9](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit 2 saatlik hibritleştirme süresi kullanır. Daha uzun hibritleştirme süresi kullanımı performans metriklerini etkileyebilir.
- MiSeqDx ve NextSeq 550Dx için DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager modülleri yalnızca FASTQ dosyaları sağlar. Bu modülleri kullanıyorsanız ikincil analiz doğrulama gerçekleştirmeniz gerekir.
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application NovaSeq 6000Dx üzerinde mevcuttur. Bu uygulama FASTQ oluşturma, germ hattı varyant saptama için FASTQ ve VCF oluşturma ve somatik varyant saptama için FASTQ ve VCF oluşturma dahil birçok ikincil analiz iş akışını destekler. Uygulamayı VCF oluşturma için kullanıyorsanız ikincil analiz doğrulama gerçekleştirmeniz gerekmez.
- NovaSeq 6000Dx ile kullanıldığında DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application'ın sınırlamaları için bkz. [NovaSeq 6000Dx Cihazı Kullanım Talimatı \(belge no 200025276\)](#).

## Ürün Bileşenleri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit aşağıdaki bileşenlerden oluşur.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, katalog no 20051354 (16 numune) veya no 20051352 (96 numune)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, katalog no 20051355 (16 numune) veya no 20051353 (96 numune)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module for NextSeq 550Dx, katalog no 20063024
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module for MiSeqDx, katalog no 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NovaSeq 6000Dx, katalog no 20074609

## Temin Edilen Reaktifler

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx'in tamamlanması Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A veya Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B gerektirir. 16 numunelik veya 96 numunelik kiti kullanarak aşağıdaki sayıda kütüphane hazırlığı ve zenginleştirme reaksiyonu gerçekleştirilebilir.

<b>Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit</b>	<b>Numune Girdisi</b>	<b>Zenginleştirme Reaksiyonları</b>	<b>Zenginleştirme Çok Zamanlılığı</b>
16-sample kit	Düşük kalite (FFPE)	16 reaksiyon	1-plex
96-sample kit	Yüksek kalite (ör. tam kan)	8 reaksiyon	12-plex

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

### Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, 15 °C ila 30 °C'de depolayın

Aşağıdaki reaktifler oda sıcaklığında gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen depolama sıcaklığında depolayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı		Kapak Rengi	Dolum Hacmi	Aktif Bileşenler
	16 Numune (no 20050020)	96 Numune (no 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Kırmızı	350 µl	Su içerisinde deterjan solüsyonu.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Yeşil	41 ml	Deterjan ve tuz içeren tamponlanmış sulu solüsyon.
Cleanup Beads (CB)	1	Geçerli Değil*	Kırmızı	10 ml	Tamponlanmış sulu solüsyon içinde katı halde paramanyetik boncuklar.

\* 96 numunelik kitler için Cleanup Beads, Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (no 20050030) içerisine dahildir.

### Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 samples), 15 °C ila 30 °C'de depolayın

96 numunelik kitler için, Cleanup Beads, Illumina Prep Dx Cleanup Beads (katalog no 20050030) içerisine dahildir. Aşağıdaki reaktif oda sıcaklığında gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen depolama sıcaklığında depolayın. 16 numunelik kitler için, Cleanup Beads, Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (katalog no 20050020) içerisine dahildir.

Reaktif Adı	Miktar	Kapak Rengi	Dolum Hacmi	Aktif Bileşenler
Cleanup Beads (CB)	4	Kırmızı	10 ml	Tamponlanmış sulu solüsyon içinde katı halde paramanyetik boncuklar.

### Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, 2 °C ila 8 °C'de depolayın

Aşağıdaki reaktifler soğutulmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen depolama sıcaklığında depolayın. eBLTS stok tüpünü boncuklar her zaman tampon içinde batırılmış olacak şekilde dik depolayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı		Kapak Rengi	Dolum Hacmi		Aktif Bileşenler
	16 Numune (no 20050021)	96 Numune (no 20050026)		16 Numune	96 Numune	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Sarı	200 µl	290 µl	Gliserol, EDTA, ditiotritol, tuz ve deterjan içeren tamponlu sulu solüsyon içinde transpozomlar ile bağlantılı Streptavidin Magnetic Beads.
Yeniden Askıya Alma Tamponu (RSB)	1	4	Şeffaf	1,8 ml	1,8 ml	Tamponlanmış sulu solüsyon.

### Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, -25 °C ila -15 °C'de depolayın

Aşağıdaki reaktifler donmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen depolama sıcaklığında depolayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı		Kapak Rengi	Dolum Hacmi		Aktif Bileşenler
	16 Numune (no 20050022)	96 Numune (no 20050027)		16 Numune	96 Numune	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Şeffaf	290 µl	290 µl	Magnezyum tuzu ve dimetilformamit içeren tamponlu sulu solüsyon.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Şeffaf	200 µl	610 µl	Tamponlanmış sulu solüsyonda DNA polimeraz ve dNTP'ler.

### Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 samples), 2 °C ila 8 °C'de depolayın

16 numunelik kitler için, aşağıdaki reaktifler Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalog no 20050023) içine dahildir. 96 numunelik kitler için, reaktifler Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalog no 20050028) içine dahildir.

Aşağıdaki reaktifler soğutulmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen depolama sıcaklığında depolayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı	Kapak Rengi	Dolum Hacmi	Aktif Bileşenler
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Şeffaf	1,2 ml	Tamponlanmış sulu solüsyondaki formamit, deterjan ve tuz içeren Streptavidin Magnetic Beads.
Yeniden Askıya Alma Tamponu (RSB)	1	Şeffaf	1,8 ml	Tamponlanmış sulu solüsyon.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Şeffaf	200 µl	Deterjan ve tuz içeren tamponlanmış sulu solüsyon.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Şeffaf	200 µl	Tamponlanmış sulu solüsyon.

### Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 samples), 2 °C ila 8 °C'de depolayın

96 numunelik kitler için, aşağıdaki reaktifler Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalog no 20050028) içine dahildir. 16 numunelik kitler için, reaktifler IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalog no 20050023) içine dahildir.

Aşağıdaki reaktifler soğutulmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen depolama sıcaklığında depolayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı	Kapak Rengi	Dolum Hacmi	Aktif Bileşenler
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Şeffaf	1,2 ml	Tamponlanmış sulu solüsyondaki formamit, deterjan ve tuz içeren Streptavidin Magnetic Beads.
Yeniden Askıya Alma Tamponu (RSB)	4	Şeffaf	1,8 ml	Tamponlanmış sulu solüsyon.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Şeffaf	200 µl	Deterjan ve tuz içeren tamponlanmış sulu solüsyon.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Şeffaf	200 µl	Tamponlanmış sulu solüsyon.

**Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, -25 °C ila -15 °C'de depolayın**

Aşağıdaki reaktifler donmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen depolama sıcaklığında depolayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı		Kapak Rengi	Dolum Hacmi	Aktif Bileşenler
	16 Numune (no 20050024)	96 Numune (no 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Şeffaf	580 µl	Su içerisinde deterjan solüsyonu.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Amber	4,1 ml	Tuzlar ve deterjan içeren tamponlanmış sulu solüsyon.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Şeffaf	320 µl	PCR primerler (oligonükleotidler) karışımı.
2 N NaOH (HP3)	1	1	Şeffaf	200 µl	2 N sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu.
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Mavi	480 µl	Cot-1 DNA, kalabalıklaşma ajanı ve formamit ile tamponlu sulu solüsyon.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Şeffaf	200 µl	Tamponlanmış sulu solüsyonda DNA polimeraz ve dNTP'ler.

**Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, -25 °C ila -15 °C'de depolayın**

Aşağıdaki reaktifler donmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen depolama sıcaklığında depolayın. Dizin adaptör sekansları için, bkz. [Ek: Illumina UD Dizinleri Adaptör Sekansları, sayfa 58.](#)

Bileşen	Miktar
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Indexes), no 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 Indexes), no 20050039	1



# Temin Edilmeyen Reaktifler

## Gerekli Reaktifler, Temin Edilmeyen

- DNA ekstraksiyon ve saflaştırma reaktifleri
- DNA miktar tayini reaktifleri
- Etanol (moleküler biyoloji için 200 derece)
- Nükleaz içermeyen su
- 1 M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- 1 N NaOH solüsyonu, moleküler biyoloji sınıfı
- NextSeq 550Dx sekanslama sistemi kullanıyorsanız:
  - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (katalog no 20028871)
- MiSeqDx sekanslama sistemi kullanıyorsanız:
  - MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalog no 20037124)
- NovaSeq 6000Dx sekanslama sistemi kullanıyorsanız:
  - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (katalog no 20046931)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (katalog no 20046933)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalog no 20062292)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalog no 20062293)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalog no 20062290)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (katalog no 20062291)

## Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reaktifleri hem Illumina hem üçüncü taraf zenginleştirme DNA oligonükleotid panelleri ile uyumludur. Üçüncü taraf biyotinenmiş DNA problemleri (sabit veya özel paneller) kullanıyorsanız problemlerin gerekli spesifikasyonları karşıladıklarından emin olun.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, aşağıdaki üçüncü taraf panel spesifikasyonları kullanılarak optimize edilmiş ve doğrulanmıştır. Spesifikasyonları karşılamayan üçüncü taraf paneller kullanıldığında karşılaştırılabilir nitelikte performans garanti edilmez.

- 80 bp veya 120 bp prob uzunluğu
- 500 ile 675.000 arası problemler
- Tek veya çift zincirli DNA
- 1-plex ila 12-plex çok zamanlılıklarda zenginleştirme için  $\geq 3$  pmol toplam prob girdisi

## Depolama ve Taşıma

- Oda sıcaklığı 15 °C ila 30 °C olarak tanımlanmıştır.
- Reaktifler belirtilen şekilde saklandıklarında kit etiketlerinde belirtilen son kullanım tarihine kadar stabildir. Depolama sıcaklıkları için bkz. [Temin Edilen Reaktifler, sayfa 4](#).
- Dondurulmuş reaktifler, belirtilen son kullanma tarihinden önce gerçekleşen maksimum dört dondurma - çözme döngüsü için stabildir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit prosedürü aşağıdaki güvenli durma noktalarını içerir:
  - [Tagmente DNA'yı Amplifiye Etme, sayfa 27](#) işleminden sonra, amplifiye edilen kütüphaneler -25 °C ila -15 °C'de depolandıklarında 30 güne kadar stabildir.
  - [Kütüphaneleri Temizleme, sayfa 30](#) işleminden sonra, temizlenen amplifiye edilen kütüphaneler -25 °C ila -15 °C'de depolandıklarında 30 güne kadar stabildir.
  - [Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Havuzlama, sayfa 32](#) işleminden sonra, havuzlanan kütüphaneler -25 °C ila -15 °C'de depolandıklarında 30 güne kadar stabildir.
  - [Zenginleştirilmiş Kütüphaneyi Amplifiye Etme, sayfa 42](#) işleminden sonra, zenginleştirilmiş amplifiye edilmiş kütüphaneler plakası 24 saate kadar termal döngüleyici üzerinde kalabilir. Alternatif olarak plaka 2 °C ila 8 °C'de 48 saate kadar depolanabilir.
  - Nihai temizlenmiş zenginleştirilmiş kütüphaneler -25 °C ila -15 °C'de depolandıklarında 7 güne kadar stabildir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit'in herhangi bir ambalajı veya içeriği hasar görmüşse veya bozulmuşsa Illumina Müşteri Hizmetleri ile iletişime geçin.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2), görülebilen çökelti veya kristaller oluşturabilir. Çökelti gözlemlenirse 37 °C'de 10 dakika ısıtın ve ardından çökelti çözünene kadar vorteksleyin.
- Hybridization Oligos (HYB) ve Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW), numune türü ve prob paneline uygun hibritleştirme bekletme sıcaklığı ile aynı sıcaklığa önceden ısıtılmalıdır. NHB2 ve EEW kullanımı hakkında daha fazla bilgi için bkz. [Prosedür Notları, sayfa 15](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) ve HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) kristaller ve bulanıklık oluşturabilir. Kristaller veya bulanıklık gözlemlenirse solüsyon şeffaf olana kadar vorteksleyin veya karıştırmak için yukarı ve aşağı pipetleyin. Pipetlemeden önce NHB2'yi önceden ısıttığınızdan emin olun.
- Cleanup Beads (CB) kullanırken aşağıdaki en iyi uygulamaları izleyin:
  - Boncukları asla dondurmayın.
  - Kullanmadan hemen önce, tekrar süspansiyon oluncaya ve renk homojen görününceye kadar boncukları vorteksleyin.
- Enrichment BLT Small (eBLTS) kullanırken aşağıdaki en iyi uygulamaları izleyin:
  - eBLTS tüpünü boncuklar her zaman tampon içinde batırılmış olacak şekilde dik depolayın.
  - Boncuklar tekrar süspansiyon olana dek eBLTS'yi vorteksleyin. Boncukların yeniden yerleşmesini önlemek için pipetlemeden önce santrifüjleme önerilmez.

- Boncuklar 96 kuyulu plakanın yanına veya üstüne yapışmışsa 280 x g'de 3 saniye boyunca santrifüjleyin ve ardından tekrar süspansiyon haline getirmek için pipetleyin.
- Dizin adaptör plakalarını kullanırken aşağıdaki en iyi uygulamaları izleyin:
  - Dizin adaptör plakasına numuneleri eklemeyin.
  - Dizin plakasının her kuyusu yalnızca tek kullanımlıktır.

## Gerekli Ekipmanlar ve Materyaller, Temin Edilmeyen

Protokole başlamadan önce Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit'e ilave olarak gereken ekipman ve materyallerin bulunduğundan emin olun.

### Ekipman

Protokole başlamadan önce gereken ekipmanlara sahip olduğunuzdan emin olun.

Protokol, listelenen spesifikasyonlara sahip ögeler kullanılarak optimize edilmiş ve doğrulanmıştır. Spesifikasyon dışı ekipman kullanıldığında karşılaştırılabilir nitelikte performans garanti edilmez.

Bazı ögeler yalnızca belirli iş akışları için gereklidir. Bu ögeler ayrı tablolarda belirtilir.

- Aşağıdaki teknik özelliklerde termal döngüleyici:
  - Isıtmalı kapak
  - Minimum sıcaklık kontrol aralığı 10 °C ila 98 °C
  - Minimum sıcaklık doğruluğu  $\pm 0,25$  °C
  - Maksimum reaksiyon hacmi 100  $\mu$ l
  - Tam etekli 96 kuyulu PCR plakaları ile uyumlu
- Aşağıdaki spesifikasyonlarda mikro numune inkübatörü:
  - Ortam sıcaklığı aralığı +5,0 °C ila 99,0 °C
  - 96 kuyulu MIDI plakaları ile uyumlu
- 96 kuyulu MIDI plakaları ile uyumlu mikro numune inkübatörü ek parçaları
- 200–3000 rpm karıştırma hızı aralığına sahip yüksek hızlı mikropilaka çalkalayıcı
- 96 kuyulu PCR plakaları ile uyumlu manyetik stant
- 96 kuyulu MIDI plakaları ile uyumlu manyetik stant
- Miktar tayini yönteminiz ile uyumlu florometre
- DNA fragman analizörü
- Hassas pipetler:
  - 10  $\mu$ l tek kanallı ve çok kanallı pipetler

- 20 µl tek kanallı ve çok kanallı pipetler
- 200 µl tek kanallı ve çok kanallı pipetler
- 1000 µl tek kanallı pipetler
- Hassas pipetler doğru reaktif ve numune iletimi sağlar. Tek kanallı veya çok kanallı pipetler düzenli olarak kalibre edilmeleri ve belirtilen hacmin %5'i içerisinde doğru olmaları durumunda kullanılabilirler.
- Mikroplaka santrifüj
- Mikrosantrifüj
- Aşağıdaki Illumina sekanslama sistemlerinden biri:
  - MiSeqDx Instrument, katalog no DX-410-1001
  - NextSeq 550Dx Instrument, katalog no 20005715
  - NovaSeq 6000Dx Instrument, katalog no 20068232
- [İsteğe bağlı] Vakum konsantratörü
- [FFPE] Gerçek zamanlı PCR saptama sistemi

## Materyaller

Protokole başlamadan önce gereken materyallerin bulunduğundan emin olun.

