

ЗА IN VITRO ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА. САМО ЗА ИЗНОС.

Предназначение

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit е набор от реагенти и консумативи, използван за подготовка на библиотеки с проби от геномна ДНК, получена от човешки клетки и тъкан за разработване на *in vitro* диагностични оценки. Изискват се предоставяни от потребителя панели за сонди за подготовката на библиотеки, таргетиращи конкретни представляващи интерес геномни региони. Генерираните библиотеки с проби са предназначени за използване в системите за секвениране на Illumina. Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx включва софтуер за настройка на изпълняването на секвениране, мониторинга и анализ.

Принципи на процедурата

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е предназначен за ръчна подготовка на библиотеки за секвениране на ДНК, обогатени за целеви участъци от геномна ДНК, получена от човешки клетки и тъкан.

Предоставените от потребителя биотинилирани олигонуклеотидни панели са необходими за целево обогатяване. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим с панели с различни размери, включително от малки панели (< 20 000 сонди) до големи панели (> 200 000 сонди). Генерираните обогатени библиотеки са предназначени за използване в системите за секвениране на Illumina.

Процедурата Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit се състои от следните стъпки:

- **Тагментирана геномна ДНК** — Използва Enrichment BLT Small (eBLTS) за маркиране на ДНК въвеждането. По време на тагментацията гДНК е фрагментирана и маркирана с адаптери в една стъпка. За насищане на eBLTS реакцията на тагментация е необходим минимално въвеждане на ДНК от 50 ng. Когато са наситени, eBLTS фрагментите имат определен брой ДНК молекули, за да генерират нормализирани библиотеки с последователно разпределение на размера на фрагментите.
- **Почистване след тагментация** — Почиства маркираната с адаптер ДНК на eBLTS, за да се използва при усилване.
- **Усилване тагментираната ДНК** — Усилва тагментираната ДНК с помощта на PCR програма с ограничен цикъл. В краищата на ДНК фрагментите се добавят уникални двойни (UD) индекси, които позволяват двойно уникално баркодиране на ДНК библиотеките и генерирането на клъстери по време на секвениране.
- **Почистване на библиотеки** — Използва процедура за пречистване на топчета, за да пречиства и оразмерява избора на усилени библиотеки с ДНК.
- **Обединяване на библиотеки** — Тази стъпка комбинира ДНК библиотеки с уникални индекси в едно обединение от най-много 12 библиотеки. Можете да обединявате библиотеки по обем или маса.

- **Хибридизиране на сонди** — Състои се от реакция на хибридизация, по време на която библиотеките с двойноверижна ДНК се денатурират и панел от биотинилирани ДНК сонди се хибридизира към целеви геномни участъци.
 - Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим с множество панели. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не включва панел за обогатяване. Панелите на сондата се доставят от потребителя и трябва да отговарят на необходимите спецификации. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit реагентите са съвместими както с Illumina , така и с обогатяващите ДНК олигонуклеотидни панели на трети страни, които отговарят на необходимите спецификации. За информация относно необходимите спецификации за панели на трети страни вижте [Изисквания към панела на сондата за обогатяване на стр. 11](#)
- **Улавяне на хибридизирани сонди** — Използва се Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) за улавяне на биотинилираните сонди, хибридизирани към целевите участъци на интерес.
- **Усилване на обогатени библиотеки** — Използва PCR за усилване на обогатените библиотеки.
- **Почистване на усилени обогатени библиотеки** — Използва процедура за пречистване на топчета, за да пречиства обогатените библиотеки, готови за секвениране.
- **Секвениране** — Секвенирането на обогатените библиотеки се извършва на системите за секвениране MiSeqDx, NextSeq 550Dx или NovaSeq 6000Dx. За MiSeqDx и NextSeq 550Dx интегрираният DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager модул се използва за секвениране на настройката на изпълняването, мониторинга на изпълняването и генерирането на FASTQ от базови обозначения. За NextSeq 550Dx с DRAGEN Server и NovaSeq 6000Dx приложението DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx се използва за настройка на изпълняване и вторичен анализ с няколко налични работни процеса.

Ограничения на процедурата

- За *in vitro* диагностична употреба.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим с геномна ДНК, получена от човешки клетки и тъкан.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим с двойноверижни gDNA входове от 50 – 1000 ng. Ефективността не е гарантирана с входящи данни извън тези прагове.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не включва реагенти за екстракция на ДНК. Резултатите от аналитичните тестове, включително тестването за интерференция, предоставени в [Функционални характеристики на стр. 63](#), са получени с цяла кръв и FFPE като представителни типове проби с представителни комплекти за екстракция на ДНК. Всички диагностични тестове, разработени за употреба с Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit реагенти, изискват пълна проверка за всички аспекти на работата с избрания комплект за екстракция на ДНК.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не се препоръчва за проби от FFPE с лошо качество с $\Delta Cq > 5$. Използването на проби с $\Delta Cq > 5$ може да увеличи шансовете за неуспех в подготовката на библиотеката и да намали производителността на анализа.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit реагентите са конфигурирани и тествани за въвеждане на проба, реакции на обогатяване и сложност, посочени в следващата таблица.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Въвеждане на проба	Реакции на обогатяване	Сложност на обогатяване
Комплект с 16 проби	Ниско качество (FFPE)	16 реакции	1-плекс
Комплект с 96 проби	Високо качество (напр. цяла кръв)	8 реакции	12-плекс

- FFPE входната обработка е тествана и се препоръчва изключително за 1-плексни реакции на обогатяване с използване на комплекта с 16 проби.
- За комплекта с 96 проби са възможни нестандартни сложности (2-плекс до 11-плекс), но имат следните ограничения:
 - Обработката на проби в 2-плексни до 11-плексни реакции на обогатяване намалява производителността на комплекта.
 - Оптималните резултати не са гарантирани. Получаването на подходящ добив на обогатяване за нестандартни сложности може да изисква допълнителна оптимизация.
 - За стратегии за обединяване с ниска сложност (2-плекс до 8-плекс), изборът на индексни адаптери с различни последователности е необходим за оптимизиране на баланса на цветовете за успешно секвениране и анализ на данни. DNA GenerateFASTQ Dx модулът на MiSeqDx и NextSeq 550Dx предоставя опции за комбинации с балансиран цвят на индекса по време на настройка на изпълняването. За повече информация относно стратегиите за обединяване вижте [Методи за обединяване на стр. 36](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit се ограничава до предоставяне на обогатени библиотеки, които са секвенирани само на MiSeqDx, NextSeq 550Dx и NovaSeq 6000Dx. Използването на други системи за секвениране изисква пълно валидиране за всички аспекти на производителността.
- Панелите за обогатяване не са включени като част от този продукт. Резултатите от аналитичните тестове, предоставени в [Функционални характеристики на стр. 63](#), са получени с представителни панели за обогатяване и са предоставени само за информационни цели. Аналитичните характеристики на производителността служат за пример за общите възможности на анализа и не установяват възможностите или пригодността по отношение на конкретни твърдения за анализ. Всички диагностични тестове, разработени за използване на тези реагенти, изискват пълно валидиране на всички аспекти на работата.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим както с Illumina , така и с панели за обогатяване на трети страни. Въпреки това, производителността с панели за обогатяване на трети страни, които не отговарят на изискванията на панела, не е гарантирана. За информация относно изискванията за панела вижте [Изисквания към панела на сондата за обогатяване на стр. 11](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit използва 2 часа време за хибридизация. Използването на по-дълго време за хибридизация може да повлияе на показателите за ефективност.
- Модулите DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager за MiSeqDx и NextSeq 550Dx предоставят само FASTQ файлове. Ако използвате тези модули, от Вас се изисква да извършите валидиране на вторичния анализ.
- Приложението DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx е налично на NextSeq 550Dx с DRAGEN Server и NovaSeq 6000Dx. Приложението поддържа множество работни потоци за вторичен анализ, включително генериране на FASTQ, генериране на FASTQ и VCF за откриване на варианти на герминативни линии и генериране на FASTQ и VCF за откриване на соматични варианти. Ако използвате приложението за генериране на VCF, не е необходимо да извършвате валидиране на вторичен анализ. Ограниченията на приложението включват следното:
 - Инсерции на дължина > 18 bp и делеции на дължина > 21 bp не са валидирани.
 - Големи варианти, включително многонуклеотидни варианти (MNV) и големи индели, могат да бъдат докладвани като отделни по-малки варианти в изходния VCF файл.
 - Малките MNV се отчитат като отделни варианти в изходния VCF файл.
 - Делециите се отчитат във VCF файла в координатата на предходната база за VCF формат. Следователно помислете за прилежащи варианти, преди да отчетете, че отделно обозначаване на бази е хомозиготна референция.
 - Специфични ограничения за герминативна линия:
 - Работният процес за анализ на поколението на Germline FASTQ и VCF на DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx приложението е предназначен да предоставя качествени резултати за обозначаване на варианти на герминативни линии (напр. хомозиготни, хетерозиготни, див тип).
 - Варирането на броя копия може да повлияе на това дали вариантът е идентифициран като хомозиготен или хетерозиготен.
 - Системата няма да отчете повече от два варианта при един локус, дори при наличие на вариация на броя на копията.
 - Специфични ограничения за соматичен вариант:
 - Работният поток за анализ на генерирането на соматичен FASTQ и VCF на DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx приложението е предназначен да предоставя качествени резултати за обозначаване на соматичен вариант (т.е. наличие на соматичен вариант).