Bazı öğeler yalnızca belirli iş akışları için gereklidir. Bu öğeler ayrı tablolarda belirtilir.

Protokol, listelenen öğeler kullanılarak optimize edilmiş ve doğrulanmıştır. Alternatif materyaller kullanılırken karşılaştırılabilir nitelikte performans garanti edilmez.

- Filtrelenmiş pipet uçları
- Konik santrifüj tüpleri, 15 ml veya 50 ml
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri
- RNaz/DNaz içermeyen çok kanallı reaktif hazneleri, tek kullanımlık
- RNaz/DNaz içermeyen 8 tüplü şeritler ve kapaklar
- Serolojik Pipetler
- 96 kuyulu polipropilen derin kuyulu depolama plakası, 0,8 ml (MIDI plakası)
- Sert kovanlı 96 kuyulu tam etekli PCR plakaları
- [FFPE] qPCR cihazı ile uyumlu qPCR plakaları
- Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip 96 kuyulu plakalar için yapışkanlı kapaklar:
  - Soyulabilir, optik olarak şeffaf polyster
  - Etekli PCR plakaları için uygun
  - -40 °C ile 110 °C arasında birden fazla sıcaklık değişikliklerine dayanabilen güçlü yapışkan
  - DNaz/RNaz içermeyen
- Tercih edilen miktar tayini yöntemi ile uyumlu plastik sarf malzemeleri

- Seçilen miktar tayini sistemi ile uyumlu florometrik dsDNA miktar tayini kiti:
  - Önceden zenginleştirilmiş amplifiye edilmiş kütüphanelerin miktar tayini için geniş aralıklı bir miktar tayini kiti kullanılabilir.
  - Zenginleştirilmiş kütüphanelerin miktar tayini için, miktar tayini kitinin aralığı kullanılan prob paneline dayalıdır.
- Seçilen kalifikasyon sistemi ile kütüphane kalifikasyonu için fragman analiz kiti:
  - Önceden zenginleştirilmiş amplifiye edilmiş kütüphanelerin kalifikasyonu için geniş aralıklı bir kit kullanılabilir.
  - Zenginleştirilmiş kütüphanelerin kalifikasyonu için, kalifikasyon kitinin aralığı kullanılan prob paneline dayalıdır.
- [İsteğe bağlı] İnsan hücreleri ve dokusundan DNA ekstraksiyonu için kit. Herhangi bir doğrulanmış ekstraksiyon yöntemi kullanılabilir.

## Numune Toplanması, Nakliyesi ve Depolaması



### DİKKAT

Tüm numuneleri potansiyel olarak bulaşıcı maddelermiş gibi taşıyın.

- Bu test insan hücreleri ve dokusundan türetilen genomik DNA ile uyumludur.
- Piyasaya sunulmuş saflaştırılmış gDNA için, numunelerin doğru koşullar altında taşındığından ve üreticiden gelen talimatlara uygun olarak depolandığından emin olun. gDNA'nın depolanması ve dondurma çözme döngüleri için en iyi uygulamaları izleyin.
- Tam kan girdisi için, tercih edilen DNA ekstraksiyon yöntemine uygun kan alma, taşıma ve depolama gerekliliklerini uygulayın. Herhangi bir doğrulanmış ekstraksiyon yöntemi kullanılabilir. Tam kanın taşınması, etiyolojik maddelerin taşınmasına yönelik ülke, federal, eyalet ve yerel yönetmeliklere uygun olmalıdır.
- FFPE dokusundan DNA ekstraksiyonu için herhangi bir doğrulanmış ekstraksiyon yöntemi kullanılabilir. Aşağıdaki uygulamaları belirlemek için tercih edilen ekstraksiyon yöntemine uygun talimatları ve tavsiyeleri uygulayın:
  - Ekstrakte edilen DNA'da en iyi kaliteyi sağlamak amacıyla dokular için formalinle fikse etme ve parafine gömme yöntemi.
  - FFPE numunelerinin depolaması.
  - FFPE kesitlerinin sayısı ve kalınlığı gibi başlangıç materyal gereklilikleri. Çoğu saflaştırma yöntemi, yeni kesilmiş kesitlerin kullanımını önerir.

## Uyarılar ve Tedbirler

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reaktifleri potansiyel olarak tehlikeli kimyasallar içerir. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması halinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. Maruziyet riskine karşı göz koruması, eldivenler ve laboratuvar önlüğü dahil olmak üzere koruyucu ekipman giyin. Kullanılan reaktifleri kimyasal atık olarak ele alın ve geçerli bölgesel, ulusal ve yerel kanun ve düzenlemeler uyarınca atın. İlave çevre, sağlık ve güvenlik bilgileri için, [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html) adresindeki Güvenlik Veri Sayfalarına (SDS) bakın.
- Tüm kan numunelerini İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV), İnsan hepatit B virüsü (HBV) ve diğer kanla bulaşan patojenleri bulaştırıcıymış gibi taşıyın (evrensel tedbirler).
- Rutin laboratuvar tedbirlerini uygulayın. Ağızınızla pipetlemeyin. Belirlenmiş çalışma alanlarında yemek yemeyin, içecek tüketmeyin veya sigara içmeyin. Numuneleri ve kit reaktiflerini kullanırken tek kullanımlık eldiven takın ve laboratuvar önlüğü giyin. Numuneleri ve kit reaktiflerini elledikten sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Numune veya reaktif bozunmasını önlemek için temizlikten kaynaklanan tüm sodyum hipoklorit buharlarının protokol başlamadan önce tamamen dağıtıldığından emin olun.
- Numunelerin diğer PCR ürünleri/amplikonları ile kontaminasyonu hatalı ve güvenilir sonuçlar elde edilmesine yol açabilir. Kontaminasyonu önlemek için aşağıdaki en iyi uygulamaları izleyin:
  - Uygun laboratuvar uygulamalarını ve laboratuvar hijyenini kullanın.
  - Belirlenen pre-amplifikasyon veya post-amplifikasyon alanlarında iş akışı adımlarını yürütün.
  - Pre-amplifikasyon alanında kütüphaneleri temizlemeden önce kullanılmış reaktifleri depolayın.
  - Pre-amplifikasyon reaktiflerini, post-amplifikasyon reaktiflerinden ayırın.
  - Pre-amplifikasyon ve post-amplifikasyon alanlarında pipetler, pipet uçları, vorteks cihazı ve santrifüj gibi özel ekipmanların bulunduğundan emin olun.
- Çapraz kontaminasyondan kaçının. Numuneler arasında ve reaktiflerin dağıtımı arasında yeni pipet uçları kullanın. Filtreli uçların kullanımı amplikon taşıma ve numuneden numuneye çapraz kontaminasyon riskini azaltır.
  - Numune veya reaktif ana karışımlarını eklerken veya aktarırken her numune arasında uçları değiştirin.
  - Çok kanallı pipetle dizin adaptörlerini eklerken her satır veya her sütun arasında uçları değiştirin. Tek kanallı pipet kullanıyorsanız her numune arasında uçları değiştirin.
  - Kullanılmayan dizin adaptör plakalarını çalışma alanından uzaklaştırın.
- Etanol yıkama adımları için aşağıdaki en iyi uygulamaları izleyin:
  - Her zaman taze %80 etanol hazırlayın. Etanol havadan su absorbe edebilir ve bu sonuçları etkileyebilir.
  - Yıkama adımları sırasında kuyuların tabanından bütün etanolün çıkarıldığından emin olun. Kalıntı etanol sonuçları etkileyebilir.
  - Tamamen buharlaşmayı sağlamak için manyetik stant adımlarına yönelik belirli kurulama sürelerine bağlı kalın. Kalıntı etanol, takip eden reaksiyonların performansını etkileyebilir.

- Ana karışımları her zaman kullanımdan önce hazırlayın ve birleştirilmiş çalışma solüsyonlarını asla depolamayın.
- Kullanım talimatında belirtilen prosedürler uygulanmadığında, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit performansı garanti edilmez.
- Kit bileşenlerini kit etiketinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- Farklı Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kitlerindeki kit bileşenlerini birbirleriyle değiştirmeyin. Kitler, kit etiketinde tanımlanır.

## Prosedür Notları

### DNA Girdisi Önerileri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit protokolü 50–1000 ng aralığındaki yüksek kalite, çift zincirli genomik DNA (gDNA) girdileri ile uyumludur.

Başlangıçtaki gDNA numunesinin 1 mM'den fazla EDTA içermediğinden ve fenol ve etanol gibi organik kontaminantlar barındırmadığından emin olun. Bu maddeler tagmantasyon reaksiyonu ile enterferans gösterebilir ve testin başarısızlığına neden olabilir.

#### gDNA Girdisi $\geq$ 50 ng

50–1000 ng arasındaki gDNA girdileri için ilk gDNA numunesinin miktar tayininin yapılması ve normalleştirilmesi gerekli değildir.

#### gDNA Girdisi $<$ 50 ng

10–50 ng arası DNA girdileri aşağıdaki düzenlemeler ile kullanılabilir:

- 10–49 ng arası gDNA girdisi kullanılıyorsa tagmantasyon sonrası gereken PCR döngüsü sayısını belirlemek için ilk gDNA numunesinin miktar tayininin yapılması önerilir. Çift zincirli gDNA girdisinin miktar tayini için florometrik bazlı bir yöntem kullanın. NanoDrop veya diğer UV absorbans yöntemleri gibi toplam nükleik asidi ölçen yöntemlerden kaçınin.
- Bu protokol, 10–49 ng gDNA'dan gelen nihai önceden zenginleştirilmiş kütüphane verimlerini normalleştirmez ve bu nedenle zenginleştirme öncesi ve sonrasında kütüphanelerin miktar tayininin yapılması ve normalleştirilmesi gereklidir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit 50–1000 ng DNA girdileri için karakterize edilmiş ve onaylanmıştır. 50 ng'den düşük gDNA girdileri için eşdeğer ürün performansı garanti edilemez.

## Kan Girdisi Önerileri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, periferik tam kandan ekstrakte edilen gDNA ile uyumludur. Herhangi bir doğrulanmış ekstraksiyon yöntemi kullanılabilir. Tam kandan gDNA ekstrakte edilirken girdi DNA'nın başlangıç miktar tayini gerekmez ve Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit normalleştirilmiş önceden zenginleştirilmiş kütüphane verimlerini üretir.

Aşağıdaki faktörler tam kan numunelerinden elde edilen DNA miktarını ve dolayısıyla kütüphane normalleştirmesini advers olarak etkileyebilir:

- Kan numunesi yaşı
- Depolama koşulları
- Beyaz kan hücre sayımlarını etkileyen altta yatan tıbbi durumlar

## FFPE Doku Numunesi Girdi Önerileri

Başarılı kütüphane hazırlığına yönelik uygun girdiyi belirlemek için aşağıdaki FFPE DNA kalite kriterlerini uygulayın:

- $\Delta Cq$  değeri  $\leq 5$  olan FFPE numuneleri için önerilen DNA girdisi 50–1000 ng'dir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx,  $\Delta Cq > 5$  olan düşük kalite FFPE numuneleri için önerilmez.  $\Delta Cq > 5$  olan numuneler ile kullanmak mümkündür, ancak kütüphane hazırlamada başarısızlık veya düşük test performansı şansını artırabilir.

### FFPE Ekstraksiyonu

Yüksek geri kazanım verimleri üreten, numune tüketimini en aza indiren ve numune bütünlüğünü koruyan bir nükleik asit izolasyon yöntemi kullanın. FFPE numunelerinden DNA ekstraksiyonu için herhangi bir doğrulanmış yöntem kullanılabilir. FFPE dokusundan gDNA ekstraksiyonu için, girdi DNA'nın başlangıç miktar tayini gerekir ve Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit normalleştirilmiş önceden zenginleştirilmiş kütüphane verimlerini üretmez.

### FFPE DNA Kalifikasyonu

FFPE dokusundan ekstrakte edilen gDNA'nın kullanımdan önce kalifikasyonu yapılmalıdır. İdeal performans için, FFPE numunelerinden ekstrakte edilen DNA'nın kalifikasyonu için doğrulanmış bir ekstraksiyon yöntemi kullanarak DNA numune kalitesini değerlendirin. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit protokolü  $\Delta Cq$  değeri  $\leq 5$  olan FFPE DNA numuneleri ile uyumludur. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit,  $\Delta Cq > 5$  olan düşük kalite FFPE numuneleri için önerilmez.  $\Delta Cq > 5$  olan numuneler ile kullanmak mümkündür, ancak kütüphane hazırlamada başarısızlık veya düşük test performansı şansını artırabilir.



## [İsteğe bağlı] FFPE Referans Numuneleri

Protokolü gerçekleştirirken pozitif kontrol olarak Horizon HD799 (DNA) gibi karakterize edilmiş referans materyalleri kullanın. Hücre hattından türetilen ksenogreftlerden elde edilen kalifikasyonu yapılmış FFPE materyalleri de referans numuneler olarak kullanılabilir. Kullanımdan önce referans materyallerin miktar tayini için florometrik bazlı bir yöntem kullanın.

**NOT** Bir pozitif kontrol referans numunesinin veya şablonsuz kontrolün çalıştırılması, reaktifleri tüketir ve işlenebilecek bilinmeyen numunelerin toplam sayısını azaltır.

## Numune Girdisi Önerileri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit için numune girdisi önerileri aşağıdaki tabloda özetlenir.

Tablo 1 Numune Girdisi Önerileri

Numune Girdisi Türü	Numune Girdisi Miktarı	Girdi DNA'nın Miktar Tayini Gerekli	Gerekli DNA Girdi Kalitesi	Normalleştirilmiş Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphane Verimi
gDNA	10–49 ng	Evet	260/280 oranı 1,8–2,0	Hayır
gDNA	50–1000 ng	Hayır	260/280 oranı 1,8–2,0	Evet
Kandan gDNA	50–1000 ng	Hayır	260/280 oranı 1,8–2,0	Evet
FFPE'den gDNA	50–1000 ng	Evet	$\Delta Cq$ değeri $\leq 5$	Hayır

eBLTS PCR programı için önerilen PCR döngü sayısı numune girdi konsantrasyonu ve kalitesine bağlı olarak düzenlenir. Daha fazla bilgi için bkz. [Tagmente DNA'yı Amplifiye Etme, sayfa 27](#).

## İpuçları ve Teknikler

### Çapraz Kontaminasyonun Önlenmesi

- Numune eklerken veya aktarırken *her numune* arasında uçları değiştirin.
- Çok kanallı pipetle dizin adaptörlerini eklerken *her satır* veya *her sütun* arasında uçları değiştirin. Tek kanallı pipet kullanıyorsanız her numune arasında uçları değiştirin.