- Работният поток за анализ на поколението соматичен FASTQ и VCF не може да разграничи герминативните и соматичните варианти. Работният поток е предназначен да открива варианти в диапазон от вариантни честоти, но вариантната честота не може да се използва за разграничаване на соматичните варианти от вариантите на герминативна линия.
- Нормалната тъкан в материала за изследване влияе върху откриването на варианти. Отчетената граница за откриване се основава на вариантната честота спрямо общата ДНК, извлечена както от тумор, така и от нормална тъкан.
- Ако в един и същ локус се обозначава повече от един вариант на алел, никой от алелите няма да бъде отчетен като преминаващ вариант. Вместо това, пълният набор от алели ще бъде отчетен, но филтриран чрез многоалелния етикет.

Компоненти на продукта

Тестът Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit се състои от следните компоненти:

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, каталожен № 20051354 (16 проби) или № 20051352 (96 проби)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, каталожен № 20051355 (16 проби) или № 20051353 (96 проби)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Модул за NextSeq 550Dx , каталожен № 20063024
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Модул за MiSeqDx, каталожен № 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Приложение за NovaSeq 6000Dx, каталожен № 20074609
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Приложение за NovaSeq 550Dx, каталожен № 20074730

Предоставени реагенти

Попълването на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx изисква Illumina DNA Prep with Enrichment Dx с UD индекси Комплект А или Illumina DNA Prep with Enrichment Dx с UD индекси Комплект В. Можете да извършите следния брой реакции за подготовка и обогатяване на библиотеката с помощта на комплект с 16 проби или с 96 проби.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Въвеждане на проба	Реакции на обогатяване	Сложност на обогатяване
Комплект с 16 проби	Ниско качество (FFPE)	16 реакции	1-плекс
Комплект с 96 проби	Високо качество (напр. цяла кръв)	8 реакции	12-плекс

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

Illumina Подготвяне на Dx реактиви за тагментация 1, да се съхраняват при 15°C до 30°C

Следните реагенти се изпращат на стайна температура. Съхранявайте своевременно реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране.

Име на реактив	Количество епруветки		Цвят на капачката	Номинален обем	Активни съставки
	16 проби (№ 20050020)	96 проби (№ 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Червено	350 µl	Детергентен разтвор във вода.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Зелено	41 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ детергент и сол.
Cleanup Beads (CB)	1	Не е приложимо*	Червено	10 ml	Твърдофазни парамагнитни топчета в буфериран воден разтвор.

* Cleanup Beads за 96 проби са включени в Illumina Подготовка на почистващи топчета Dx 96 проби (№ 20050030).

Illumina Подготовка на Dx почистващи топчета (96 проби), да се съхранява при 15°C до 30°C

За комплектите с 96 проби Cleanup Beads са включени в Prep Dx Cleanup Beads на Illumina (каталожен № 20050030). Следните реагенти се изпращат на стайна температура. Съхранявайте своевременно реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране. За комплект с 16 проби Cleanup Beads са включени в Prep Dx Tagmentation Reagents 1 на Illumina (каталожен № 20050020).

Име на реактив	Количество	Цвят на капачката	Номинален обем	Активни съставки
Cleanup Beads (CB)	4	Червено	10 ml	Твърдофазни парамагнитни топчета в буфериран воден разтвор.

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, да се съхраняват при 2°C до 8°C

Следните реагенти се изпращат охладени. Съхранявайте своевременно реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране. Съхранявайте епруветката за съхранение на eBLTS в изправено положение, така че топчетата винаги да са потопени в буфера.

Име на реактив	Количество епруветки		Цвят на капачката	Номинален обем		Активни съставки
	16 проби (№ 20050021)	96 проби (№ 20050026)		16 проби	96 проби	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Жълто	200 µl	290 µl	Магнитни топчета Streptavidin, свързани с транспозоми в буфериран воден разтвор, съдържащ глицерол, EDTA, дитиотрейтол, сол и детергент.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Прозрачна	1,8 ml	1,8 ml	Буфериран воден разтвор.

Illumina Подготовка на Dx реактиви за тагментация 3, да се съхраняват при -25°C до -15°C

Следните кутии с реагенти се изпращат замразени. Съхранявайте своевременно реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране.

Име на реактив	Количество епруветки		Цвят на капачката	Номинален обем		Активни съставки
	16 проби (№ 20050022)	96 проби (№ 20050027)		16 проби	96 проби	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Прозрачна	290 µl	290 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли и диметилформамид.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Прозрачна	200 µl	610 µl	ДНК полимераза и dNTP в буфериран воден разтвор.

Illumina Подготовка на реагенти за обогатяване на ДНК Dx 1 (16 проби), да се съхранява при 2°C до 8°C

За комплекти с 16 проби следните реагенти са включени в подготовка на реагенти за обогатяване на ДНК 1 Dx на Illumina (каталожен № 20050023). За комплекти с 96 проби следните реагенти са включени в реагенти за обогатяване Illumina DNA Prep Dx (каталожен № 20050028).

Следните реагенти се изпращат охладени. Съхранявайте своевременно реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране.

Име на реактив	Количество епруветки	Цвят на капачката	Номинален обем	Активни съставки
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Прозрачна	1,2 ml	Магнитни топчета Streptavidin в буфериран воден разтвор, съдържащ формамид, детергент и сол.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Прозрачна	1,8 ml	Буфериран воден разтвор.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Прозрачна	200 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ детергент и сол.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Прозрачна	200 µl	Буфериран воден разтвор.

Illumina Подготовка на реагенти за обогатяване на Dx 1 (96 проби), да се съхранява при 2°C до 8°C

За комплекти с 96 проби следните реагенти са включени в реагенти за обогатяване Illumina 1 Prep Dx (каталожен № 20050028). За комплекти с 16 проби следните реагенти са включени в реагенти за обогатяване 1 Illumina DNA Prep Dx (каталожен № 20050023).

Следните реагенти се изпращат охладени. Съхранявайте своевременно реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране.

Име на реактив	Количество епруветки	Цвят на капачката	Номинален обем	Активни съставки
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Прозрачна	1,2 ml	Магнитни топчета Streptavidin в буфериран воден разтвор, съдържащ формамид, детергент и сол.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Прозрачна	1,8 ml	Буфериран воден разтвор.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Прозрачна	200 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ детергент и сол.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Прозрачна	200 µl	Буфериран воден разтвор.

Illumina Подготовка на реагенти за обогатяване ДНК Dx 2, да се съхранява при -25°C до -15°C

Следните кутии с реагенти се изпращат замразени. Съхранявайте своевременно реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране.

Име на реактив	Количество епруветки		Цвят на капачката	Номинален обем	Активни съставки
	16 проби (№ 20050024)	96 проби (№ 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Прозрачна	580 µl	Детергентен разтвор във вода.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Кехлибарен	4,1 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ детергент и соли.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Прозрачна	320 µl	PCR праймери (олигонуклеотиди) микс.
2N NaOH (HP3)	1	1	Прозрачна	200 µl	2N разтвор на натриев хидроксид (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Синьо	480 µl	Буфериран воден разтвор с Cot-1 ДНК, препълващ агент и формамид

Име на реактив	Количество епруветки		Цвят на капачката	Номинален обем	Активни съставки
	16 проби (№ 20050024)	96 проби (№ 20050029)			
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Прозрачна	200 µl	ДНК полимераза и dNTP в буфериран воден разтвор.

Уникален комплект Dx с двоен индекс A/B на Illumina, да се съхранява при температура от -25°C до -15°C

Следните кутии с реагенти се изпращат замразени. Съхранявайте своевременно реагентите при означената температура, за да гарантирате правилното им функциониране. За секвенции на индексните адаптери вижте [Приложение: UD индекси на Illumina за адаптерни секвенции на стр. 68](#).

Компонент	Количество
Illumina Уникален двоен индекс Dx комплект A (96 индекса), № 20050038	1
Illumina Уникален двоен индекс Dx комплект B (96 индекса), № 20050039	1

Реагенти, които не са предоставени

Необходими реагенти, които не са предоставени

- Реагенти за извличане и пречистване на ДНК
- Реагенти за количествено определяне на ДНК
- Етанол (200 proof, за молекулярна биология)
- Вода без нуклеаза
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 1N разтвор на NaOH, степен по молекулярна биология
- Ако използвате система за секвениране NextSeq 550Dx:
 - 200 mM Tris, pH 7,0 (може да се разреди от 1 M Tris-HCL, pH 7,0)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 цикъла), (каталожен № 20028871)
- Ако използвате системата за секвениране MiSeqDx:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (каталожен № 20037124)
- Ако използвате система за секвениране NextSeq 6000Dx:
 - 400 mM Tris, pH 8,0 (може да се разреди от 1 M Tris-HCL, pH 8,0)

- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 цикъла) (каталожен № 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 цикъла) (каталожен № 20046933)
- Буферна касета NovaSeq 6000Dx S2 (каталожен № 20062292)
- Буферна касета NovaSeq 6000Dx S4 (каталожен № 20062293)
- Библиотечна епруветка NovaSeq 6000Dx (каталожен № 20062290)
- Библиотечна епруветка NovaSeq 6000Dx, 24 в пакет (каталожен № 20062291)

Изисквания към панела на сондата за обогатяване

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Реагентите са съвместими както с Illumina, така и с олигонуклеотидните панели на трети страни, обогатяващи ДНК. Ако използвате биотинилирани ДНК сонди на трети страни (фиксиращи или персонализирани панели), уверете се, че отговарят на необходимите спецификации.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е оптимизиран и валидиран, като се използват следните спецификации на панела на трети страни. Сравнимите характеристики не са гарантирани, когато се използват панели на трети страни, които не отговарят на спецификациите.

- Дължина на сондата 80 bp или 120 bp
- Между 500 и 675 000 сонди
- Едноверижна или двойноверижна ДНК
- Общо въвеждане на сондата от ≥ 3 pmols за обогатяване при сложности от 1-плекс до 12-плекс

Съхранение и обработка

- Стайната температура се определя като температура между 15°C и 30°C.
- Реагентите са стабилни, когато се съхраняват, както е посочено, до посочения срок на годност върху етикетите на комплектите. За температурите на съхранение вижте [Предоставени реагенти на стр. 5](#).
- Замразените реагенти запазват стабилността си за максимално четири цикъла на замразяване/размразяване, които се случват преди указания срок на годност.
- Процедурата Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit има следните безопасни точки за спиране:
 - След [Усилване на тагментирана ДНК на стр. 30](#), усилените библиотеки са стабилни до 30 дни, когато се съхраняват на -25°C до -15°C.
 - След [Почистване на библиотеки на стр. 32](#), почистените усиленни библиотеки са стабилни до 30 дни, когато се съхраняват при -25°C до -15°C.
 - След [Обединяване на предварително обогатени библиотеки на стр. 35](#), обединените библиотеки са стабилни до 30 дни, когато се съхраняват при -25°C до -15°C.

- След [Усилване на обогатена библиотека на стр. 47](#), обогатената, усилена библиотечна плака може да остане на термоциклера до 24 часа. Алтернативно, плаката може да се съхранява при 2°C до 8°C за до 48 часа.
- Окончателно почистените обогатени библиотеки са стабилни до 7 дни, когато се съхраняват при -25°C до -15°C.
- Ако някоя от опаковките или съдържанието на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit са повредени или компрометирани, се свържете с отдела за обслужване на клиенти на Illumina.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) може да образува видими преципитати или кристали. Ако се наблюдава утайка, загрейте при 37°C за 10 минути и след това завихрете, докато утайката се разтвори.
- Олигонуклеотиди за хибридизация (HYB) и Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) трябва да бъдат предварително загреяти до същата температура като температурата на задържане за хибридизацията, приложима за типа проба и панела на сондата. За повече информация относно боравенето с NHB2 и EEW, вижте [Процедурни бележки на стр. 17](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (ENH2) и HYB Buffer+IDT NXT блокери (NHB2) могат да развият кристали и мътност. Ако се наблюдават кристали и помътняване, повторете завихрянето или пипетирайте нагоре и надолу, за да смесите, докато разтворът се изчисти. Уверете се, че предварително сте загрели NHB2 преди пипетиране.
- Когато работите с Cleanup Beads (CB), използвайте следните най-добри практики:
 - Никога не замразявайте топчетата.
 - Непосредствено преди употреба разбъркайте топчетата, докато отново се суспендират добре и цветът стане хомогенен.
- Когато работите с Enrichment BLT Small (eBLTS), използвайте следните най-добри практики:
 - Съхранявайте епруветката за съхранение на eBLTS в изправено положение, така че топчетата винаги да са потопени в буфера.
 - Вортексирайте щателно eBLTS, докато топчетата се ресуспендират. За да избегнете повторното утаяване на топчетата, не се препоръчва центрофугиране преди пипетиране.
 - Ако топчетата са залепени от страни или отгоре на плака с 96 ямки, центрофугирайте при 280 × g за 3 секунди и след това пипетирайте, за да ресуспендирате.
- Когато работите с плаки с индексни адаптери, използвайте следните най-добри практики:
 - Не добавяйте проби към плаката за индексен адаптер.
 - Всяка ямка на индексната плака е само за еднократна употреба.

Необходимо оборудване и материали, които не са предоставени

В допълнение към Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, уверете се, че имате необходимото оборудване и материали, преди да започнете протокола.

Оборудване

Уверете се, че разполагате с необходимото оборудване, преди да стартирате протокол.

Протоколът е оптимизиран и валидиран с помощта на елементи с изброените спецификации.

Сравнимите характеристики не са гарантирани при използване на оборудване извън спецификациите.

Някои елементи са необходими само за конкретни работни процеси. Тези елементи са посочени в отделни таблици.

- Термоциклер със следните спецификации:
 - Затоплящ се капак
 - Минимален температурен контролен диапазон от 10°C до 98°C
 - Минимална температурна точност от $\pm 0,25^\circ\text{C}$
 - Максимален обем на реакцията 100 μl
 - Съвместимост с напълно закрити 96-ямкови PCR плаки
- Инкубатор за микропроби със следните спецификации:
 - Температурен диапазон на околна среда от $+5,0^\circ\text{C}$ до $99,0^\circ\text{C}$
 - Съвместим с 96-ямкови MIDI плаки
- Вложки за инкубатор за микропроби, съвместими с 96-ямкови MIDI плаки
- Високоскоростна шейкърна микроплака с диапазон на скоростта на смесване 200 – 3000 об./мин
- Магнитна стойка, съвместима с 96-ямкови PCR плаки
- Магнитна стойка, съвместима с 96-ямкови MIDI плаки
- Флуорометър, съвместим с Вашия метод за количествено определяне
- Анализатор на ДНК фрагмент
- Прецизни пипети:
 - 10 μl едно- или многоканални пипети
 - 20 μl едно- или многоканални пипети
 - 200 μl едно- или многоканални пипети
 - 1000 μl едноканални пипети
 - Прецизните пипети гарантират прецизното подаване на реагенти и проби. Може да се използват едноканални и многоканални пипети, ако са калибрират редовно и са прецизни в рамките на 5% от указания обем.
- Центрофуга на микроплака
- Микроцентрофуга
- Една от следните системи за Illumina секвениране:
 - Инструмент MiSeqDx, каталожен № DX-410-1001

- Инструмент NextSeq 550Dx, каталожен № 20005715 с опционален сървър Illumina DRAGEN за NextSeq 550Dx , каталожен № 20086130
- Инструмент NovaSeq 6000Dx, каталожен № 200068232
- [Опционално] Вакуумен концентратор
- [FFPE] Система за откриване на PCR в реално време

Материали

Уверете се, че разполагате с необходимите материали, преди да започнете протокола.

Някои елементи са необходими само за конкретни работни процеси. Тези елементи са посочени в отделни таблици.

Протоколът е оптимизиран и валидиран с помощта на изброените елементи. Сравнимите характеристики не са гарантирани при използване на алтернативни материали.