## Plakayı Kapatma

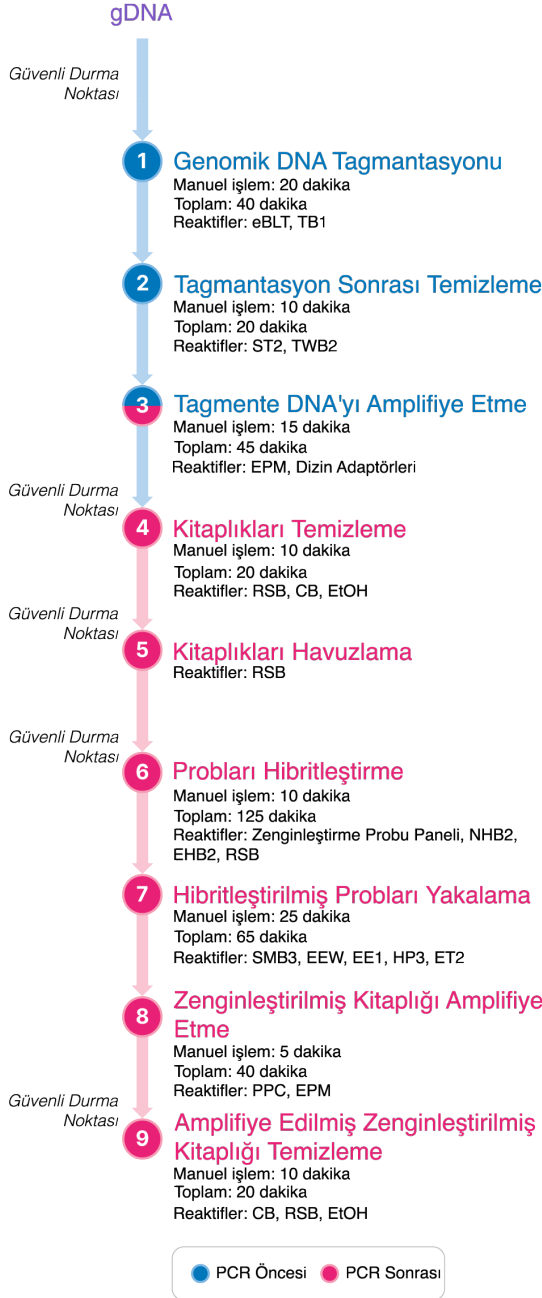
- Protokoldeki aşağıdaki adımları uygulamadan önce her zaman plakayı örtmek için bir kauçuk rulo kullanarak yeni bir yapışkanlı kapak ile 96 kuyulu plakayı kapatın:
  - Çalkalama adımları
  - İnkübasyon adımları. Plakanın düzgün kapatılmaması inkübasyon esnasında buharlaşmaya yol açabilir.
  - Santrifüj adımları
  - Hibritleştirme adımları
- Çapraz kontaminasyon ve buharlaşma riskini azaltmak için kenarların ve kuyuların tamamen kapandığından emin olun.
  - Kapakta veya plaka kuyusunun yanlarında herhangi bir sıvı veya yoğuşma gözlemlenirse açmadan önce gerektiği kadar santrifüjleyin.
- Kapağı yavaşça çıkarmadan önce plakayı düz bir yüzeye yerleştirin.

## Enrichment BLT Small (eBLTS) Kullanımı

- eBLTS stok tüpünü soğutucuda boncuklar her zaman tampon içinde batırılmış olacak şekilde dik depolayın.
- Kullanımdan hemen önce, eBLTS stok tüpünü boncuklar tekrar süspansiyon olana dek iyice vorteksleyin. Boncukların yeniden yerleşmesini önlemek için pipetlemeden önce santrifüjleme önerilmez.
- Boncuklar 96 kuyulu plakanın yanına veya üstüne yapışmışsa 280 × g'de 3 saniye boyunca santrifüjleyin ve ardından tekrar süspansiyon haline getirmek için pipetleyin.
- eBLTS'yi yıkarken:
  - Plaka için uygun manyetik standı kullanın.
  - Talimatlar çıkarılmasını söyleyene kadar plakayı manyetik stant üzerinde tutun.
  - Boncuklar pipet uçlarının içine aspire edilmişse manyetik stant üzerindeki plakanın içine geri dağıtın ve sıvı şeffaf olana kadar (2 dakika) bekleyin.

# Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit İş Akışı

Aşağıdaki şemada Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit iş akışı gösterilmektedir. Güvenli durma noktaları adımlar arasında işaretlenmiştir. Süre tahminleri 12-plex zenginleştirmede 12 numunenin işlenmesine dayanmaktadır.



## Kullanma Talimatları

Bu bölüm Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit protokolünü açıklar.

- Ürünlerin ve deney parametrelerinin uyumluluğundan emin olmak için numuneden analize kadar planlanan tam sekanslama iş akışını gözden geçirin.
- Devam etmeden önce, kit içeriğini doğrulayın ve gerekli bileşenler, ekipmanlar ve materyallerin bulunduğundan emin olun.
  - Üçüncü taraf biyotinlenmiş problar belirli gereklilikleri karşılamalıdır. Üçüncü taraf problemlerinizin gereklilikleri karşıladığından emin olmak için bkz. [Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri, sayfa 9](#).
- Belirtilen hacimleri ve inkübasyon parametrelerini kullanarak gösterilen sırada protokolü uygulayın.
- Protokolde güvenli durma noktası belirtilmedikçe, derhal bir sonraki adıma devam edin.
- Bir ana karışım oluştururken sağlanan hacimlerde fazlalık dahildir.
- Plaka türünüz için uygun manyetik standı kullandığınızdan emin olun.

## Havuzlama için Hazırlama

Bu adım zenginleştirilmiş kütüphanelerin başarılı sekanslanmasını sağlamak için gereklidir. Kütüphanelerin havuzlanması zenginleştirme öncesinde ve sekanslama öncesinde olabilir.

**Zenginleştirme öncesinde**—Dizinlenmiş amplifiye edilmiş bağımsız kütüphaneler seçili prob paneli ile zenginleştirme için birlikte havuzlanır. Bu, zenginleştirilmiş kütüphanelerin çoğullama yapılmış bir havuzunu oluşturur. FFPE numune girdisi için işleme yalnızca 1-plex zenginleştirme reaksiyonları için test edilmiş ve önerilmektedir. Yüksek kalite gDNA için, 12-plex test edilmiştir ancak 2-plex ile 11-plex mümkündür.

**Sekanslama öncesinde**—1-plex zenginleştirilmiş kütüphaneler ve/veya multiplex zenginleştirilmiş kütüphaneler sekanslama öncesinde birlikte havuzlanır. Sekanslanabilecek zenginleştirilmiş kütüphane sayısı, sekanslama sisteminizdeki her numune için hedef okuma derinliğine bağlıdır.

## Benzersiz Çift Dizinleme

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit benzersiz çift dizinler kullanır.

- Çift dizinli kütüphaneler benzersiz etiketlenmiş kütüphaneler oluşturmak için Dizin 1 (i7) ve Dizin 2 (i5) ekler.
- UD dizinleri, i7 ve i5 Dizin Okumaları için ayrı, bağımsız dizin sekansları içerir. Diziner 10 baz uzunluğundadır.

Havuzlanmış kütüphaneler için çeşitli sekanslara sahip dizin adaptörleri seçmek, başarılı sekanslama ve veri analizi için renk dengesini optimize eder.  $\geq 10$ -plex olan çok zamanlılık havuzları kendiliğinden renk dengelidir, bu sayede herhangi bir dizin adaptörü kombinasyonunu kullanabilirsiniz. Sekanslama çalıştırmanız esnasında, DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module, renk dengeli dizin kombinasyonları için seçenekler sunar ve seçili dizin kombinasyonlarında yeterince çeşitlilik olmadığında sizi bilgilendirir.

Illumina UD dizin adaptör sekansları ve plaka düzenleri hakkında bilgi için bkz. [Ek: Illumina UD Dizineri Adaptör Sekansları, sayfa 58](#).

## Desteklenen Zenginleştirme Çok Zamanlılıkları

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reaktifleri 1-plex ve 12-plex zenginleştirme çok zamanlılıklarında yapılandırılır ve test edilir. Diğer zenginleştirme çok zamanlılıkları mümkün olsa da bazı çok zamanlılıklar ilave önceden zenginleştirilmiş kütüphane hazırlığı ve zenginleştirme probu paneli reaktifleri gerektirir.

Standart olmayan zenginleştirme çok zamanlılığı için uygun zenginleştirme verimini elde etmek ilave optimizasyonlar gerektirebilir. İdeal sonuçlar garanti edilmez.

- **Zenginleştirme çok zamanlılığı**– Zenginleştirme probu panelleri ile hibritleştirme için bir zenginleştirme reaksiyonunda havuzlanmış önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin (1–12) sayısı. Örneğin, 12 önceden zenginleştirilmiş kütüphanenin birleştirilmesi bir 12-plex zenginleştirme havuzu oluşturur.
- **Zenginleştirme reaksiyonu**– Reaksiyon başına havuzlanmış önceden zenginleştirilmiş kütüphane sayısından bağımsız olarak benzersiz zenginleştirme reaksiyonu hazırlığı sayısı. Örneğin, tek bir zenginleştirme reaksiyonu 1-plex veya 12-plex zenginleştirme havuzu hazırlayabilir.

Zenginleştirme sonrası kütüphanelerin toplam sayısını hesaplamak için reaksiyon başına zenginleştirme çok zamanlılığını zenginleştirme reaksiyonu sayısı ile çarpın. Örneğin, bir 12-plex zenginleştirme havuzunun tek bir zenginleştirme reaksiyonu, 12 zenginleştirme sonrası kütüphane içeren bir havuz üretir.

Önceden zenginleştirilmiş kütüphaneleri havuzlarken, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reaktifleri aşağıdaki zenginleştirme reaksiyonlarını ve çok zamanlılığı destekler.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Reagents	Zenginleştirme Reaksiyonları	Zenginleştirme Çok Zamanlılığı
16-sample kit	16 reaksiyon	1-plex
96-sample kit	8 reaksiyon	12-plex

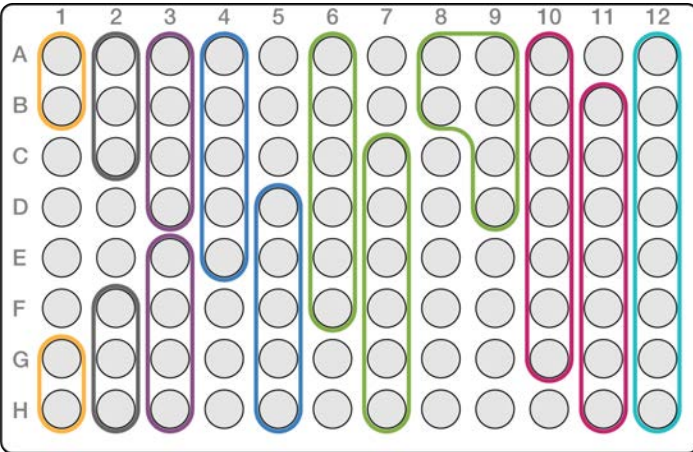
## 2-Plex İla 8-Plex Havuzlama Stratejileri

Aşağıdaki tabloda, 2–8-plex havuzda birleştirilebilen dizin adaptörleri (kuyular) gösterilmektedir ve renk kodlu şekilde ise her bir kombinasyon gösterilmektedir.

≥ 2 olan herhangi bir çok zamanlılığı sütunun üstünden veya altından havuzlayın. Satır boyunca havuzlamayın.

Çok Zamanlılık	Kombinasyonlar	Şekildeki Renk
2	Sütündeki ilk iki veya son iki kuyu: <ul style="list-style-type: none"><li>• A ve B</li><li>• G ve H</li></ul> C–F satırları kullanılmaz.	Turuncu
3	Sütündeki ilk üç veya son üç kuyu: <ul style="list-style-type: none"><li>• A–C</li><li>• F–H</li></ul> D ve E satırları kullanılmaz.	Gri

Çok Zamanlılık	Kombinasyonlar	Şekildeki Renk
4	Sütundaki ilk dört veya son dört kuyu: • A–D • E–H	Mor
5	Sütundaki ilk beş veya son beş kuyu: • A–E • D–H	Mavi
6	[Seçenek 1] Sütundaki ilk altı veya son altı kuyu: • A–F • C–H [Seçenek 2] Bir sütundaki ilk iki kuyu (A ve B) veya son iki kuyu (G ve H) ve bitişik bir sütundaki herhangi dört kuyu.	Yeşil
7	Sütundaki ilk yedi veya son yedi kuyu: • A–G • B–H	Pembe
8	Tüm sütun.	Deniz Mavisi



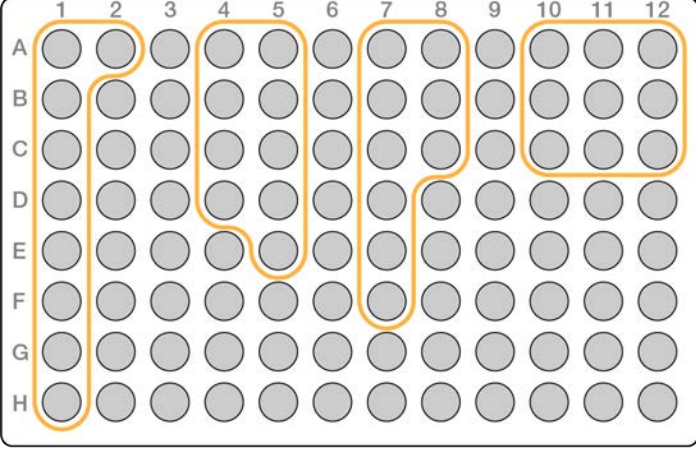
## 9-Plex Havuzlama Stratejileri

Sekanslama çalıştırmasında renk dengesini optimize eden herhangi bir kuyudan dizin adaptörlerini kullanın, örneğin:

- A1–H1 ve A2

- A4–D4 ve A5–E5
- A7–F7 ve A8–C8
- A10–C10, A11–C11 ve A12–C12

Aşağıdaki şekil dört örneğin tamamını göstermektedir.



## Genomik DNA Tagmantasyonu

Bu adım, DNA'yı fragmente edip adaptör sekansları ile etiketleyen bir işlem olan DNA tagmantasyonu için Enrichment BLT Small (eBLTS) kullanır.

### Sarf Malzemeleri

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (sarı kapak)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nükleaz içermeyen su
- 96 kuyulu PCR plakası
- Yapışkanlı kapak
- 1,7 ml mikrosantrifüj tüpleri
- 8 tüplü şerit
- Pipet uçları
  - 200 µl çok kanallı pipetler

**DİKKAT**

Bu reaktif seti potansiyel olarak tehlikeli kimyasallar içerir. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması halinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. Maruziyet riskine karşı göz koruması, eldivenler ve laboratuvar önlüğü dahil olmak üzere koruyucu ekipman giyin. Kullanılan reaktifleri kimyasal atık olarak ele alın ve geçerli bölgesel, ulusal ve yerel kanun ve düzenlemeler uyarınca atın. İlave çevre, sağlık ve güvenlik bilgileri için, [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html) adresindeki Güvenlik Veri Sayfalarına (SDS) bakın.

**Reaktifler Hakkında**

- eBLTS 2 °C ila 8 °C sıcaklıklarda depolanmalıdır. 2 °C altında depolanmış eBLTS'yi kullanmayın.
- eBLTS'yi santrifüjlemeyin.

**Hazırlık**

- Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Kalem	Depolama	Talimatlar
eBLTS (sarı kapak)	2 °C ila 8 °C	Oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için kullanımdan hemen önce vorteksleyin. Pipetlemeden önce santrifüjlemeyin.
TB1	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için vorteksleyin.