- Връхчета на пипета с филтър
- Конични центрофужни епруветки, 15 ml или 50 ml
- Епруветки за микроцентрифугиране, 1,5 ml
- Многоканални резервоари за реагенти без RNase/DNase, за еднократна употреба
- Лента с 8 епруветки и капачки без RNase/DNase
- Серологични пипети
- 96-ямкова полипропиленова плака за съхранение с дълбоки ямки, 0,8 ml (MIDI плака)
- 96-ямкови напълно закрити PCR планки с твърда обвивка
- [FFPE] qPCR плаки, съвместими с qPCR инструмент
- Залепващи уплътнения за 96-ямкови плаки със следните спецификации:
 - Отлепващ се, оптически прозрачен полиестер
 - Подходящ за закрити PCR плаки
 - Силно лепило, което издържа многократни температурни промени от -40°C до 110°C
 - Без DNase/RNase
- Пластмасови консумативи, съвместими с избрания метод за количествено определяне
- Флуорометричен комплект за количествено определяне на двДНК, съвместим с избраната система за количествено определяне:
 - За количествено определяне на предварително обогатени амплифицирани библиотеки може да се използва комплект за количествено определяне на широк обхват.
 - За количествено определяне на обогатени библиотеки обхватът на комплекта за количествено определяне зависи от използвания панел на сондата.
- Комплект за анализ на фрагменти за качествено определяне за библиотека с избрана система за качествено определяне:

- За качествено определяне на предварително обогатени амплифицирани библиотеки може да се използва комплект с широк обхват.
- За качествено определяне на обогатени библиотеки обхватът на комплекта за качествено определяне зависи от използвания панел на сондата.
- [Опционален] Комплект за извличане на ДНК от човешки клетки и тъкан. Може да се приложи всеки валидиран метод за екстракция.

Събиране, транспортиране и съхранение на спесимени



ВНИМАНИЕ

Работете с всички спесимени така, сякаш са потенциално инфекциозни агенти.

- Този анализ е съвместим с геномна ДНК, извлечена от човешки клетки и тъкан.
- За предлаганата в търговската мрежа пречистена гДНК се уверете, че пробите са транспортирани при правилните условия и съхранявани съгласно инструкциите на производителя. Следвайте най-добрите практики за съхранение и цикли на замразяване на размразяване на гДНК.
- За въвеждане на цяла кръв следвайте изискванията за вземане, транспортиране и съхранение на кръв, приложими за избрания метод за екстракция на ДНК. Може да се приложи всеки валидиран метод за екстракция. Транспортирането на цяла кръв трябва да отговаря на националните, федералните, щатските и местните разпоредби за транспортиране на етиологични агенти.
- За екстракция на ДНК от FFPE тъкан може да се използва всеки валидиран метод на екстракция. Следвайте инструкциите и препоръките, приложими за избрания метод на извличане за определяне на следните практики:
 - Метод за фиксиране във формалин и вграждане в парафин за тъкани, за да се гарантира най-доброто качество на извлечената ДНК.
 - Съхранение на FFPE проби.
 - Изискванията за изходния материал, като например брой и дебелина на секциите FFPE. Повечето методи за пречистване препоръчват използването на прясно нарязани секции.

Предупреждения и предпазни мерки

- Реагентите от Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit съдържат потенциално опасни химикали. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Носете предпазно оборудване, включително защита за очи, ръкавици и лабораторна престилка, подходящи за риска от експозиция. Третирайте използваните реактиви като химичен

отпадък и ги изхвърляйте съгласно приложимите регионални, национални и местни закони и нормативни разпоредби. За информация относно околната среда, здравето и безопасността вижте информационния лист за безопасност (SDS) на адрес support.illumina.com/sds.html.

- Незабавно докладвайте за всички сериозни инциденти, свързани с този продукт, на Illumina и на компетентните органи на държавите членки, в които са се установили потребителят и пациентът.
- Работете с всички кръвни проби така, сякаш е известно, че са заразни за човешкия имунодефицитен вирус (HIV), вируса на човешкия хепатит В (HBV) и други патогени, пренасяни в кръвта (универсални предпазни мерки).
- Използвайте обичайните лабораторни предпазни мерки. Не пипетирайте с уста. Не яжте, не пийте и не пушете в определените работни зони. Носете ръкавици за еднократна употреба и лабораторни престилки при работа с материали за изследване и комплекти с реагенти. Измийте внимателно ръцете си след работа с материали за изследване и комплекти с реагенти.
- За да се предотврати деградацията на пробата или реагента, преди да започнете протокола се уверете, че всички изпарения на натриев хипохлорит са се разсеяли напълно.
- Замърсяването на пробите с други PCR продукти/ампликони може да доведе до неточни и ненадеждни резултати. За да избегнете замърсяване, използвайте следните най-добри практики:
 - Използвайте подходящи лабораторни практики и лабораторна хигиена.
 - Изпълнете стъпките на работния процес в определените зони за пред- или следусилване.
 - Съхранявайте използваните реагенти преди почистване на библиотеките в зона за предварително амплифициране.
 - Отделете реагентите за предварително усилване от реагентите след усилване.
 - За да предотвратите замърсяване, уверете се, че зоните за предусилване и следусилване разполагат със специално оборудване, като пипети, връхчета за пипети, вортекс и центрофуга.
- Избягвайте кръстосано замърсяване. Използвайте нови накрайници за пипети за отделните проби и дозирания на реагенти. Използването на устойчиви на аерозоли връхчета намалява риска от пренасяне на ампликон и кръстосана контаминация от проба към проба.
 - Когато добавяте или прехвърляте проби или реагенти за мастър миксове, сменяйте връхчетата за всяка проба.
 - Когато добавяте индексни адаптери с многоканална пипета, сменяйте връхчетата между редовете или колоните. Ако използвате едноканална пипета, сменете връхчетата за всяка проба.
 - Изнесете неизползваните плаки за индексни адаптери от работната зона.
- Използвайте следните най-добри практики за стъпки за измиване с етанол:
 - Винаги пригответе пресен разтвор 80% етанол. Етанолът може да абсорбира влага от въздуха, което може да повлияе на резултатите.
 - По време на стъпките на измиване се уверете, че всичкият етанол е отстранен от дъното на ямките. Остатъчният етанол може да повлияе на резултатите.

- Придържайте се към указаното време за сушене за стъпките за магнитната стойка, за да сте сигурни за пълното изпаряване. Остатъчният етанол може да повлияе на производителността на последващите реакции.
- Винаги пригответе мастър миксове преди употреба и никога не съхранявайте комбинираните работни разтвори.
- Функционирането на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не е гарантирано, когато процедурите не се спазват, както е посочено в листовката в опаковката.
- Не използвайте никакви компоненти от комплектите след изтичане на срока им на годност, посочен на етикета на комплекта.
- Не разменяйте компоненти на комплектите от различни комплекти Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Комплектите са обозначени на етикета на комплекта.

Процедурни бележки

Препоръки за въвеждане на ДНК

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Протоколът е съвместим с висококачествени двойноверижни геномни ДНК (гДНК) въвеждания от 50 – 1000 ng.

Уверете се, че първоначалната проба от гДНК не съдържа > 1 mM EDTA и не съдържа органични замърсители, като фенол и етанол. Тези вещества могат да попречат на тагментационната реакция и да доведат до неуспех на анализа.

Въвеждане на гДНК \geq 50 ng

За въвеждане на гДНК между 50 – 1000 ng не се изисква количествено определяне и нормализиране на първоначалната гДНК проба.

Въвеждане на гДНК < 50 ng

Може да се използват ДНК въвеждане от 10 – 50 ng със следните корекции:

- Ако се използва въвеждане от 10 – 49 ng гДНК, се препоръчва количествено определяне на първоначалната проба на гДНК, за да се определи броят на PCR циклите, необходими след тагментацията. Използвайте флуорометричен метод за количествено определяне на въвеждането на двойноверижна гДНК. Избягвайте методи, които измерват общата нуклеинова киселина, като NanoDgor или други методи за UV абсорбция.
- Този протокол не нормализира крайните предварително обогатени библиотечни добиви от 10 – 49 ng гДНК и следователно се изисква количествено определяне и нормализиране на библиотеките преди и след обогатяване.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е характеризирани и проверени за ДНК въвеждания от 50 – 1000 ng. Еквивалентната производителност на продукта не може да бъде гарантирана за въвеждане на гДНК < 50 ng.

Препоръки за въвеждане на кръв

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е съвместим с гДНК, извлечена от периферна цяла кръв. Може да се приложи всеки валидиран метод за екстракция. При извличане на гДНК от цяла кръв не се изисква първоначално количествено определяне на въведената ДНК и Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit произвежда нормализирани предварително обогатени библиотечни добиви.

Следните фактори могат да повлияят неблагоприятно на количеството ДНК, получено от проби от цяла кръв и следователно нормализирането на библиотеката:

- Възраст на кръвната проба
- Условия на съхранение
- Основни медицински състояния, засягащи броя на белите кръвни клетки

Препоръки за въвеждане на FFPE тъканна проба

Използвайте следните критерии за качество на FFPE ДНК, за да определите подходящото въвеждане за успешна библиотечна подготовка:

- За FFPE проби със ΔCq стойност ≤ 5 , препоръчваната въведена ДНК е 50 – 1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx не се препоръчва за FFPE проби с лошо качество с $\Delta Cq > 5$. Използването на проби с $\Delta Cq > 5$ е възможно, но може да увеличи шансовете за неуспех в подготовката на библиотеката или да намали производителността на анализа.

Извличане на FFPE

Използвайте метод за изолиране на нуклеинова киселина, който произвежда високи добиви за възстановяване, минимизира консумацията на проба и запазва целостта на пробата. Можете да използвате всеки валидиран метод за извличане на ДНК от FFPE проби. За гДНК, извлечена от FFPE тъкан, се изисква първоначално количествено определяне на въведената ДНК и Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не произвежда нормализирани предварително обогатени библиотечни добиви.

Качествено определяне на ДНК от FFPE

На гДНК, извлечена от FFPE тъкан, преди употреба трябва да се направи качествено определяне. За оптимална работа, оценете качеството на ДНК пробата, като използвате валидиран метод на извличане за качествено определяне на ДНК, извлечена от FFPE проби. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit протоколът е съвместим с ДНК проби от FFPE с ΔCq стойност ≤ 5 . Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не се препоръчва за проби от FFPE с лошо качество с $\Delta Cq > 5$. Използването на проби с $\Delta Cq > 5$ е възможно, но може да увеличи шансовете за неуспех в подготовката на библиотеката или да намали

производителността на анализа.

[Опционално] Референтни FFPE проби

Използвайте характеризирани референтни материали като Horizon HD799 (ДНК) за положителна контрола при изпълнение на протокола. Подходящи материали за FFPE от ксенографти, получени от клетъчната линия, могат да се използват и като референтни проби. Използвайте флуорометричен метод за количествено определяне на референтните материали преди употреба.

ЗАБЕЛЕЖКА Изпълняване на положителна контролна референтна проба или без контролен шаблон намалява общия брой на неизвестните проби, които могат да бъдат обработени.

Вижте Препоръки за въвеждане на проби.

Препоръките за въвеждане на проби за Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit са обобщени в следващата таблица.

Таблица 1 Вижте Препоръки за въвеждане на проби.

Тип въвеждане на проба	Количество въведени проби	Изисквано количествено определяне на въведена ДНК	Изисквано качествено определяне на въведена ДНК	Добив от нормализирана предварително обогатена библиотека
gDNA	10 – 49 ng	Да	Съотношение 260/280 от 1,8 – 2,0	Не
gDNA	50 – 1000 ng	Не	Съотношение 260/280 от 1,8 – 2,0	Да
гДНК от кръв	50 – 1000 ng	Не	Съотношение 260/280 от 1,8 – 2,0	Да
гДНК от FFPE	50 – 1000 ng	Да	ΔCq стойност ≤ 5	Не

Препоръчителните PCR цикли за eBLTS PCR програмата се коригират въз основа на въвежданите концентрация и качество на пробата. За повече информация вижте [Усилване на тагментирана ДНК на стр. 30](#).

Съвети и техники

Избягване на кръстосано замърсяване.

- Когато добавяте или прехвърляте проби, сменяйте връхчетата за *всяка проба*.
- Когато добавяте индексни адаптери с многоканална пипета, сменяйте връхчетата между *редовете* или *колоните*. Ако използвате едноканална пипета, сменете връхчетата за всяка проба.

Запечатване на плаката

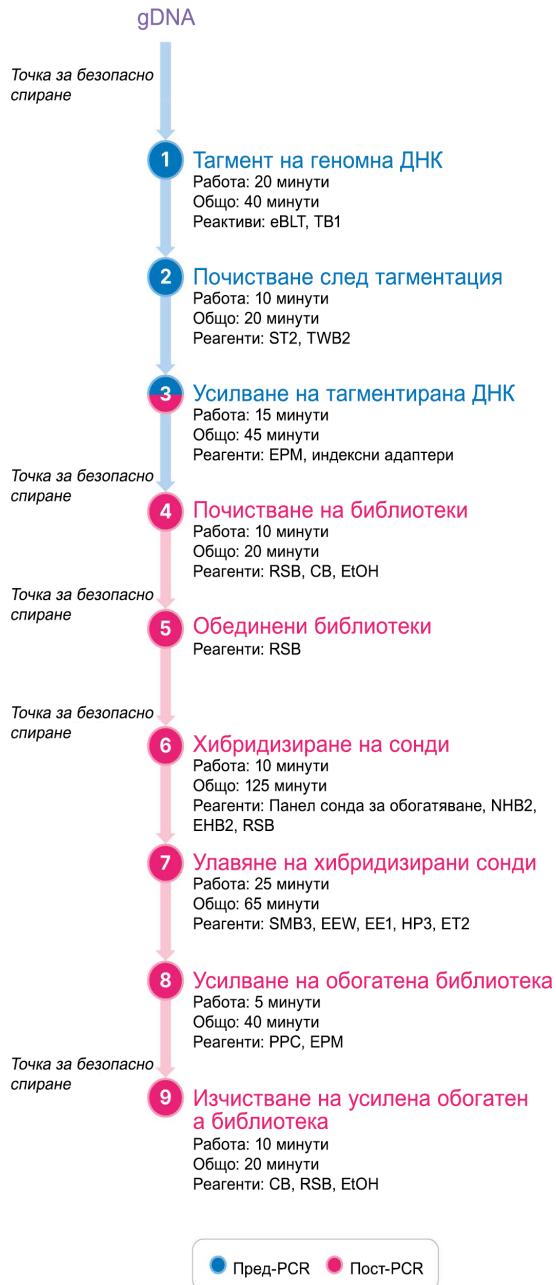
- Винаги запечатвайте 96-ямковата плака с ново залепващо уплътнение, като използвате гумена ролка, за да покриете плаката преди следващите стъпки в протокола:
 - Стъпки за разклащане
 - Стъпки на инкубиране. Ако плаката не се запечата правилно, това може да доведе до изпаряване по време на инкубацията.
 - Стъпки на центрофугата
 - Стъпки на хибридизация
- Уверете се, че ръбовете и ямките са напълно запечатани, за да намалите риска от кръстосано замърсяване и изпаряване.
 - Ако се наблюдава течност или кондензация върху уплътнението или страните на ямките на плаката, центрофугирайте, ако е необходимо, преди да разпечатите.
- Поставете плаката върху равна повърхност, преди бавно да отстраните уплътнението.

Работа с Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Съхранявайте епруветката за съхранение на eBLTS в изправено положение, така че топчетата винаги да са потопени в буфера.
- Непосредствено преди употреба, завихрете добре епруветката eBLTS, докато топчетата се ресуспендират. За да избегнете повторното утаяване на топчетата, не се препоръчва центрофугиране преди пипетиране.
- Ако топчетата са залепени от страни или отгоре на плака с 96 ямки, центрофугирайте при 280 × g за 3 секунди и след това пипетирайте, за да ресуспендирате.
- При измиване eBLTS:
 - Използвайте подходяща магнитна стойка за плаката.
 - Дръжте плаката на магнитната стойка, докато инструкциите не посочат да я отстраните.
 - Ако топчетата се аспирират във връхчетата на пипетата, разпределете ги обратно върху плаката на магнитната стойка и изчакайте, докато течността се избистри (2 минути).

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Работен ПОТОК

Следващата диаграма илюстрира работния процес на Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Между стъпките са маркирани точки за безопасно спиране. Изчисленията на времето се основават на обработката на 12 проби при 12-плексно обогатяване.



Инструкции за употреба

Тази глава описва Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit протокола.

- Прегледайте планирания работен процес за пълно секвениране, от пробата до анализа, за да се гарантира съвместимостта на продуктите и параметрите на експеримента.
- Преди да продължите, потвърдете съдържанието на комплекта и се уверете, че имате необходимите компоненти, оборудване и материали.
 - Биотинилираните сонди на трети страни трябва да отговарят на специфични изисквания. Вижте [Изисквания към панела на сондата за обогатяване на стр. 11](#), за да се уверите, че Вашите сонди от трета страна отговарят на изискванията.
- Следвайте протокола в показания ред, като използвате посочените обеми и инкубационни параметри.
- Освен ако в протокола не бъде посочена безопасна точка на спиране, продължете незабавно със следващата стъпка.
- При създаване на мастър микс, в предоставените обеми е включено пренатоварване.
- Уверете се, че използвате подходящата магнитна стойка за вашия тип плака.