- DNA'yı vorteksleyin veya pipetleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
- Termal döngüleyicide aşağıdaki TAG programını kaydedin:
  - Kapağı önceden ısıtma seçeneğini seçin ve 100 °C'ye ayarlayın
  - Reaksiyon hacmini 50 µl olarak ayarlayın
  - 5 dakika boyunca 55 °C
  - 10 °C'de tutun



## Prosedür

1. Toplam girdi miktarı 50–1000 ng olacak şekilde 96 kuyulu PCR plakasının her kuyusuna 2–30 µl DNA ekleyin. DNA hacmi < 30 µl ise toplam hacmi 30 µl'ye getirmek için DNA numunelerine nükleaz içermeyen su ekleyin.
2. Boncuklar tamamen tekrar süspansiyon olana dek eBLTS'yi vorteksleyin.
3. Tagmantasyon Ana Karışımını hazırlamak için aşağıdaki hacimleri bir tüp içinde birleştirin. Her hacmi, işlenen numune sayısı ile çarpın.
  - eBLTS (11,5 µl)
  - TB1 (11,5 µl)Reaktif fazlalığı hacme dahildir.
4. Karıştırmak için Tagmantasyon Ana Karışımını iyice pipetleyin.
5. Tagmantasyon Ana Karışımını 8 tüplü şeride eşit olarak ayırın.
6. 200 µl çok kanallı bir pipet kullanarak, PCR plakasının numune içeren her kuyusuna 20 µl Tagmantasyon Ana Karışımı aktarın. Her numune sütunu veya satırı için yeni uçlar kullanın.
7. Tagmantasyon Ana Karışımı dağıtıldıktan sonra 8 tüplü şeridi atın.
8. Karıştırmak için 40 µl'ye ayarlanmış 200 µl çok kanallı bir pipet kullanarak her numuneyi 10 kez pipetleyin. Her numune sütunu için yeni uçlar kullanın. Alternatif olarak PCR plakasını kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika boyunca plaka çalkalayıcı kullanın.
9. Plakayı kapatın ve ardından önceden programlanmış termal döngüleyiciye yerleştirin ve TAG programını çalıştırın.
10. TAG programı 10 °C bekletme sıcaklığına ulaşana kadar bekleyin ve ardından plakayı derhal çıkarın.
11. 96 kuyulu PCR plakasını oda sıcaklığında 2 dakika tutun ve ardından bir sonraki adıma geçin.

## Tagmantasyon Sonrası Temizleme

Bu adım PCR amplifikasyonu öncesinde eBLTS üzerindeki adaptör etiketli DNA'yı yıkar.

### Sarf Malzemeleri

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96 kuyulu PCR plakası manyetik standı
- Yapışkanlı kapak
- 8 tüplü şerit
- Pipet uçları
  - 20 µl çok kanallı pipetler
  - 200 µl çok kanallı pipetler
- Daha sonraki prosedür için hazırlayın:

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Dizin adaptör plakası

## Reaktifler Hakkında

- Plakanız için uygun manyetik standı kullandığınızdan emin olun. Bir PCR plakası için MIDI plakası manyetik standını kullanmak TWB2'nin boncuklara bağlanmasını engelleyebilir.
- Hatalı hacim aspirasyonu ve tamamlanmayan karıştırmadan kaçınmak amacıyla köpüklenmeyi en aza indirmek için TWB2'yi yavaşça pipetleyin.

## Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Kalem	Depolama	Talimatlar
EPM	-25 °C ila -15 °C	Buz üzerinde 1 saat süreyle çözdürün. Karıştırmak için ters çevirin, ardından kısa süre santrifüjleyin.
ST2	15 °C ila 30 °C	Çökelti gözlemlenirse 37 °C'de 10 dakika ısıtın ve ardından çökelti çözünene kadar vorteksleyin. Oda sıcaklığında kullanın.
TWB2	15 °C ila 30 °C	Oda sıcaklığında kullanın.
Dizin adaptör plakası	-25 °C ila -15 °C	30 dakika süreyle oda sıcaklığında çözdürün.

## Prosedür

1. Her tagmantasyon reaksiyonuna 10 µl ST2 ekleyin. Çok kanallı bir pipet kullanıyorsanız ST2'yi 8 tüplü şerit içine pipetleyin ve ardından uygun hacimleri PCR plakasına aktarın. Her numune sütunu veya satırı için yeni uçlar kullanın.
2. 50 µl'ye ayarlı bir 200 µl pipet kullanarak boncukları tekrar süspansiyon haline getirmek için her kuyuyu 10 kez yavaşça pipetleyin.  
Alternatif olarak, plakayı kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika boyunca çalkalayın. Gerektiğinde tekrarlayın.
3. Plakayı kapatın ve ardından 280 × g'de 10 saniye boyunca santrifüjleyin.
4. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
5. PCR plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (3 dakika) bekleyin.
6. [≤ 48 numune] Aşağıdaki şekilde üç kez yıkayın.
  - a. 60 µl'ye ayarlanmış 200 µl çok kanallı bir pipet kullanarak boncuk taneciğini hareket ettirmeden süzüntüyü çıkarın ve atın.
  - b. Manyetik stanttan çıkarın.
  - c. Hemen ardından, doğrudan boncuklara yavaşça 100 µl TWB2 ekleyin.

- d. Boncuklar tekrar süspansedilene dek yavaşça pipetleyin. Alternatif olarak, plakayı kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika boyunca çalkalayın.
  - e. Sıçrama meydana gelirse  $280 \times g$ 'de 10 saniye boyunca aşağı döndürün.
  - f. PCR plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (3 dakika) bekleyin. Üçüncü yıkama gerçekleştirilirken aşırı kurumayı önlemek için plakayı manyetik stant üzerinde ve TWB2'yi kuyularda bırakın. PCR Ana Karışımını hazırladıktan sonra süzüntüyü çıkarın ve atın.
  - g. 100 µl'ye ayarlanmış 200 µl çok kanallı bir pipet kullanarak süzüntüyü çıkarın ve atın.
  - h. Toplamda üç yıkama olacak şekilde c-f adımlarını iki kez tekrarlayın.
7. [ $> 48$  numune] Aşağıdaki şekilde üç kez yıkayın.
- a. Aşırı kurumayı önlemek için tüm sütunlar işlenene kadar b ve c adımlarını 1 sütundan 2 sütuna kadar artışlarla gerçekleştirin.
  - b. 60 µl'ye ayarlanmış 200 µl çok kanallı bir pipet kullanarak süzüntüyü çıkarın ve atın.
  - c. Manyetik stanttan çıkarın.
  - d. Hemen ardından, doğrudan boncuklara yavaşça 100 µl TWB2 dağıtın.
  - e. Boncuklar tekrar süspansedilene dek yavaşça pipetleyin. Alternatif olarak, plakayı kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika boyunca çalkalayın.
  - f. Sıçrama meydana gelirse  $280 \times g$ 'de 10 saniye boyunca aşağı döndürün.
  - g. PCR plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (3 dakika) bekleyin. Üçüncü yıkama gerçekleştirilirken aşırı kurumayı önlemek için plakayı manyetik stant üzerinde ve TWB2'yi kuyularda bırakın. PCR Ana Karışımını hazırladıktan sonra süzüntüyü çıkarın ve atın.
  - h. 100 µl'ye ayarlanmış 200 µl çok kanallı bir pipet kullanarak süzüntüyü çıkarın ve atın.
  - i. Manyetik stanttan çıkarın ve doğrudan boncuklara yavaşça 100 µl TWB2 ekleyin.
  - j. Her sütun işlenene kadar h ve i adımlarını 1 veya 2 sütun artışla tekrar edin.
  - k. Toplamda üç yıkama olacak şekilde e-h adımlarını iki kez tekrarlayın.
8. *Tagmente DNA'yı Amplifiye Etme* bölümündeki *Prosedürün 4* adımı kadar manyetik stant üzerinde tutun. Boncukların aşırı kurummasını önlemek için TWB2 kuyularda kalır.

## Tagmente DNA'yı Amplifiye Etme

Bu adım, sınırlı döngü PCR programı kullanarak tagmente DNA'yı amplifiye eder. PCR adımı Dizin 1 (i7) adaptörlerini, Dizin 2 (i5) adaptörlerini ve sekanslama kümesi oluşturma için gerekli sekansları ekler.

### Sarf Malzemeleri

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Dizin adaptör plakası
- 96 kuyulu PCR plakası
- Nükleaz içermeyen su

- Yapışkanlı kapak
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri
- Pipet uçları
  - 20 µl çok kanallı pipetler
  - 200 µl çok kanallı pipetler

## Reaktifler Hakkında

- Dizin adaptör plakaları
  - Bir kuyu, > 10 µl dizin adaptörleri içerebilir.
  - Dizin adaptör plakasına numuneleri eklemeyin.
  - Dizin plakasının her kuyusu yalnızca tek kullanımlıktır.

## Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Kalem	Depolama	Talimatlar
EPM	-25 °C ila -15 °C	4 °C'de veya buz üzerinde 1 saat süreyle çözündürün. Karıştırmak için ters çevirin, ardından kısa süre santrifüjleyin.
Dizin adaptör plakası	-25 °C ila -15 °C	30 dakika süreyle oda sıcaklığında çözündürün.

2. Aşağıdaki tabloda belirtilen uygun PCR döngüsü sayısını kullanarak aşağıda verilen eBLTS PCR programını bir termal döngüleyiciye kaydedin.
  - Kapağı önceden ısıtma seçeneğini seçin ve 100 °C'ye ayarlayın
  - Reaksiyon hacmini 50 µl olarak ayarlayın
  - 3 dakika boyunca 72 °C
  - 3 dakika boyunca 98 °C
  - X döngü:
    - 20 saniye boyunca 98 °C
    - 30 saniye boyunca 60 °C
    - 1 dakika boyunca 72 °C
  - 3 dakika boyunca 72 °C
  - 10 °C'de tutun

Toplam çalıştırma süresi 9 döngü için ~38 dakika ve 12 döngü için ~46 dakika.

Numune Girdisi Türü	PCR Döngü Sayısı (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1000 ng gDNA	9
FFPE'den ekstrakte edilen 50–1000 ng gDNA	12
Kandan ekstrakte edilen gDNA	9

## Prosedür

- PCR Ana Karışımını hazırlamak için aşağıdakileri birleştirin. Her hacmi, işlenen numune sayısı ile çarpın.
  - EPM (23 µl)
  - Nükleaz içermeyen su (23 µl)Reaktif fazlalığı hacme dahildir.
- PCR Ana Karışımını karıştırmak için 10 kez pipetleyin ardından kısa süre santrifüjleyin.
- Plaka manyetik standın üstüdeyken 200 µl çok kanallı pipet kullanarak TWB2'yi çıkarın ve atın. Kuyu duvarlarında kalan köpük, kütüphaneyisi advers olarak etkilemez.
- Manyetik stanttan çıkarın.
- Hemen 40 µl PCR Ana Karışımını doğrudan her kuyudaki boncuklara ekleyin.
- Boncuklar tamamen tekrar süspanse edilene dek karıştırmak için hemen pipetleyin. Alternatif olarak, plakayı kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika boyunca çalkalayın.
- Numune plakasını kapatın ve 280 × g'de 10 saniye boyunca santrifüjleyin.
- Dizin adaptör plakasını 1000 × g'de 1 dakika boyunca santrifüjleyin.
- Dizin adaptör plakasını hazırlayın.
  - [< 96 numune] Dizin adaptör plakası üzerindeki folyo kapağı her kuyu için yeni bir pipet ucuyla yalnızca işlenmekte olan numune sayısı kadar delin.
  - [96 numune] Yeni bir yarı etekli PCR plakasını dizin adaptör plakası üzerinde hizalayın ve folyo kapağı delmek için aşağı bastırın. Folyo kapağı delmek için kullanılan PCR plakasını atın.
- Yeni bir pipet ucu kullanarak, her kuyuya 10 µl önceden eşleştirilmiş dizin adaptörleri ekleyin.
- Karıştırmak için 40 µl'ye ayarlanmış bir pipet kullanarak 10 kez pipetleyin. Alternatif olarak, plakayı kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika boyunca çalkalayın.
- Plakayı kapatın ve ardından 280 × g'de 10 saniye boyunca santrifüjleyin.
- Termal döngüleyiciye yerleştirin ve eBLTS PCR programını çalıştırın.

## GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Durduruyorsanız -25 °C ila -15 °C'de maksimum 30 gün boyunca depolayın.

## Kütüphaneleri Temizleme

Bu adımda, amplifiye edilmiş kütüphaneleri saflaştırmak için çift taraflı boncuk saflaştırma prosedürü kullanılır.

### Sarf Malzemeleri

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Taze hazırlanmış %80 etanol (EtOH)
- 96 kuyulu 0,8 ml Polipropilen Derin Kuyulu Depolama Plakası (MIDI plakası)
- 96 kuyulu PCR plakası
- MIDI plakası manyetik standı
- PCR plakası manyetik standı
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri
- Nükleaz içermeyen su

### Reaktifler Hakkında

- Temizleme Boncukları
  - Her kullanımdan önce vorteksleyin.
  - Boncukların eşit olarak dağıtılmış olduğundan emin olmak için sıkça vorteksleyin.
  - Solüsyonun viskozitesi nedeniyle yavaşça aspire edin ve dağıtın.

### Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Kalem	Depolama	Talimatlar
CB	Oda sıcaklığı	Sıvının rengi homojen olana kadar karıştırmak için vorteksleyin ve ters çevirin.
RSB	2 °C ila 8 °C	30 dakika süreyle oda sıcaklığında çözündürün. Karıştırmak için vorteksleyin.

### Prosedür

1. 96 kuyulu PCR plakasını 1800 rpm'de 1 dakika çalkalayın ve ardından kısa süreyle santrifüjleyin.
2. PCR plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (1 dakika) bekleyin.
3. CB'yi 3 kez 10 saniye boyunca vorteksleyin ve ardından tekrar süspansiyon haline getirmek için birkaç kez ters çevirin.
4. Yüksek kalite gDNA için aşağıdakileri uygulayın.
  - a. Yeni bir MIDI plakasının her kuyusuna 77 µl nükleaz içermeyen su ekleyin.

- b. MIDI plakasının her kuyusuna 88 µl CB ekleyin.
  - c. PCR plakasının her kuyusundan MIDI plakasının karşılık gelen kuyusuna 45 µl süzüntü aktarın.
  - d. PCR plakasını atın.
  - e. Karıştırmak için her kuyuyu 10 kez pipetleyin. Alternatif olarak, plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 1 dakika boyunca çalkalayın.
  - f. Plakayı kapatın ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
  - g. Hava kabarcıkları için kontrol edin. Gözleniyorsa aşağı döndürün.
  - h. MIDI plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (5 dakika) bekleyin.
  - i. İnkübasyon esnasında, CB'yi iyice vorteksleyin ve ardından yeni bir MIDI plakasının *her kuyusuna* 20 µl ekleyin.
  - j. İlk MIDI plakasının her kuyusundan, (20 µl CB içeren) yeni MIDI plakasının karşılık gelen kuyusuna 200 µl süzüntü aktarın.
  - k. İlk MIDI plakasını atın.
  - l. Karıştırmak için yeni MIDI plakasının her kuyusunu 10 kez pipetleyin. Alternatif olarak, plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 1 dakika boyunca çalkalayın.
5. Ekstrakte edilmiş FFPE için aşağıdakileri uygulayın.
- a. Yeni bir MIDI plakasının her kuyusuna 81 µl CB ekleyin.
  - b. PCR plakasının her kuyusundan MIDI plakasının karşılık gelen kuyusuna 45 µl süzüntü aktarın.
  - c. PCR plakasını atın.
  - d. Karıştırmak için her kuyuyu 10 kez pipetleyin. Alternatif olarak, plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 1 dakika boyunca çalkalayın.
6. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
7. Hava kabarcıkları için kontrol edin. Gözleniyorsa aşağı döndürün.
8. MIDI plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (5 dakika) bekleyin.
9. Boncukları hareket ettirmeden süzüntüyü çıkarın ve atın.
10. Boncukları aşağıdaki gibi yıkayın.
- a. Plaka manyetik standın üzerindeyken, karıştırmadan 200 µl taze %80 EtOH ekleyin.
  - b. 30 saniye boyunca inkübe edin.
  - c. Boncukları hareket ettirmeden süzüntüyü çıkarın ve atın.
11. Boncukları **ikinci** kez yıkayın.
12. Manyetik standın üzerinde 5 dakika boyunca hava ile kurutun.
13. Hava ile kuruturken, 20 µl pipet kullanarak kalıntı EtOH'yi çıkarın ve atın.
14. Manyetik standtan çıkarın.
15. Boncuklara 17 µl RSB ekleyin.
16. Plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 2 dakika boyunca çalkalayın.
17. 2 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.

18. Hava kabarcıkları için kontrol edin. Gözleniyorsa aşağı döndürün.
19. Plakayı MIDI plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (2 dakika) bekleyin.
20. Yeni bir 96 kuyulu PCR plakasına 15 µl süzüntü aktarın.

### GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Duruyorsanız plakayı kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de maksimum 30 gün boyunca depolayın.

## Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Havuzlama

Bu adım benzersiz dizinlere sahip DNA kütüphanelerini 12 kütüphaneye kadar içerebilen bir havuzda birleştirir.

### Havuzlama Yöntemleri

Hacim veya kütleye göre havuzlayabilirsiniz. Girdiniz için uygun yöntemi belirlemek için aşağıdaki tabloyu kullanın.

Tablo 2 Önerilen Havuzlama Yöntemleri

Numune Girdisi	Havuzlama Yöntemi
10–49 ng gDNA	Kütle
50–1000 ng gDNA	Hacim
FFPE'den ekstrakte edilen gDNA	Kütle
Kandan ekstrakte edilen gDNA	Hacim

- 1-plex zenginleştirme, önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin havuzlanmasını gerektirmez. Ancak RSB eklenmesi gerekli olabilir.
- Önceden zenginleştirilmiş kütüphane miktar tayini sonrasında, ideal dizin dengesi elde etmek için tüm numune girdi türleri kütleye göre havuzlanabilir.
- Ayrı deneysel hazırlıklarda elde edilen önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin nihai verimleri değişkenlik gösterebilir. Bu nedenle, ideal dizin dengesi elde etmek için kütleye göre havuzlama önerilir.
- Aşağıdaki durumlar için 1-plex zenginleştirme kullanın.
  - 10–49 ng gDNA
  - FFPE'den ekstrakte edilen 50–1000 ng gDNA
  - Somatik varyant arama için düşük minör alel frekansı saptama

### Kütleye göre Havuzlama

Aşağıdaki durumlarda, [Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Eşit Konsantrasyonda Havuzlama, sayfa 33](#).

- 10–49 ng gDNA numune girdisi
- FFPE numune girdisinden ekstrakte edilen 50–1000 ng gDNA



- Somatik varyant arama için düşük minör alel frekansı saptama
- İdeal dizin dengesi için kandan ekstrakte edilen gDNA

## Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphanelerin Miktar Tayinini Yapma

1. Tercih ettiğiniz dsDNA ek boyası kullanan florometrik bazlı bir miktar tayini yöntemi kullanarak 1 µl zenginleştirilmiş kütüphane çalıştırın.
  - 50–1000 ng yüksek kalite gDNA için  $\geq 500$  ng önceden zenginleştirilmiş kütüphane verimi bekleyin.
  - 50–1000 ng FFPE'den ekstrakte edilmiş gDNA için ilk numunenin kalitesine bağlı olarak 500–6000 ng önceden zenginleştirilmiş kütüphane verimi bekleyin.

**NOT** Farklı biasları olan miktar tayini yöntemleri için, miktar tayininin bu iş akışına yönelik kalifikasyonunu yapın. Konsantrasyon sonuçları kullanılan yöntemle bağlı olarak farklılık gösterebilir.

## Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Eşit Konsantrasyonda Havuzlama

Numune türü ve zenginleştirme çok zamanlılığına göre zenginleştirme için gereken kütüphane başına DNA kütlelerini belirlemek için aşağıdaki tabloyu kullanın. Önerilenden daha düşük önceden zenginleştirilmiş kütüphane verimleri kullanıldığında ideal zenginleştirme verimleri ve test performansı garanti edilmez.

Zenginleştirme reaksiyonundaki toplam DNA kütlesi 6000 ng'yi aşmamalıdır.

Numune Girdisi	Zenginleştirme Çok Zamanlılığı	Kütüphane başına DNA Kütleleri (ng)	Toplam DNA Kütüphane Kütleleri (ng)
Yüksek kalite gDNA	12	250–500	3000–6000
FFPE'den ekstrakte edilen gDNA	1	200	200

1. Bu adımda havuzlamayı planladığınız kütüphaneler için dizinleri kaydedin.
2. Her kütüphanenin konsantrasyonuna bağlı olarak, gerekli DNA kütlelerini elde etmek için zenginleştirme reaksiyonuna eklenmesi gereken hacmi hesaplayın.
  - Yüksek kalite gDNA: 250–500 ng girdi için gereken kütüphane hacmini hesaplayın.
  - FFPE'den ekstrakte edilen gDNA: 200 ng girdi için gereken kütüphane hacmini hesaplayın.
3. Her kütüphane için hesaplanan hacmi, PCR plakasının aynı kuyusuna ekleyin.
4. Yüksek kalite gDNA kullanıyorsanız havuzlanmış önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin toplam hacmine bağlı olarak aşağıdakilerden birini gerçekleştirin:
  - Önceden zenginleştirilmiş kütüphane hacmi = 30 µl ise şuraya geçin: [Probları Hibritleştirme, sayfa 35](#).
  - Önceden zenginleştirilmiş kütüphane hacmi < 30 µl ise 30 µl toplam hacme ulaşmak için RSB ekleyin.

- Önceden zenginleştirilmiş kütüphane hacmi > 30 µl ise havuzlanmış numuneyi konsantrale hale getirmek için boncuk bazlı bir yöntem veya vakum konsantratörü kullanın. 30 µl toplam hacme ulaşmak için konsantrale havuzlanmış numuneye RSB ekleyin.
5. FFPE'den ekstrakte edilen gDNA kullanıyorsanız havuzlanmış önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin toplam hacmine bağlı olarak aşağıdakilerden birini gerçekleştirin.
- Önceden zenginleştirilmiş kütüphane hacmi = 7,5 µl ise şuraya geçin: [Probları Hibritleştirme, sayfa 35](#).
  - Önceden zenginleştirilmiş kütüphane hacmi < 7,5 µl ise 7,5 µl toplam hacme ulaşmak için RSB ekleyin.

## GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Duruyorsanız plakayı kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de maksimum 30 gün boyunca depolayın.

## Hacme göre Havuzlama

Girdi 50– 1000 ng gDNA olduğunda, aynı deneyde oluşturulan kütüphanelerin miktar tayini ve normalleştirilmesi gerekli değildir.

İdeal performans elde etmek için yalnızca aynı kullanıcı, reaktif lotu ve dizin adaptör plakası ile hazırlanan önceden zenginleştirilmiş kütüphane numunelerini havuzlayın.

1. Bu adımda havuzlamayı planladığınız kütüphaneler için dizinleri kaydedin.
2. Zenginleştirme çok zamanlılığınız için aşağıdaki önceden zenginleştirilmiş kütüphane ve RSB hacimlerini yeni bir PCR plakasının aynı kuyusuna birleştirin.  
Elde edilen hacim 30 µl olur.

Zenginleştirme Çok Zamanlılığı *	Her Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphane Hacmi (µl)	RSB Hacmi (µl)
1-plex	14	16
2-plex	14	2
3-plex	10	0
4-plex	7,5	0
5-plex	6	0
6-plex	5	0
7-plex	4,2	0,6
8-plex	3,7	0,4
9-plex	3,3	0,3
10-plex	3	0
11-plex	2,7	0,3
12-plex	2,5	0

\*Standart olmayan çok zamanlılıklar (2-plex ila 11-plex) hakkında bilgi için bkz. [Prosedür Kısıtlamaları, sayfa 2](#).

**GÜVENLİ DURMA NOKTASI**

Duruyorsanız plakayı kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de maksimum 30 gün boyunca depolayın.

## [İsteğe bağlı] Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphanelerin Kalifikasyonunu Yapma

Hacme göre havuzlanıyorsa önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin miktar tayini için dsDNA ek boyası kullanan florometrik bazlı bir yöntem kullanın. Önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin kalifikasyonunu yapmak için, uygun fragman analiz kiti olan bir DNA fragman analizörü kullanın.

Kütüphane kalifikasyonu için toplamda 1 µl kullanın. Önceden zenginleştirilmiş kütüphaneler miktar tayini veya fragman analizi için küçük seyreltmelere izin verecek kadar konsantredir.

## Probları Hibritleştirme

Bu adım DNA'nın hedeflenen bölgelerini Yakalama problemleri ile bağlar.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reaktifleri hem Illumina hem üçüncü taraf zenginleştirme DNA oligonükleotid panelleri ile uyumludur. Üçüncü taraf panellere yönelik gerekli spesifikasyonlar hakkında bilgi için bkz. [Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri, sayfa 9](#).

### Sarf Malzemeleri

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (mavi kapak)
- Zenginleştirme probu paneli
- 96 kuyulu PCR plakası
- Yapışkanlı kapak
- Daha sonraki prosedür için hazırlayın:
  - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
  - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (amber kapak)

### Reaktifler Hakkında

- NHB2, depolama sırasında çökelir ve ayrılır.
- Zenginleştirme probu paneli, Illumina'dan alınan, seçilen zenginleştirme oligonükleotid panelini ifade eder.

### Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Kalem	Depolama	Talimatlar
EHB2	2 °C ila 8 °C	Oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için vorteksleyin. Kristaller veya bulanıklık gözlemlenirse solüsyon şeffaf olana kadar vortekslemeyi tekrarlayın veya karıştırmak için yukarı ve aşağı pipetleyin.
Zenginleştirme Probu Paneli	-25 °C ila -15 °C (Illumina)	Hem Illumina hem üçüncü taraf paneller için, oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için vorteksleyin.
NHB2 (mavi kapak)	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözdürün. Oda sıcaklığında, bir mikro numune inkübatöründe 5 dakika boyunca kullandığınız prob ile aynı sıcaklığa ön ısıtma yapın. Tekrar süspansiyon haline getirmek için her birini maksimum hızda 10 saniye boyunca 3 kez vorteksleyin. Kısa süre santrifüjleyin. Tüpün altından yukarı ve aşağı pipetleyin. Kristaller veya bulanıklık gözlemlenirse solüsyon şeffaf olana kadar vortekslemeyi tekrarlayın veya karıştırmak için yukarı ve aşağı pipetleyin. Çökelti oluşmasından kaçınmak için henüz ılıkken kullanın.
SMB3*	2 °C ila 8 °C	HİB programında 90 dakika beklettikten hemen sonra bir sonraki prosedüre geçiyorsanız HİB programını başlatmadan en az 2 saat önce oda sıcaklığına getirin.
EEW* (amber tüp)	-25 °C ila -15 °C	HİB programında 90 dakika beklettikten hemen sonra bir sonraki prosedüre geçiyorsanız HİB programını başlatmadan en az 2 saat önce oda sıcaklığına getirin. Oda sıcaklığında, HİB programı sonlanmadan önce bir mikro numune inkübatöründe 30 dakika süreyle uygun hibritleştirme ve yakalama sıcaklığına ön ısıtma yapın.

\*Bir sonraki prosedüre geçmeden duruyorsanız o prosedüre geçene dek bu reaktifleri hazırlamayı erteleyin.

2. **Tablo 3** içinde listelenen uygun döngü sayısını kullanarak aşağıdaki HİB programını bir termal döngüleyiciye kaydedin.

- Kapağı önceden ısıtma seçeneğini seçin ve 100 °C'ye ayarlayın
- Reaksiyon hacmini ayarlayın
  - [Yüksek kalite gDNA] 100 µl
  - [FFPE'den ekstrakte edilen gDNA] 25 µl
- 5 dakika boyunca 98 °C
- İlk döngü için 98 °C'de başlayıp ardından döngü başına 2 °C azalacak şekilde her biri 1 dakikalık X döngü
- Uygun sıcaklıkta 90 dakika tutun:

- [FFPE'den ekstrakte edilen gDNA] 58 °C
- [80 mer prob panelleri] 58 °C
- [Somatik varyant arama] 58 °C
- [Tüm diğerleri] 62 °C

Toplam çalıştırma süresi ~115 dakika.

Tablo 3 Numune veya Panel Başına Döngü Sayısı

Numune ve Panel Türü	Döngü Sayısı (X)
FFPE'den ekstrakte edilen gDNA (panel türünden bağımsız)	20
80 mer prob panelleri (numune türünden bağımsız)	20
Somatik varyant arama	20
Tüm diğer numune ve paneller	18

## Prosedür

1. [Yüksek kalite gDNA] Aşağıdaki reaktifleri *listelenen sırada* PCR plakasındaki her havuzlanmış kütüphaneye ekleyin.  
Bir ana karışım oluşturmayın. NHB2 ve EHB2'nin bir ana karışımını oluşturmak, zenginleştirme performansını olumsuz etkiler.
  - NHB2 (mavi kapak) (50 µl)
  - Zenginleştirme probu paneli (10 µl)
  - EHB2 (10 µl)
2. [Yüksek kalite gDNA] 90 µl'ye ayarlı bir pipet kullanarak her kuyuyu 10 kez pipetleyerek karıştırın.
3. [FFPE'den ekstrakte edilen gDNA] Aşağıdaki reaktifleri *listelenen sırada* PCR plakasındaki her havuzlanmış kütüphaneye ekleyin.  
Bir ana karışım oluşturmayın. NHB2 ve EHB2'nin bir ana karışımını oluşturmak, zenginleştirme performansını olumsuz etkiler.
  - NHB2 (mavi kapak) (12,5 µl)
  - Zenginleştirme probu paneli (2,5 µl)
  - EHB2 (2,5 µl)
4. [FFPE'den ekstrakte edilen gDNA] 20 µl'ye ayarlı bir pipet kullanarak her kuyuyu 10 kez pipetleyerek karıştırın.
5. Plakayı kapatın ve 280 × g'de 10 saniye boyunca santrifüjleyin.
6. Numune plakasını önceden programlanmış termal döngüleyiciye yerleştirin ve HİB programını çalıştırın.
7. HİB programı sıcaklık bekletme süresi sona erdiğinde hemen bir sonraki prosedüre geçin.

**DİKKAT**

Hibritleştirme reaksiyonunun sıcaklığı oda sıcaklığının altına düşerse çökelti oluşur.

## Hibritleştirilmiş Probları Yakalama

Bu adımda, hedeflenen ilgi alanlarına hibritleştirilmiş probları yakalamak için Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) kullanılır.

### Sarf Malzemeleri

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (amber kapak)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü
- 96 kuyulu MIDI plakası
- 96 kuyulu PCR plakası
- Yapışkanlı kapak
- MIDI plakası manyetik standı
- Daha sonraki prosedür için hazırlayın:
  - Enhanced PCR Mix (EPM)
  - PCR Primer Cocktail (PPC)

### Reaktifler Hakkında

- EEW
  - Mikro numune inkübatöründe ön ısıtma yapmadan önce EEW'nin en az 2 saat boyunca oda sıcaklığında çözdürüldüğünden emin olun.
  - HİB programı sonlanmadan önce EEW'nin bir mikro numune inkübatöründe 30 dakika ısıtıldığından emin olun.
  - Kullanılmadığı zaman EEW'yi mikro numune inkübatöründe bırakın. EEW, protokol boyunca ısıtılmış halde kalmalıdır.
  - Oda sıcaklığına ulaştığında bulanık olabilir.
  - Sarı renkli görünebilir.
- SMB3
  - SMB3 kullanımdan önce oda sıcaklığında olmalıdır.

## Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın.

Kalem	Depolama	Talimatlar
SMB3	2 °C ila 8 °C	Oda sıcaklığına gelmesi için 2 saat bekletin. Ters çevirin ve ardından tekrar süspansiyon edilene dek vorteksleyin.
EEW (amber tüp)	-25 °C ila -15 °C	2 saat oda sıcaklığında inkübasyon sonrasında, HİB programı sonlanmadan önce bir mikro numune inkübatöründe 30 dakika süreyle uygun hibritleştirme ve yakalama sıcaklığına ön ısıtma yapın.
EE1	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözündürün ve ardından vorteksleyin.
HP3	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözündürün ve ardından vorteksleyin.
ET2	2 °C ila 8 °C	Oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için vorteksleyin.
EPM	-25 °C ila -15 °C	Buz üzerinde bir saat süreyle çözündürün. Karıştırmak için ters çevirin, ardından kısa süre santrifüjleyin. Buzun üzerine koyun.
PPC	-25 °C ila -15 °C	Buz üzerinde bir saat süreyle çözündürün. Karıştırmak için vorteksleyin, ardından kısa süre santrifüjleyin. Buzun üzerine koyun.