Подготовка за обединяване

Тази стъпка е необходима, за да се осигури успешно секвениране на обогатени библиотеки.

Обединяването на библиотеките може да се случи преди обогатяването и преди секвенирането.

Преди обогатяване — Отделните индексирани усилени библиотеки се обединяват за обогатяване с избрания панел на сонда. Това създава мултиплексно обединяване от обогатени библиотеки. За въвеждане на FFPE проба, обработката е тествана и се препоръчва изключително за 1-плексни реакции на обогатяване. За висококачествена гДНК е тестван 12-плексна, но са възможни 2-плексни до 11-плексни.

Преди секвенирането — 1-плексните обогатени библиотеки и/или мултиплексните обогатени библиотеки се обединяват преди секвенирането. Броят на обогатените библиотеки, които могат да бъдат секвенирани, зависи от целевата дълбочина на разчитане за всяка проба във вашата система за секвениране.

Уникално двойно индексирание

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit използва уникални двойни индекси.

- Библиотеките с двойна индексация добавят Индекс 1 (i7) и Индекс 2 (i5) секвенции, за да генерират уникално маркирани библиотеки.
- UD индексите имат различни, несвързани индексни секвенции за разчитане на индекс i7 и i5. Индексите са с дължина 10 бази.

Избирането на индексни адаптери с различни секвенции за обединени библиотеки оптимизира баланса на цветовете за успешно секвениране и анализ на данни. Сложните обединявания, които са ≥ 10 -плексни, по своята същност са цветово балансирани, така че можете да използвате всяка комбинация от индексни адаптери. По време на изпълняването на секвениране DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager модулът предоставя опции за цветови балансирани индексни комбинации и ви уведомява, ако няма достатъчно разнообразие в избраните индексни комбинации.

За информация относно секвенциите на индексния адаптер на Illumina UD и разположението на плаките вижте [Приложение: UD индекси на Illumina за адаптерни секвенции на стр. 68](#)

Поддържани възможности за обогатяване

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit реагентите са конфигурирани и тествани при 1-плексна и 12-плексна обогатяваща сложност. Въпреки че са възможни други сложности за обогатяване, някои сложности изискват допълнителна подготовка на библиотеката за предварително обогатяване и реагенти за панел на сондата за обогатяване.

Получаването на подходящ добив на обогатяване с нестандартна сложност на обогатяването може да изисква допълнителна оптимизация. Оптималните резултати не са гарантирани.

- **Сложност на обогатяването** – Броят на предварително обогатените библиотеки (1 – 12), събрани заедно в една реакция на обогатяване за хибридизация с панелите на сондата за обогатяване. Например, комбинирането на 12 предварително обогатени библиотеки заедно създава 12-плексно обединение за обогатяване.
- **Реакция на обогатяване** – Броят на уникалните реакционни препарати за обогатяване, независимо от броя на предварително обогатените библиотеки, обединени за всяка реакция. Например, една реакция на обогатяване може да подготви 1-плексно или 12-плексно обединение за обогатяване.

За да изчислите общия брой на библиотеките след обогатяване, умножете сложността на обогатяването на реакция по броя на реакциите на обогатяване. Например, една единствена реакция на обогатяване на 12-плексно обединение за обогатяване произвежда обединение от 12 библиотеки след обогатяване.

Когато обединявате предварително обогатени библиотеки, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit реагентите поддържат следните реакции на обогатяване и сложност.

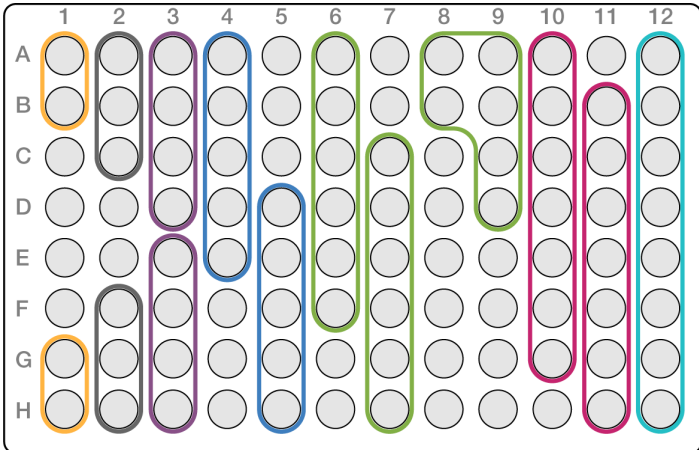
Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Реагенти	Реакции на обогатяване	Сложност на обогатяване
Комплект с 16 проби	16 реакции	1-плекс
Комплект с 96 проби	8 реакции	12-плекс

Стратегии за обединяване на два до осем плекса

Следващата таблица показва индексни адаптери (ямки), които могат да се комбинират в 2-8-плексен пул, докато цветно кодираната фигура илюстрира всяка комбинация.

Обединете всяка сложност ≥ 2 от горната или долната част на колона. Не се обединявайте в ред.

Сложност	Комбинация	Цвят на фигурата
2	Първите две или последните две ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • А и В • G и H Редове C–F не се използват.	Оранжево
3	Първите три или последните три ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • A–C • F–H Редове D и E не се използват.	Сива
4	Първите четири или последните четири ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • A–D • E–H 	Лилаво
5	Първите пет или последните пет ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • A–E • D–H 	Синьо
6	[Опция 1] Първите шест или последните шест ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • A–F • C–H [Опция 2] Първите две ямки (A и B) или последните две ямки (G и H) в една колона и всички четири ямки в съседна колона.	Зелено
7	Първите седем или последните седем ямки в колона: <ul style="list-style-type: none"> • A–G • B–H 	Розово
8	Цялата колона.	Синьо-зелено

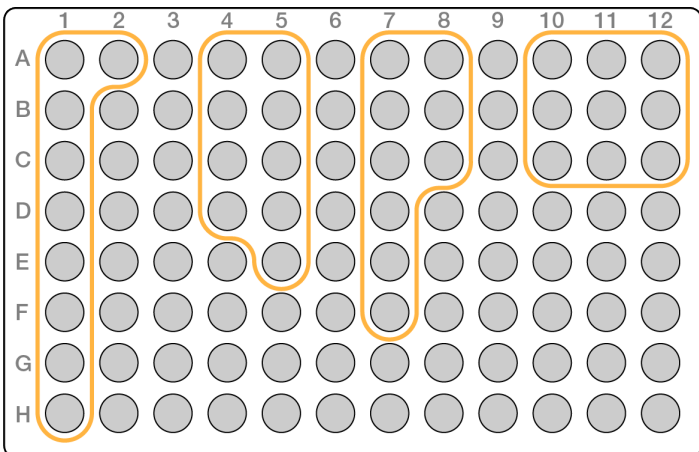


Стратегии за обединяване на девет плекса

Използвайте индексни адаптери от всички ямки, които оптимизират баланса на цветовете в изпълняване на секвениране, например:

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

Следната фигура изобразява всичките четири примера.



Тагмент на геномна ДНК

Тази стъпка използва Enrichment BLT Small (eBLTS) за маркиране на ДНК, което е процес, който фрагментира и маркира ДНК с адаптерни секвенции.

Консумативи

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (жълта капачка)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Вода без нуклеаза
- 96-ямкова PCR плака
- Залепващо уплътнение
- Епруветки за микроцентрифугиране, 1,7 ml
- Лента с 8 епруветки
- Пипетни върхове
 - 200 µl многоканални пипети

**ВНИМАНИЕ**

Този набор от реактиви съдържа потенциално опасни химикали. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Носете предпазно оборудване, включително защита за очи, ръкавици и лабораторна престилка, подходящи за риска от експозиция. Третирайте използваните реактиви като химичен отпадък и ги изхвърляйте съгласно приложимите регионални, национални и местни закони и нормативни разпоредби. За информация относно околната среда, здравето и безопасността вижте информационния лист за безопасност (SDS) на адрес support.illumina.com/sds.html.

Относно реагентите

- eBLTS трябва да се съхранява при температури от 2°C до 8°C. Да не се използва eBLTS, която е съхранявана под 2°C.
- Не центрофугирайте eBLTS.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи:

Артикул	Съхранение	Инструкции
eBLTS (жълта капачка)	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура. Вортексирайте непосредствено преди употреба за смесване. Не центрофугирайте преди пипетиране.
TB1	-25°C до -15°C	Оставете до достигане на стайна температура. Вортексирайте, за да се смесят.

2. Завихрете или пипетирайте ДНК и поле центрифугирайте за кратко.
3. Запазете следната TAG програма на термоциклера:
 - Изберете опцията за предварително нагрят капак и задайте 100°C
 - Настройте обема на реакцията на 50 µl
 - 55°C в продължение на 5 минути
 - Задръжете на 10°C

Процедура

1. Добавете 2 – 30 µl ДНК към всяка ямка в 96-ямкова PCR плака, така че общото въвеждано количество да е 50 – 1000 ng.
Ако обемът на ДНК < 30 µl, добавете вода без нуклеаза към ДНК пробите, за да се увеличи общият обем до 30 µl.
2. Вортексирайте eBLTS щателно, докато топчетата се ресуспендират напълно.
3. Комбинирайте следните обеми в епруветка, за да пригответе мастър микса за тагментация.
Умножете всеки обем по броя на обработваните проби.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)В обемите е включено излишно количество реактив.
4. Пипетирайте тагментационната основна смес старателно, за да я смесите.
5. Разделете обема на тагментационната основна смес поравно в лента с 8 епруветки.
6. С помощта на многоканална пипета от 200 µl прехвърлете 20 µl тагментационна основна смес във всяка ямка от PCR плаката, съдържаща проба. Използвайте нови връхчета за всяка колона или ред с проби.
7. Изхвърлете лентата с 8 епруветки, след като бъде отпуснат мастър микса за тагментация .
8. Като използвате 200 µl многоканална пипета, зададена на 40 µl, пипетирайте всяка проба 10 пъти, за да я смесите. Използвайте нови връхчета за всяка колона с проби.
Като алтернатива, запечатайте PCR плаката и използвайте шейкър за плаки при 1600 об./мин за 1 минута.
9. Запечатайте плаката и я поставете върху предварително програмирания термоциклер и стартирайте TAG програмата.
10. Изчакайте, докато програмата TAG достигне температурата на задържане от 10°C и след това незабавно извадете плаката.
11. Оставете PCR плаката с 96 ямки да престои на стайна температура за 2 минути и след това продължете към следващата стъпка.

Почистване след тагментация

Тази стъпка измива маркираната с адаптер ДНК на eBLTS преди PCR амплификацията.

Консумативи

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96-ямкова магнитна стойка за PCR плака
- Залепващо уплътнение
- Лента с 8 епруветки
- Пипетни върхове
 - 20 µl многоканални пипети
 - 200 µl многоканални пипети
- Подготовка за по-късна процедура:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Плака за индексен адаптер

Относно реагентите

- Уверете се, че използвате подходящата магнитна стойка за вашата плака. Използването на магнитна стойка за MIDI плака за PCR плака може да предотврати залепването на TWB2 към топчетата.
- Пипетирайте TWB2 бавно, за да сведете до минимум образуването на пяна, за да избегнете неправилно аспириране на обема и непълно смесване.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи:

Артикул	Съхранение	Инструкции
EPM	-25°C до -15°C	Размразете върху лед за 1 час. Обърнете, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
ST2	15°C до 30°C	Ако се наблюдават утайка, загрейте при 37°C за 10 минути и след това завихрете, докато утайката се разтвори. Да се използва на стайна температура.
TWB2	15°C до 30°C	Да се използва на стайна температура.
Плака за индексен адаптер	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура за 30 минути.

Процедура

1. Добавете 10 µl ST2 към всяка тагментационна реакция . Ако използвате многоканална пипета, пипетирайте ST2 в лента с 8 епруветки и след това прехвърлете съответните обеми в PCR плаката. Използвайте нови връхчета за всяка колона или ред с проби.
2. С помощта на пипета от 200 µl, зададена на 50 µl, бавно пипетирайте всяка ямка 10 пъти, за да ресуспендирате топчетата.
Като алтернатива, запечатайте плаката и разклатете при 1600 об./мин за 1 минута. Повторете, ако е необходимо.
3. Запечатайте плаката и след това центрофугирайте при 280 × g за 10 секунди.
4. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
5. Поставете на магнитната стойка за PCR плаки и изчакайте до избистрянето на течността(3 минути).
6. [≤ 48 проби] Измийте три пъти, както следва.
 - a. С помощта на многоканална пипета от 200 µl, зададена на 60 µl, отстранете и изхвърлете супернатанта, без да нарушавате утайката от топчета.
 - b. Извадете от магнитната стойка.
 - c. Веднага след това бавно добавете 100 µl TWB2 директно върху топчетата.
 - d. Пипетирайте бавно, докато топчетата се ресуспендират напълно. Като алтернатива, запечатайте плаката и разклатете при 1600 об./мин за 1 минута.
 - e. Ако се появи разплискване, завъртете при 280 × g за 10 секунди.
 - f. Поставете на магнитната стойка за PCR плаки и изчакайте до избистрянето на течността (3 минути).
Оставете плаката на магнитната стойка и TWB2 в ямките, за да предотвратите изсъхване при извършване на третото измиване. Отстранете и изхвърлете супернатанта, след като сте приготвили PCR Master Mix.
 - g. С помощта на многоканална пипета от 200 µl, зададена на 100 µl, отстранете и изхвърлете супернатанта.
 - h. Повторете стъпки c–f два пъти за общо три измивания.
7. [> 48 проби] Измийте три пъти, както следва.
 - a. Изпълнете стъпки b и c на стъпки от 1 колона до 2 колони, докато всички колони бъдат обработени, за да се предотврати изсъхване.
 - b. С помощта на многоканална пипета от 200 µl, зададена на 60 µl, отстранете и изхвърлете супернатанта.
 - c. Извадете от магнитната стойка.
 - d. Веднага след това бавно добавете 100 µl TWB2 директно върху топчетата.
 - e. Пипетирайте бавно, докато топчетата се ресуспендират напълно. Като алтернатива, запечатайте плаката и разклатете при 1600 об./мин за 1 минута.
 - f. Ако се появи разплискване, завъртете при 280 × g за 10 секунди.

- g. Поставете на магнитната стойка за PCR плаки и изчакайте до избистрянето на течността (3 минути).
Оставете плаката на магнитната стойка и TWB2 в ямките, за да предотвратите изсъхване при извършване на третото измиване. Отстранете и изхвърлете супернатанта, след като сте приготвили PCR Master Mix.
 - h. С помощта на многоканална пипета от 200 µl, зададена на 100 µl, отстранете и изхвърлете супернатанта.
 - i. Извадете от магнитната стойка и бавно добавете 100 µl TWB2 директно върху топчетата.
 - j. Повторете стъпки h и i на стъпки в 1 или 2 колони, докато всички колони бъдат обработени.
 - k. Повторете стъпки e-h два пъти за общо три измивания.
8. Дръжте на магнитната стойка до стъпка 4 от раздела *Процедура в Усилване на тагментирана ДНК*. TWB2 остава в ямките, за да се предотврати изсъхването на топчетата.

Усилване на тагментирана ДНК

Тази стъпка усилва тагментираната ДНК с помощта на PCR програма с ограничен цикъл. Стъпката PCR добавя адаптери Индекс 1 (i7), адаптери Индекс 2 (i5) и секвенции, необходими за генериране на клъстери за секвениране.

Консумативи

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Плака за индексен адаптер
- 96-ямкова PCR плака
- Вода без нуклеаза
- Залепващо уплътнение
- Епруветки за микроцентрифугиране, 1,5 ml
- Пипетни върхове
 - 20 µl многоканални пипети
 - 200 µl многоканални пипети

Относно реагентите

- Плаки за индексен адаптер
 - Една ямка може да съдържа > 10 µl индексни адаптери.
 - Не добавяйте проби към плаката за индексен адаптер.
 - Всяка ямка на индексната плака е само за еднократна употреба.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи:

Артикул	Съхранение	Инструкции
ЕРМ	-25°C до -15°C	Размразете при 4°C или върху лед за 1 час. Обърнете, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
Плака за индексен адаптер	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура за 30 минути.

2. Запазете следната eBLTS PCR програма на термоциклера, като използвате съответния брой PCR цикли, посочени в таблицата по-долу.

- Изберете опцията за предварително нагрят капак и задайте 100°C
- Настройте обема на реакцията на 50 µl
- 72°C в продължение на 3 минути
- 98°C в продължение на 3 минути
- X цикъла на:
 - 98°C в продължение на 20 секунди
 - 60°C в продължение на 30 секунди
 - 72°C в продължение на 1 минута
- 72°C в продължение на 3 минути
- Задръжте на 10°C

Общото време на изпълняване е ~38 минути за 9 цикъла и ~46 минути за 12 цикъла.