2. Numune plakasını aşağıdaki sıcaklıklardan birine inkübe etmek için bir MIDI ısı bloğu ek parçasıyla bir mikro numune inkübatörüne ön ısıtma uygulayın. EEW'yi önceden ısıtmak için isteğe bağlı ikinci bir mikro numune inkübatörü kullanılabilir. EEW'yi MIDI ısı bloğu ek parçasının üzerine yerleştirin.
  - [FFPE] 58 °C
  - [Prob paneli başına 80 mer] 58 °C
  - [Somatik varyant arama] 58 °C
  - [Tüm diğerleri] 62 °C

## Prosedür

### Yakalama

1. SMB3'ü aşağıdaki gibi yeni MIDI plakasının karşılık gelen kuyusuna ekleyin.
  - [Yüksek kalite gDNA] 250 µl SMB3 ekleyin.
  - [FFPE'den ekstrakte edilmiş gDNA] 62,5 µl SMB3 ekleyin.
2. Yüksek kalite gDNA için 100 µl veya FFPE için 25 µl'ye ayarlanmış bir pipet kullanarak her havuzlanmış kütüphaneyi 96 kuyulu PCR plakasından yeni MIDI plakasının karşılık gelen kuyusuna taşıyın .
3. Plakayı kapatın ve 1200 rpm'de 4 dakika boyunca çalkalayın.
4. Sıçrama meydana gelirse plakayı kısa süreyle santrifüjleyin.

5. Havuzlanmış kütüphane plakasını EEW tüpünün altındaki mikro numune inkübatörü üzerindeki MIDI ısı bloğu ek parçasının üzerine yerleştirin, kapağı kapatın ve ardından uygun sıcaklıkta 15 dakika inkübe edin:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80 mer prob paneli] 58 °C
  - [Somatik varyant arama] 58 °C
  - [Tüm diğerleri] 62 °C
6. Havuzlanmış kütüphaneler plakasını çıkarın ve 280 × g'de 30 saniye süreyle santrifüjleyin.
7. Hemen bir MIDI plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (2 dakika) bekleyin.
8. **[Yüksek kalite gDNA]** 200 µl'ye ayarlı bir pipet kullanarak boncuk taneciğini hareket ettirmeden her kuyudan tüm süzüntüyü çıkarın ve atın.
9. **[FFPE'den ekstrakte edilmiş gDNA]** 90 µl'ye ayarlı bir pipet kullanarak boncuk taneciğini hareket ettirmeden her kuyudan tüm süzüntüyü çıkarın ve atın.
10. Kalan tüm süzüntüyü çıkarın ve atın.

## Yıkama

1. Manyetik stanttan çıkarın.
2. **[Yüksek kalite gDNA]** EEW'yi hızlıca mikro numune inkübatöründen çıkarın ve her kuyuya 200 µl ekleyin.
3. **[FFPE'den ekstrakte edilen gDNA]** EEW'yi hızlıca mikro numune inkübatöründen çıkarın ve her kuyuya 50 µl ekleyin.
4. Kullanılmayan EEW'yi mikro numune inkübatörüne geri koyun ve ısıtılmış halde tutun.
5. Kapatın ve 1800 rpm'de 4 dakika boyunca çalkalayın.
6. Numune plakasını EEW tüpünün altındaki mikro numune inkübatörü içindeki MIDI ısı bloğu ek parçasının üzerine yerleştirin, kapağı kapatın ve ardından uygun sıcaklıkta 5 dakika inkübe edin:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80 mer prob panelleri] 58 °C
  - [Somatik varyant arama] 58 °C
  - [Tüm diğer paneller] 62 °C
7. Hemen bir MIDI plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (2 dakika) bekleyin.
8. Yüksek kalite gDNA için 200 µl'ye veya FFPE için 50 µl'ye ayarlı bir pipet kullanarak her kuyudan tüm süzüntüyü çıkarın ve atın.
9. Toplamda üç yıkama olacak şekilde 1–8 adımlarını iki kez tekrarlayın.



## Aktarma Yıkaması

1. Manyetik stanttan çıkarın.
2. [Yüksek kalite gDNA ] EEW'yi hızlıca mikro numune inkübatöründen çıkarın ve her kuyuya 200 µl ekleyin.
3. [FFPE'den ekstrakte edilen gDNA] EEW'yi hızlıca mikro numune inkübatöründen çıkarın ve her kuyuya 50 µl ekleyin.
4. Kapatın ve 1800 rpm'de 4 dakika boyunca çalkalayın. Sıçrama meydana gelirse hızı 1600 rpm'ye düşürün.
5. Tekrar süspansiyon haline getirilmiş boncuk solüsyonunu yeni bir MIDI plakasına aktarın.  
Numunelerin birazı kuyularda kalabilir.



### DİKKAT

Reaktifin aktarılması, akış aşağı PCR'yi engelleyebilecek kalıntı reaktiflerin taşınmasını en aza indirir.

6. Numune plakasını mikro numune inkübatöründeki MIDI ısı bloğu ek parçasının üzerine yerleştirin, kapağı kapatın ve ardından uygun sıcaklıkta 5 dakika inkübe edin:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80 mer prob panelleri] 58 °C
  - [Somatik varyant arama] 58 °C
  - [Tüm diğerleri] 62 °C
7. Hemen bir MIDI plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (2 dakika) bekleyin.
8. Yüksek kalite gDNA için 200 µl'ye veya FFPE için 50 µl'ye ayarlı bir pipet kullanarak her kuyudan tüm süzüntüyü çıkarın ve atın.
9. Plakayı 280 x g'de 30 saniye boyunca santrifüjleyin.
10. 10 saniye boyunca MIDI plakası manyetik standı üzerine yerleştirin.
11. 20 µl pipet kullanarak her kuyudan kalıntı sıvıyı çıkarın ve atın.
12. Boncukların aşırı kurumasını ve kütüphane verimi kaybını önlemek için hemen [Elüsyon, sayfa 41](#) bölümüne geçin.

## Elüsyon

1. Bir Elüsyon Ana Karışımı hazırlamak için aşağıdaki hacimleri birleştirin. Her hacmi, işlenen havuzlanmış kütüphane sayısı ile çarpın.
  - EE1 (28,5 µl)
  - HP3 (1,5 µl)İlave reaktif fazlalığı hacme dahildir.
2. Vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
3. MIDI plakasını manyetik stanttan çıkarın.
4. Her kuyuya 23 µl Elüsyon Ana Karışımı ekleyin.

- Plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 2 dakika boyunca çalkalayın.
- Plakayı 2 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
- 280 x g'de 30 saniye boyunca santrifüjleyin.
- Bir MIDI plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (2 dakika) bekleyin.
- MIDI plakasından yeni 96 kuyulu PCR plakasının karşılık gelen kuyusuna 21 µl süzüntü aktarın.
- MIDI plakasını atın.
- 21 µl süzüntü içeren her kuyuya 4 µl ET2 ekleyin.
- Pipeti 20 µl'ye ayarlayın ve karıştırmak için her kuyuyu 10 kez yavaşça pipetleyin.
- Plakayı kapatın ve ardından 280 x g'de 10 saniye boyunca santrifüjleyin.
- Plakayı 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.

## Zenginleştirilmiş Kütüphaneyi Amplifiye Etme

Bu adımda zenginleştirilmiş kütüphaneyi amplifiye etmek için PCR kullanılır.

### Sarf Malzemeleri

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Yapışkanlı kapak

### Hazırlık

- Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Kalem	Depolama	Talimatlar
EPM	-25 °C ila -15 °C	4 °C'de veya buz üzerinde bir saat süreyle çözündürün. Karıştırmak için ters çevirin, ardından kısa süre santrifüjleyin. Buzun üzerine koyun.
PPC	-25 °C ila -15 °C	4 °C'de buz üzerinde bir saat süreyle çözündürün. Karıştırmak için vorteksleyin, ardından kısa süre santrifüjleyin. Buzun üzerine koyun.

2. Aşağıdaki tabloda listelenen uygun PCR döngüsü sayısını kullanarak aşağıda verilen AMP programını bir termal döngüleyiciye kaydedin.

- Kapağı önceden ısıtma seçeneğini seçin ve 100 °C'ye ayarlayın
- Reaksiyon hacmini 50 µl olarak ayarlayın
- 45 saniye boyunca 98 °C
- (X) döngü:
  - 30 saniye boyunca 98 °C
  - 30 saniye boyunca 60 °C
  - 30 saniye boyunca 72 °C
- 5 dakika boyunca 72 °C
- 10 °C'de tutun

Toplam çalıştırma süresi ~35 dakika.

Numune ve Panel Türü	(X) Döngü
FPPE	14
Yüksek kalite gDNA için Illumina Exome Panel (CEX)	10
FFPE için Illumina Exome Panel (CEX)	12
Tüm diğer numune ve paneller	12 <sup>1234</sup>

<sup>1</sup> Takip eden optimizasyon yoluyla küçük üçüncü taraf paneller için 15 döngüye kadar ayarlanabilir. FFPE kullanılıyorsa döngü sayısı 17'ye kadar ayarlanabilir.

<sup>2</sup> Yalnızca 500 probu olan üçüncü taraf paneller için 17 döngüye kadar ayarlanabilir. FFPE kullanılıyorsa döngü sayısı 19'eye kadar ayarlanabilir.

<sup>3</sup> FFPE numuneleri için 14 döngüye kadar ayarlanabilir.

<sup>4</sup> PCR döngüsü sayısının artırılması FFPE numuneleri için daha yüksek kopya oranı ve daha küçük fragman boyutları ile sonuçlanabilir.

## Prosedür

1. Her kuyuya 5 µl PPC ekleyin.
2. Her kuyuya 20 µl EPM ekleyin.
3. Plakayı kapatın ve 1200 rpm'de 1 dakika boyunca çalkalayın.
4. Plakayı 280 × g'de 10 saniye boyunca santrifüjleyin.
5. Önceden programlanmış termal döngüleyiciye yerleştirin ve AMP programını çalıştırın.

## GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Durduruyorsanız 2 °C ila 8 °C'de maksimum iki gün boyunca depolayın. Alternatif olarak termal döngüleyiciyi 24 saate kadar açık bırakın.

## Amplifiye Edilmiş Zenginleştirilmiş Kütüphaneyi Temizleme

Bu adımda, zenginleştirilmiş kütüphaneyi saflaştırmak ve istenmeyen ürünleri çıkarmak için Cleanup Beads kullanılır.

### Sarf Malzemeleri

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Taze hazırlanmış %80 etanol (EtOH)
- Yapışkanlı kapaklar
- 96 kuyulu MIDI plakası
- 96 kuyulu PCR plakası
- MIDI plakası manyetik standı

### Reaktifler Hakkında

- Temizleme Boncukları
  - Her kullanımdan önce vorteksleyin.
  - Boncukların eşit olarak dağıtılmış olduğundan emin olmak için sıkça vorteksleyin.
  - Solüsyonun viskozitesi nedeniyle yavaşça aspire edin ve dağıtın.

### Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın.

Kalem	Depolama	Talimatlar
CB	Oda sıcaklığı	Sıvının rengi homojen olana kadar karıştırmak için vorteksleyin ve ters çevirin.
RSB	2 °C ila 8 C	Oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için vorteksleyin.

2. Mutlak etanolden taze %80 EtOH hazırlayın.

### Prosedür

1. PCR plakasını 280 x g'de 10 saniye boyunca santrifüjleyin.
2. CB'yi 3 kez 10 saniye boyunca vorteksleyin ve ardından ters çevirin.
3. Yeni bir **MIDI** plakasının her kuyusuna 40,5 µl CB ekleyin.
4. PCR plakasının her kuyusundan MIDI plakasının karşılık gelen kuyusuna 45 µl aktarın.
5. Plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 1 dakika boyunca çalkalayın.
6. MIDI plakasını 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.

7. 280 × g'de 10 saniye boyunca santrifüjleyin.
8. Bir MIDI plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (5 dakika) bekleyin.
9. 95 µl'ye ayarlı bir pipet kullanarak her kuyudan tüm süzüntüyü çıkarın ve atın.
10. Aşağıdaki gibi iki kez yıkayın.
  - a. Plaka manyetik standın üzerindeyken, karıştırmadan 200 µl taze %80 EtOH ekleyin.
  - b. 30 saniye boyunca inkübe edin.
  - c. Boncukları hareket ettirmeden süzüntüyü çıkarın ve atın.
11. Manyetik standın üzerinde 5 dakika boyunca hava ile kurutun.
12. Hava ile kuruturken, 20 µl pipet kullanarak her kuyudan kalıntı EtOH'yi çıkarın ve atın.
13. Manyetik standtan çıkarın ve her kuyuya 32 µl RSB ekleyin.
14. Plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 1 dakika boyunca çalkalayın.
15. Plakayı 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
16. 280 × g'de 10 saniye boyunca santrifüjleyin.
17. Bir MIDI plakası manyetik standı üzerine yerleştirin ve sıvı şeffaf olana kadar (2 dakika) bekleyin.
18. 96 kuyulu MIDI plakasından yeni PCR plakasının karşılık gelen kuyusuna 30 µl süzüntü aktarın.
19. MIDI plakasını atın.

#### GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Duruyorsanız plakayı kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de maksimum 7 gün boyunca depolayın.

## Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Denetleme

Çift zincirli gDNA girdisinin miktar tayinini yapmak için ek boya kullanan floresan bazlı bir yöntem kullanın. NanoDrop veya diğer UV absorpsiyon yöntemleri gibi toplam nükleik asidi ölçen yöntemlerden kaçınınız.

1. Miktar tayini yönteminizi kullanarak 1 µl zenginleştirilmiş kütüphane çalıştırın.

**NOT** Toplam prob molaritesi zenginleştirme sonrası kütüphane verimini orantılı olarak etkiler.

125–235 bp ortalama fragman boyutunun ve boyut aralığı ~200 bp ila ~1000 bp olan DNA fragman dağılımının elde edilmesi beklenir.

## Kütüphaneleri Başlangıç Konsantrasyonuna Seyreltme

Bu adım, kütüphaneleri sekanslama sisteminiz için başlangıç konsantrasyonuna seyreltir ve seri seyreltmenin ilk adımıdır. Başlangıç konsantrasyonuna seyreltmeden sonra kütüphaneler denşirilmeye ve nihai yükleme konsantrasyonuna seyreltilmeye hazırdır.

Illumina, sekanslama için, kullanılan zenginleştirme probu panelinden bağımsız olarak Dizin Okuma başına 10 döngü ve okuma başına 151 döngü ile çift sonlu bir çalıştırma (2 × 151) ayarlanmasını önerir. Daha az sayıda örtüşen okuma veya daha az ham kapsam istenirse, 2 × 126 veya 2 x 101 olarak daha az sekanslanabilir.

1. Kütüphanenin veya havuzlanan kütüphanelerin molarite değerini aşağıdaki formülü kullanarak hesaplayın.

- Bir DNA fragman analiz cihazında kalifikasyonu yapılan kütüphaneler için, kütüphane için elde edilen ortalama boyutu kullanın.
- Diğer tüm kalifikasyon yöntemleri için ortalama kütüphane boyutu olarak 350 bp kullanın.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \frac{\text{ortalama kitaplık boyutu (bp)}}{}} = \text{Molarite (nM)}$$

Örneğin, kütüphane konsantrasyonunuz 20 ng/μl ve ortalama boyut 350 bp ise elde edilen molarite değeri 86,58 nM olur.

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

2. Molarite değerini kullanarak kütüphaneleri sisteminiz için başlangıç konsantrasyonuna seyreltmek için gereken RSB ve kütüphane hacimlerini hesaplayın.

Sekanslama Sistemi	Minimum Gereken Kütüphane Hacmi (μl)	Başlangıç Konsantrasyonu (nM)	Nihai Yükleme Konsantrasyonu (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) veya 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM, 350 pM nihai yükleme konsantrasyonu için başlangıç konsantrasyonudur. Gerekliyse, aşağıdaki tabloyu kullanarak nihai yükleme konsantrasyonunu ayarlayın.

Nihai Yükleme Konsantrasyonu (pM)	Havuzlanmış Kütüphane Konsantrasyonu (nM)
100	0,50
150	0,75

Nihai Yükleme Konsantrasyonu (pM)	Havuzlanmış Kütüphane Konsantrasyonu (nM)
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

- RSB kullanarak kütüphaneleri seyreltin:
  - Çoğullama yapılmış kütüphane havuzu olarak miktar tayini yapılan kütüphaneler**—Havuzu sisteminiz için başlangıç konsantrasyonuna seyreltin.
  - Ayrı ayrı miktar tayini yapılan kütüphaneler**—Her kütüphaneyi sisteminiz için başlangıç konsantrasyonuna seyreltin. Çoğullama yapılmış bir kütüphane havuzu oluşturmak için her seyreltilmiş kütüphanenin 10 µl'sini bir tüpe ekleyin.
- Nihai yükleme konsantrasyonuna seyreltmek için sisteminize yönelik denşirme ve seyreltme talimatlarını uygulayın.
  - NextSeq 550Dx Sistemi için, bkz. [NextSeq 550Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 47](#).
  - MiSeqDx Sistemi için, bkz. [MiSeqDx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 49](#).
  - NovaSeq 6000Dx Sistemi için, bkz. [NovaSeq 6000Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 50](#).

Nihai yükleme konsantrasyonları bir başlangıç noktası ve genel yönergelerdir. Takip eden sekanslama çalıştırmaları üzerinden veya akış hücresi titrasyonu yoluyla iş akışınız ve miktar tayini yönteminiz için konsantrasyonları optimize edin.

## NextSeq 550Dx Sekanslama Hazırlığı

NextSeq 550Dx sekanslama sisteminde sekanslama için kütüphanelerin denşirme ve seyreltilmesine yönelik aşağıdaki talimatları uygulayın.

### Sarf Malzemeleri

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

## Hazırlık

Sekanslama için kütüphaneleri seyreltmek amacıyla taze bir 0,2 N NaOH seyreltisi hazırlayın. Küçük pipetleme hatalarının nihai NaOH konsantrasyonunu etkilemesini engellemek için ekstra hacim hazırlanır.



### DİKKAT

Taze seyreltilmiş 0,2 N NaOH denşirme işlemi için önemlidir. Uygun olmayan denşirme verimi düşürebilir.

- 1N NaOH 'yi 0,2 N NaOH'ye seyreltmek için aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin:
1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın.

Kalem	Depolama	Talimatlar
-------	----------	------------

HT1	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözdürün. Denşirilmiş kütüphaneleri seyreltmeye hazır olana dek 2 °C ile 8 °C arasında depolayın.
-----	----------------------	--

2. Taze bir NaOH seyreltmesi hazırlamak için aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin:
  - Laboratuvar sınıfı su (800 µl)
  - 1N NaOH (200 µl)Sonuç olarak 1 ml 0,2 N NaOH elde edilir.
3. Karıştırmak için tüpü birkaç kez ters çevirin.
4. 200 mM Tris-HCl, pH 7,0 hazırlamak için aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin.
  - Laboratuvar sınıfı su (800 µl)
  - 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)Sonuç olarak 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0 elde edilir.

**NOT** Tüpü kapalı tutun. Taze seyreltmeyi **12 saat** içinde kullanın.

## Kütüphaneleri Denşirme

1. Aşağıdaki kütüphane hacimlerini ve taze seyreltilmiş 0,2 N NaOH'yi bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin.
  - 10 µl kütüphane
  - 10 µl 0,2 N NaOH
2. Kısa süreyle karıştırın ve ardından 1 dakika süreyle 280 x g düzeyinde santrifüjleyin.
3. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
4. 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7 ekleyin.



## Denşirilmiş Kütüphaneleri 20 pM'ye Seyreltme

1. Denşirilmiş kütüphane tüpüne 970 µl önceden soğutulmuş HT1 ekleyin.  
Sonuç olarak 20 pM denşirilmiş kütüphane elde edilir.
2. Kısa süreyle karıştırın ve ardından 1 dakika süreyle 280 x g düzeyinde santrifüjleyin.
3. Nihai seyreltmeye geçmeye hazır olana dek 20 pM kütüphaneleri buzun üzerine koyun.

## Kütüphaneleri Yükleme Konsantrasyonuna Seyreltme

1. Denşirilmiş 20 pM kütüphane solüsyonunu 1,2 pM değerine seyreltmek için aşağıdaki hacimleri ekleyin.
  - Denşirilmiş kütüphane solüsyonu (78 µl)
  - Önceden soğutulmuş HT1 (1222 µl)1,2 pM'de toplam hacim 1,3 ml'dir.
2. Karıştırmak için ters çevirin ve ardından darbeli santrifüjleyin.
3. Sekanslamaya geçin. Talimatlar için, bkz. *NextSeq 550Dx Cihazı Referans Kılavuzu (belge no 1000000009513)*.

## MiSeqDx Sekanslama Hazırlığı

MiSeqDx sekanslama sisteminde sekanslama için kütüphanelerin denşirilme ve seyreltilmesine yönelik aşağıdaki talimatları uygulayın.

### Sarf Malzemeleri

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1 N NaOH

### Hazırlık

Sekanslama için kütüphaneleri seyreltmek amacıyla taze bir 0,2 N NaOH seyreltisi hazırlayın. Küçük pipetleme hatalarının nihai NaOH konsantrasyonunu etkilemesini engellemek için ekstra hacim hazırlanır.



#### DİKKAT

Taze seyreltilmiş 0,2 N NaOH denşirme işlemi için önemlidir. Uygun olmayan denşirme verimi düşürebilir.

1. 1N NaOH 'yi 0,2 N NaOH'ye seyreltmek için aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin:
1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın.

Kalem	Depolama	Talimatlar
HT1	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözdürün. Denşirilmiş kütüphaneleri seyreltmeye hazır olana dek 2 °C ile 8 °C arasında depolayın.

2. Taze bir NaOH seyreltmesi hazırlamak için aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin:

- Laboratuvar sınıfı su (800 µl)
- 1N NaOH (200 µl)

Sonuç olarak 1 ml 0,2 N NaOH elde edilir.

**NOT** Tüpü kapalı tutun. Taze seyreltmeyi **12 saat** içinde kullanın.

## 4 nM Kütüphaneyi Denşirme

1. Aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin.
  - 4 nM kütüphane (5 µl)
  - 0,2 N NaOH (5 µl)
2. Kısa süreyle karıştırın ve ardından 1 dakika süreyle 280 x g düzeyinde santrifüjleyin.
3. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
4. Denşirilmiş kütüphane içeren tüpe 990 µl önceden soğutulmuş HT1 ekleyin.  
Sonuç olarak 1 ml 20 pM denşirilmiş kütüphane elde edilir.

## Denşirilmiş 20 pM Kütüphaneyi Seyreltme

1. Aşağıdaki hacimleri kullanarak istenen konsantrasyona seyreltin.

Konsantrasyon	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM kütüphane	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Önceden soğutulmuş HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Karıştırmak için ters çevirin ve ardından darbeleri santrifüjleyin.
3. Sekanslamaya geçin. Talimatlar için bkz. *MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (MOS v4 için MiSeqDx Cihazı Referans Kılavuzu)* (belge no 1000000157953).

## NovaSeq 6000Dx Sekanslama Hazırlığı

NovaSeq 6000Dx sekanslama sisteminde sekanslama için kütüphanelerin denşirilme ve seyreltilmesine yönelik aşağıdaki talimatları uygulayın.

### Sarf Malzemeleri

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

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

## Hazırlık

Sekanslama için kütüphaneleri seyreltmek amacıyla taze bir 0,2 N NaOH seyreltisi hazırlayın. Küçük pipetleme hatalarının nihai NaOH konsantrasyonunu etkilemesini engellemek için ekstra hacim hazırlanır.



### DİKKAT

Taze seyreltilmiş 0,2 N NaOH denşirme işlemi için önemlidir. Uygun olmayan denşirme verimi düşürebilir.

1. 1N NaOH 'yi 0,2 N NaOH'ye seyreltmek için aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin:

Tablo 4 S2 Modu

Reaktif	Bir Akış Hücresi için Hacim (µl)	İki Akış Hücresi için Hacim (µl)
Laboratuvar sınıfı su	40	80
Stok 1N NaOH	10	20

Bu hacimler bir akış hücresi için 50 µl 0,2 N NaOH veya iki akış hücresi için 100 µl 0,2 N NaOH ile sonuçlanır.

Tablo 5 S4 Modu

Reaktif	Bir Akış Hücresi için Hacim (µl)	İki Akış Hücresi için Hacim (µl)
Laboratuvar sınıfı su	80	160
Stok 1N NaOH	20	40

Bu hacimler bir akış hücresi için 100 µl 0,2 N NaOH veya iki akış hücresi için 200 µl 0,2 N NaOH ile sonuçlanır.

2. Karıştırmak için birkaç kez ters çevirin veya iyice vorteksleyin.

**NOT** Tüpü kapalı tutun. Taze seyreltmeyi **12 saat** içinde kullanın.

## Normalleştirilmiş Kütüphane Havuzu Oluşturma

Kütüphane hazırlığı, miktar tayini ve normalizasyon yöntemlerine bağlı olarak yükleme konsantrasyonu değişebilir.

Aşağıdaki talimatları kullanarak kütüphaneleri uygun konsantrasyona normalleştirin ve ardından havuzlayın. Aynı akış hücresinde sekanslanmış kütüphaneler tek bir normalleştirilmiş havuzda birleştirilmelidir.

**NOT** Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ile şerit başına çalıştırılabilecek maksimum numune sayısı 192'dir. Bu sınır, Set A ve B'deki toplam UD Dizinleri sayısından kaynaklanır.

## Havuzlama için Kütüphaneleri Normalleştirme

- İstenen nihai yükleme konsantrasyonuna bağlı olarak gereken kütüphane konsantrasyonunu belirleyin.
  - 350 pM nihai yükleme konsantrasyonu için gereken havuzlanmış kütüphane konsantrasyonu 1,75 nM'dir.
  - Farklı bir nihai yükleme konsantrasyonu için havuzlanmış kütüphane konsantrasyonunu belirlemek için bkz. [Kütüphaneleri Başlangıç Konsantrasyonuna Seyreltme, sayfa 46](#).
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 kullanarak kütüphaneleri istenen havuzlanmış kütüphane konsantrasyonuna normalleştirin.  
Kütüphaneleri uygun konsantrasyona seyreltme hakkında yardım için Illumina web sitesindeki [Havuzlama Hesaplayıcısına \(Pooling Calculator\)](#) bakın.

### Önerilen Yükleme Konsantrasyonları

İdeal DNA yükleme konsantrasyonu kütüphane türüne ve ek parça boyutuna bağlıdır. > 450 bp kütüphaneler için daha yüksek yükleme konsantrasyonları gerekli olabilir.

## Normalleştirilmiş Kütüphaneleri Havuzlama ve İsteğe Bağlı PhiX Denetimi Ekleme

- Aşağıdaki nihai hacimlerden birini elde etmek için yeni bir mikrosantrifüj tüpünde her normalleştirilmiş kütüphaneden uygun hacimleri birleştirin.

Mod	Nihai Hacim (µl)
S2	150
S4	310

- [İsteğe Bağlı]** Aşağıdaki gibi %1 denşirilmemiş PhiX> ekleyin.
  - 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 kullanarak 10 nM PhiX'i 2,5 nM'ye seyreltin.
  - Uygun hacimde denşirilmemiş 2,5 nM PhiX'i denşirilmemiş kütüphane havuzu tüpüne ekleyin.

Mod	Denşirilmemiş 2,5 nM PhiX (µl)	Denşirilmemiş Kütüphane Havuzu (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

PhiX eklerken, %1, iyi dengelenmiş kütüphaneler için önerilen miktardır. Düşük çeşitliliğe sahip kütüphaneler daha fazla gerektirebilir. Düşük çeşitliliğe sahip kütüphaneler ile PhiX denetimi kullanmak için Illumina Teknik Destek bölümü ile yönlendirme için iletişim kurun

## Kütüphane Havuzunu Denşirme ve İsteğe Bağlı PhiX Denetimi

- Denşirilmemiş kütüphane havuzu ve isteğe bağlı PhiX tüpüne aşağıdaki gibi 0,2 N NaOH ekleyin.

Akış Hücresi	0,2 N NaOH	Denşirilmemiş Kütüphane Havuzu (µl)	Elde Edilen Hacim
S2	37	150	187 µl, veya PhiX ile 187,9 µl
S4	77	310	387 µl, veya PhiX ile 388,9 µl

2. Kapatın ve ardından kısa süre vorteksleyin.
3. 280 x g'de 1 dakikaya kadar boyunca santrifüjleyin.
4. Denşirmek için, 8 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
5. Nötrleştirmek için aşağıdaki gibi 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 ekleyin.

Mod	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Elde Edilen Hacim
S2	38	225 µl, veya PhiX ile 225,9 µl
S4	78	465 µl, veya PhiX ile 466,9 µl

6. Kapatın ve ardından kısa süre vorteksleyin.
7. 280 x g'de 1 dakikaya kadar boyunca santrifüjleyin.
8. Denşirilmiş kütüphane veya denşirilmiş kütüphane ve PhiX'in tüm hacmini NovaSeq 6000DX kütüphane tüpüne aktarın.tüm
9. Sekanslamaya geçin. Talimatlar için, bkz. *NovaSeq 6000Dx Cihazı Ürün Belgeleri (belge no 200010105)*.

## Sorun Giderme

İş akışında sorun giderme için aşağıdaki tabloyu kullanın. Bir numune için sekanslama çalışması veya kütüphane hazırlaması iki kez başarısız olursa ilave sorun giderme gerekebilir. Illumina Teknik Destek bölümü ile iletişim kurun.

Gözlem	Olası Neden	Tavsiye Edilen Eylem
Sekanslama çalışması, çalışma Kalite Kontrol Spesifikasyonlarını geçmiyor	Test iş akışında kullanıcı veya laboratuvar hatası	<p>Uygun kütüphane verimi ve fragman boyutu dağılımını sağlamak için zenginleştirilmiş kütüphanelerin kalifikasyonunu yapın. Şüphelenilen kullanım veya ekipman hatasının meydana geldiği yere bağlı olarak aşağıdaki adımların birinden kütüphane hazırlığını tekrarlayın. Bilinmiyorsa veya başka hatalar meydana geldiyse çalıştırmanızda sorun giderme için Illumina Teknik Destek birimi ile iletişime geçin.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Kütüphaneleri yeniden sekanslayın. Bkz. <a href="#">NextSeq 550Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 47</a>, <a href="#">MiSeqDx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 49</a> veya <a href="#">NovaSeq 6000Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 50</a>.</li><li>• Kütüphaneleri yeniden zenginleştirin. Bkz. <a href="#">Probları Hibritleştirme, sayfa 35</a>.</li><li>• Kütüphane hazırlığını iş akışının en başından başlatın. Bkz. <a href="#">Kullanma Talimatları, sayfa 20</a>.</li></ul>
	Cihaz sorunu	Illumina Teknik Destek bölümü ile iletişim kurun.
FASTQ oluşturmada hata veya genel sekanslama sistemi hatası (ör. ağ hatası, reaktiflerin yüklenmesi/boşaltılmasında hata vb.)	Yazılım veya cihaz sorunu	<p>FASTQ oluşturma hakkında yardım için bkz. <a href="#">Local Run Manager Software Guide (Local Run Manager Yazılım Kılavuzu) (belge no 100000002702)</a> veya bkz. <a href="#">NextSeq 550Dx Cihazı Referans Kılavuzu (belge no 1000000009513)</a>, <a href="#">MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (document # 1000000157953) [MOS v4 için MiSeqDx Cihazı Referans Kılavuzu (belge no 2000104521000000157953)]</a> veya <a href="#">NovaSeq 6000Dx Cihazı Ürün Belgeleri (belge no 200010105)</a>.</p> <p>İlave yardım için Illumina Teknik Destek bölümü ile iletişime geçin.</p>

Gözlem	Olası Neden	Tavsiye Edilen Eylem
DNA kütüphanesi sekanslama yüklemesi için yeterli verim oluşturmuyor	Numune girdisi için gereklilikler karşılanmadı	Uygun numune girdisi sağlayın ve kütüphane hazırlamayı tekrarlayın. Bkz. <a href="#">Numune Girdisi Önerileri, sayfa 17.</a>
	Test iş akışında kullanım veya ekipman hatası	Şüphelenilen kullanım veya ekipman hatasının meydana geldiği yere bağlı olarak aşağıdaki adımların birinden kütüphane hazırlığını tekrarlayın. Bilinmiyorsa veya başka hatalar meydana geldiyse çalıştırmanızda sorun giderme için Illumina Teknik Destek birimi ile iletişime geçin. <ul style="list-style-type: none"> <li>Kütüphaneleri yeniden sekanslayın. Bkz. <a href="#">NextSeq 550Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 47</a>, <a href="#">MiSeqDx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 49</a> veya <a href="#">NovaSeq 6000Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 50.</a></li> <li>Kütüphaneleri yeniden zenginleştirin. Bkz. <a href="#">Probları Hibritleştirme, sayfa 35.</a></li> <li>Kütüphane hazırlığını iş akışının en başından başlatın. Bkz. <a href="#">Kullanma Talimatları, sayfa 20.</a></li> </ul>
	Zenginleştirme probu paneli için gereklilikler karşılanmadı	Uygun zenginleştirme probu paneli sağlayın ve kütüphane hazırlamayı tekrarlayın. Bkz. <a href="#">Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri, sayfa 9.</a>

## Performans Özellikleri

NovaSeq 6000Dx için DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application için performans özellikleri [NovaSeq 6000Dx Cihazı Kullanım Talimatı \(belge no 200025276\)](#) içinde verilmiştir.

## Tam Ekzom Panelleri ile Performans

Ekzom panel performansı, germ hattı varyant saptama için bilinen bir doğruluk dizisi (Coriell platin genomu) ile önerilen en düşük (50 ng) ve en yüksek (1000 ng) Coriell Cell Line gDNA NA12878 girdisi kullanılarak test edilmiştir. Ekzom paneli 1 (45 Mb) ve ekzom paneli 2 (36,8 Mb) temsili paneller olarak kullanılmıştır. Ekzom paneli 1 (45 Mb) kullanılarak iki 12-plex zenginleştirme reaksiyonunda Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla 24 teknik kopya test edilmiştir. Ekzom paneli 2 (36,8 Mb) kullanılarak tek bir 12-plex zenginleştirme reaksiyonunda Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla 12 teknik kopya test edilmiştir. Zenginleştirilmiş kütüphaneler NextSeq 550Dx sekanslama sisteminde DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager modülü ile sekanslanmıştır.

Aşağıdaki tablo, her panel ile test edilen teknik kopyalar için ikincil sekanslama ve varyant arama performans metriklerinin ortalama değerlerini gösterir.

Tablo 6 İki Tam Ekzom Paneli ile Test Performansı

Panel	Takviye Edilmiş Benzersiz Okuma Zenginleştirme	Kapsamın Tekdüzeliliği	Fragman Uzunluğu Medyanı	SNV Yeniden Arama <sup>1</sup>	SNV Kesinliği <sup>2</sup>	İnsersiyon/ Delesyon Yeniden Arama <sup>1</sup>	İnsersiyon/ Delesyon Kesinliği <sup>2</sup>
Ekzom paneli 1 (45 Mb)	%80	%96	186 bp	%96	%99	%90	%89
Ekzom paneli 2 (36,8 Mb)	%93	%98	188 bp	%96	%99	%92	%93

<sup>1</sup>Yeniden Arama=Pozitifler/(gerçek pozitifler + yalancı negatifler)

<sup>2</sup>Kesinlik=Gerçek pozitifler/(gerçek pozitifler + yalancı pozitifler)

## Saptama Sınırı

Horizon HD799 DNA referans standardı saptama sınırını test etmek için kullanılmıştır. HD799, %1–%24,5 aralığında alelik frekanslarda bilinen SNV'lere sahip orta derece risk altında formalinle işlenmiş DNA içerir. Önerilen en düşük DNA girdisi (50 ng) kullanıldı ve  $\geq$  %5,0 varyant alel frekansına (VAF) sahip SNV'lerin saptama oranı değerlendirildi. 16 teknik kopya FFPE iş akışı kullanılarak Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla test edilmiş, 16 (1-plex) zenginleştirmelerde pan-kanser zenginleştirme paneli (1,94 Mb) ile zenginleştirilmiş ve ardından NextSeq 550Dx Cihazında DNA GenerateFASTQ Dx modülü ile sekanslanmıştır. Tüm numuneler aşağıdaki tabloda gösterildiği üzere panele özgü numune performans gerekliliklerini geçmiştir.

Tablo 7 Saptama Sınırı için Numune Performansı

Panel	$\geq$ %5,0 VAF Olan SNV'lerin Varyant Saptama Oranı	Ortalama Kapsamın Tekdüzeliliği
Pan-kanser zenginleştirme paneli (1,94 Mb, 523 gen)	%100	%99

## Enterferan Maddeler

Potansiyel olarak enterferans gösteren maddelerin etkisi, enterferans gösteren maddelerin varlığında testin performansı değerlendirilerek Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ile değerlendirilmiştir.



## Tam Kanda Enterferans

Asetaminofen (eksojen bileşik, ilaç), kreatinin ve trigliseritler (endojen metabolitler) DNA ekstraksiyonundan önce insan tam kan numunelerine eklenerek test edilmiştir. Kan alımdan (kısır alma) kaynaklanan enterferansı değerlendirmek için, tam kan numunelerine aynı zamanda EDTA eklenmiştir. Ek olarak, numune hazırlamadan kaynaklanan enterferansı değerlendirmek için, tam kandan ekstrakte edilen DNA'ya moleküler sınıf etanol eklenmiştir.

Aşağıdaki tabloda, enterferans gösteren madde başına test konsantrasyonları gösterilmektedir.

Tablo 8 Potansiyel Olarak Enterferans Gösteren Maddeler ve Tam Kanda Test Edilen Konsantrasyonlar

Test Maddesi	Test Konsantrasyonu
Asetaminofen	15,6 mg/dl* Bir ilaç terapötik dozundan sonra beklenen en yüksek konsantrasyonun üç katı.
Kreatinin	15 mg/dl* Popülasyonda gözlemlenen en yüksek konsantrasyon.
Trigliseritler	1,5 g/dl* Popülasyonda gözlemlenen en yüksek konsantrasyon.
EDTA	6 mg/ml Kanda beklenen konsantrasyonun üç katı, EDTA tüplerinde toplanır.
Moleküler sınıf etanol	%15 h/h DNA ekstraksiyonu sonrası eluatta.

\*CLSI EP37-ED1:2018 uyarınca

Enterferans gösteren madde başına, 12 teknik kopya Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla test edilmiş, tek (12-plex) zenginleştirmede ekzom panel 1 (45 Mb) ile zenginleştirilmiş ve ardından NextSeq 550Dx Instrument üzerinde DNA GenerateFASTQ Dx modülü ile sekanslanmıştır.

Test edilen maddeler için, 12 numunenin tümü numune performans gerekliliklerini karşılamış ve testin performansında herhangi bir enterferans gözlemlenmemiştir.

## FFPE Dokusunda Enterferans

İki kolorektal FFPE numunesi, yüksek hemoglobin seviyeli kan ile %50 FFPE doku numunesi kontaminasyonuna ilişkin en kötü durum senaryosunu temsil etmesi için 10 µm FFPE kesiti başına 0,1 mg'da hemoglobin varlığında ve yokluğunda test edilmiştir. Numuneler Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla single-plex zenginleştirmelerde temsili bir panel olarak pan-kanser zenginleştirme paneli 1 (1,94 Mb) kullanılarak test edilmiştir. Zenginleştirilmiş kütüphaneler daha sonra bir NextSeq 550Dx cihazında DNA GenerateFASTQ Dx modülü ile sekanslanmıştır. Tüm numuneler numune performans gerekliliklerini karşılamış ve hemoglobinin, testin performansı ile enterferans oluşturmadığı ortaya konmuştur.

Numune hazırlamadan kaynaklanan enterferansı değerlendirmek için, bir mesane kanseri FFPE doku numunesinden ekstrakte edilen DNA'ya iki eksojen bileşik eklenmiştir. Test edilen eksojen maddeler, DNA ekstraksiyon işlemi sırasında yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon solüsyonlarıdır ve aşağıdaki tabloda test edilen miktarlarla birlikte listelenmiştir.

Test maddesi solüsyonları, sütun bazlı DNA izolasyon kitlerinde piyasaya sunulmuştur.

Tablo 9 Potansiyel Olarak Enterferans Gösteren Eksojen Maddeler ve FFPE'de Test Edilen Konsantrasyonlar

Test Maddesi	Test Konsantrasyonu (µl / 30 µl Eluat)
Deparafinizasyon Solüsyonu	113 x 10 <sup>-6</sup>
Yıkama Tamponu AW2	0,417

Enterferans gösteren madde başına, sekiz teknik kopya Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla test edilmiş, single-plex zenginleştirmelerde pan-kanser zenginleştirme paneli (1,94 Mb) ile zenginleştirilmiş ve ardından NextSeq 550Dx Cihazında DNA GenerateFASTQ Dx modülü ile sekanslanmıştır.

Test edilen her iki madde için, sekiz numunenin tümü numune performans gerekliliklerini karşılamış ve testin performansında herhangi bir enterferans gözlemlenmemiştir.

## Çapraz Kontaminasyon

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (kadın, 10 numune), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (erkek, 12 numune) ve şablonsuz kontroller (NTC, 2 numune) Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla dama tahtası plaka düzeninde test edilmiştir. Tüm numuneler, numune çapraz kontaminasyonunu değerlendirmek için en katı koşul olarak önerilen en yüksek (1000 ng) gDNA girdisini kullanmıştır. Test iki ayrı operatör tarafından iki kez gerçekleştirilmiştir. 12-plex zenginleştirme reaksiyonlarında ekzom paneli 1 (45 Mb) kullanılmıştır. Zenginleştirilmiş kütüphaneler NextSeq 550Dx cihazında DNA GenerateFASTQ Dx ile sekanslanmıştır. Değerlendirme, kadın numunelerindeki erkek spesifik Y-kromozomunun kapsamının, dolu bir kadın numuneleri plakasının arka plan seviyelerinin yanı sıra NTC numunelerinin dizin temsili ile karşılaştırılarak değerlendirilmesiyle yapılmıştır.

Tablo 10 Çapraz Kontaminasyon Sonuçları

< 3x Baseline Gürültüde Erkek Y Kromozomu Kapsamı ile Kadın Numuneleri	NTC'de Dizin Temsili
%100	< %0,0005

## Ek: Illumina UD Dizinleri Adaptör Sekansları

Bu benzersiz çift (UD) dizin adaptörleri, önerilen eşleme stratejisini uygulamak için plakada düzenlenmiştir. Dizin adaptörleri, tipik sekiz baz yerine 10 baz uzunluğundadır.

## Dizin 1 (i7) Adaptörleri

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

## Dizin 2 (i5) Adaptörleri

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Aşağıdaki sekans Okuma 1 ve Okuma 2 adaptör kesme için kullanılır.

CTGTCTCTTATACACATCT

## Plaka A/Küme 1 Dizin Adaptörleri

Dizin Adı	Adaptördeki i7 Bazları	Adaptördeki i5 Bazları
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG

Dizin Adı	Adaptördeki i7 Bazları	Adaptördeki i5 Bazları
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTACAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAAC TGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT

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

Dizin Adı	Adaptördeki i7 Bazları	Adaptördeki i5 Bazları
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

## Plaka B/Küme 2 Dizin Adaptörleri

Dizin Adı	Adaptördeki i7 Bazları	Adaptördeki i5 Bazları
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA

Dizin Adı	Adaptördeki i7 Bazları	Adaptördeki i5 Bazları
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCATT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT

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



Dizin Adı	Adaptördeki i7 Bazları	Adaptördeki i5 Bazları
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGATT	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	GAGTTGTA

## Revizyon Geçmişi

Belge	Tarih	Değişiklik Açıklaması
Belge No 200019584 v02	Eylül 2022	NovaSeq 6000Dx Cihazında sekanslamayı desteklemek için içerik eklendi.
Belge No 200019584 v01	Mayıs 2022	Sekanslama sistemi adları ve katalog numaraları eklendi. Tek dizinli kütüphaneler için benzersiz çift dizinleme bilgileri kaldırıldı.
Belge No 200019584 v00	Mayıs 2022	İlk sürüm.

## Patentler ve Ticari Markalar

Bu belge ve içindekiler Illumina, Inc. ve bağlı şirketlerinin ("Illumina") mülkiyetinde olup yalnızca işbu belgede açıklanan ürünün/ürünlerin kullanımıyla bağlantılı olarak müşterisinin sözleşmeye ilişkin kullanımı içindir. Bu belge ve içindekiler Illumina'nın önceden yazılı izni olmaksızın başka hiçbir amaçla kullanılamaz veya dağıtılamaz ve/veya hiçbir şekilde iletilemez, ifşa edilemez ya da kopyalanamaz. Illumina bu belge ile patenti, ticari markası, telif hakkı veya genel hukuk hakları ya da üçüncü tarafların benzer hakları kapsamında hiçbir lisansı devretmez.

Bu belgede açıklanan ürünün/ürünlerin uygun ve güvenli bir şekilde kullanılması için nitelikli ve uygun eğitim almış çalışanlar bu belgedeki talimatları tam olarak ve açık bir şekilde uygulamalıdır. Söz konusu ürün/ürünler kullanılmadan önce bu belgedeki tüm bilgiler tam olarak okunmalı ve anlaşılmalıdır.

BU BELGEDE YER ALAN TÜM TALİMATLARIN TAMAMEN OKUNMAMASI VE AÇIK BİR ŞEKİLDE UYGULANMAMASI, ÜRÜNÜN/ÜRÜNLERİN HASAR GÖRMESİNE, KULLANICI VEYA BAŞKALARI DAHİL OLMAK ÜZERE KİŞİLERİN YARALANMASINA VE DİĞER MALLARIN ZARAR GÖRMESİNE NEDEN OLABİLİR VE ÜRÜN/ÜRÜNLER İÇİN GEÇERLİ OLAN HER TÜRLÜ GARANTİYİ GEÇERSİZ KILACAKTIR.

ILLUMINA BU BELGEDE AÇIKLANAN ÜRÜNÜN/ÜRÜNLERİN (ÜRÜNÜN PARÇALARI VE YAZILIMI DAHİL) YANLIŞ KULLANIMINDAN DOĞAN DURUMLARDAN SORUMLU TUTULAMAZ.

© 2022 Illumina, Inc. Tüm hakları saklıdır.

Tüm ticari markalar Illumina, Inc. veya ilgili sahiplerinin malıdır. Özel ticari marka bilgileri için bkz. [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## İletişim Bilgileri



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 ABD

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (Kuzey Amerika dışından)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



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

### Avustralya Sponsoru

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

## Ürün Etiketi

Ürün ambalajı ve etiketinde görülen sembollere dair eksiksiz referans için, [support.illumina.com](https://support.illumina.com) adresinden kitinize yönelik *Documentation* (Belgeler) sekmesindeki sembol anahtarına bakın.