Тип въвеждане на проба	Брой PCR цикли (X)
10 – 49 ng гДНК	12
50 – 1000 ng гДНК	9
50 – 1000 ng гДНК, извлечена от FFPE	12
гДНК, извлечена от кръв	9

Процедура

1. Комбинирайте следното, за да пригответе PCR Master Mix. Умножете всеки обем по броя на пробите, които се обработват.
- ЕРМ (23 µl)
 - Вода без нуклеаза (23 µl)
- В обемите е включено излишно количество реактив.
2. Пипетирайте PCR Master Mix бавно 10 пъти, за да се смеси и после центрофугирайте за кратко.

3. С плаката на магнитната стойка използвайте 200 µl многоканална пипета, за да отстраните и изхвърлите TWB2.
Пяната, която остава по стените на ямката, не влияе неблагоприятно на библиотеката.
4. Извадете от магнитната стойка.
5. Незабавно добавете 40 µl PCR Master Mix директно върху топчетата във всяка ямка.
6. Незабавно пипетирайте, за да смесите, докато топчетата се ресуспендират напълно. Като алтернатива, запечатайте плаката и разклатете при 1600 об./мин. за 1 минута.
7. Запечатайте плаката с пробата и центрофугирайте при 280 × g за 10 секунди.
8. Центрофугирайте плаката за индексен адаптер при 1000 × g за 1 минута.
9. Подгответе плаката за индексния адаптер.
 - [< 96 проби] Пробождайте фолиото върху плаката за индексния адаптер с нов връх за пипета за всяка ямка само за броя на пробите, които се обработват.
 - [96 проби] Подравнете нова полузакрита PCR плака над плаката за индексния адаптер и натиснете надолу, за да пробиете фолиото. Изхвърлете PCR плаката, използвана за пробиване на фолиото.
10. С помощта на нов връх на пипета добавете 10 µl предварително сдвоени индексни адаптери към всяка ямка.
11. Като използвате пипета, поставена на 40 µl, пипетирайте 10 пъти, за да смесите. Като алтернатива, запечатайте плаката и разклатете при 1600 об./мин. за 1 минута.
12. Запечатайте плаката и след това центрофугирайте при 280 × g за 10 секунди.
13. Поставете върху термоциклера и стартирайте eBLTS PCR програмата.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 30 дни.

Почистване на библиотеки

Тази стъпка използва двустранна процедура за пречистване на топчета за пречистване на амплифицираните библиотеки.

Консумативи

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Прясно приготвен разтвор 80% етанол (EtOH)
- 96-ямкова полипропиленова плака за съхранение с дълбоки ямки, 0,8 ml (MIDI плака)
- 96-ямкова PCR плака
- Магнитна стойка за MIDI плаки

- Магнитна стойка за PCR плаки
- Епруветки за микроцентрифугиране, 1,5 ml
- Вода без нуклеаза

Относно реагентите

- Cleanup Beads
 - Вортексирайте преди всяка употреба.
 - Вортексирайте често, за да се уверите, че топчетата са равномерно разпределени.
 - Аспирирайте и разпределете бавно поради вискозитета на разтвора.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи:

Артикул	Съхранение	Инструкции
CB	Стайна температура	Вортексирайте и обърнете, за да смесите, докато цветът на течността стане хомогенен.
RSB	2°C до 8°C	Размразете на стайна температура за 30 минути. Вортексирайте, за да се смесят.

Процедура

1. Разклатете 96-ямковата PCR плака при 1800 об./мин за 1 минута и след това центрофугирайте за кратко.
2. Поставете PCR плаката на магнитната стойка и изчакайте до избистрянето на течността (1 минута).
3. Вортексирайте CB 3 пъти за 10 секунди и след това обърнете няколко пъти, за да суспендирате отново.
4. За висококачествена гДНК направете следното.
 - a. Добавете 77 µl вода без нуклеаза към всяка ямка на нова MIDI плака.
 - b. Добавете 88 µl CB към всяка ямка на MIDI плаката.
 - c. Прехвърлете 45 µl супернатант от всяка ямка на PCR плаката в съответната ямка на MIDI плаката.
 - d. Изхвърлете PCR плаката.
 - e. Пипетирайте всяка ямка 10 пъти, за да смесите. Като алтернатива, запечатайте плаката и разклатете при 1800 об./мин за 1 минута.
 - f. Запечатайте плаката и инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
 - g. Проверете за въздушни мехурчета. Ако има, завъртете надолу.
 - h. Поставете MIDI плаката на магнитната стойка и изчакайте до избистрянето на течността (5 минути).

- i. По време на инкубацията внимателно вортексирайте СВ, след което добавете 20 µl към всяка ямка на *нова* MIDI плака.
 - j. Прехвърлете 200 µl супернатант от всяка ямка на първата MIDI плака в съответната ямка на новата MIDI плака (съдържаща 20 µl СВ).
 - k. Изхвърлете първата MIDI плака.
 - l. Пипетирайте всяка ямка на новата MIDI плака 10 пъти, за да смесите. Като алтернатива, запечатайте плаката и разклатете при 1800 об./мин за 1 минута.
5. За извлечена FFPE направете следното.
- a. Добавете 81 µl СВ към всяка ямка на новата MIDI плака.
 - b. Прехвърлете 45 µl супернатант от всяка ямка на PCR плаката в съответната ямка на MIDI плаката.
 - c. Изхвърлете PCR плаката.
 - d. Пипетирайте всяка ямка 10 пъти, за да смесите. Като алтернатива, запечатайте плаката и разклатете при 1800 об./мин за 1 минута.
6. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
7. Проверете за въздушни мехурчета. Ако има, завъртете надолу.
8. Поставете MIDI плаката на магнитната стойка и изчакайте до избистрянето на течността (5 минути).
9. Без да нарушавате топчетата, отстранете и изхвърлете супернатанта.
10. Измийте топчетата по описания по-долу начин.
- a. С плаката на магнитната стойка добавете 200 µl пресен 80% EtOH, без да смесвате.
 - b. Инкубирайте за 30 секунди.
 - c. Без да нарушавате топчетата, отстранете и изхвърлете супернатанта.
11. Измийте топчетата **втори** път.
12. Изсушете на въздух на магнитната стойка за 5 минути.
13. Докато изсушавате на въздух, използвайте 20 µl пипета, за да отстраните и изхвърлите остатъчния EtOH.
14. Извадете от магнитната стойка.
15. Добавете 17 µl RSB към топчетата.
16. Запечатайте плаката и разклатете при 1800 об./мин за 2 минути.
17. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 2 минути.
18. Проверете за въздушни мехурчета. Ако има, завъртете надолу.
19. Поставете плаката на магнитната стойка за MIDI плаки и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
20. Прехвърлете 15 µl супернатант в нова 96-ямкова PCR плака.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката и я съхранявайте при -25°C до -15°C за период до 30 дни.

Обединяване на предварително обогатени библиотеки

Тази стъпка комбинира ДНК библиотеки с уникални индекси в едно обединение от най-много 12 библиотеки.

Методи за обединяване

Можете да обединявате по обем или маса. Използвайте следната таблица, за да определите подходящия метод за въвеждане.

Таблица 2 Препоръчителни методи за обединяване

Въвеждане на проба	Метод за обединяване
10 – 49 ng гДНК	Маса
50 – 1000 ng гДНК	Обем
гДНК, извлечена от FFPE	Маса
гДНК, извлечена от кръв	Обем

- Едноплексното обогатяване не изисква обединяване на предварително обогатени библиотеки. Въпреки това, може да е необходимо добавяне на RSB.
- След количествено определяне на предварително обогатени библиотеки, всички видове въведени проби могат да бъдат обединени по маса, за да се постигне оптимален баланс на индекса.
- Крайният добив на предварително обогатени библиотеки, генерирани в отделни експериментални препарати, може да варира. Поради това се препоръчва обединяване по маса за постигане на оптимален баланс на индекса.
- Използвайте 1-плексно обогатяване за следните ситуации.
 - 10 – 49 ng гДНК
 - 50 – 1000 ng гДНК, извлечена от FFPE
 - Откриване на ниска малка честота на алели за обозначаване на соматичен вариант.

Обединяване по маса

За следните ситуации, количествено определете библиотеките си, за да използвате ДНК маса на библиотека за обогатяване, посочено в [Обединяване на предварително обогатени библиотеки с еднаква концентрация на стр. 37](#).

- 10 – 49 ng гДНК от въведена проба
- 50 – 1000 ng гДНК, извлечена от FFPE, въведена проба
- Откриване на ниска малка честота на алели за соматично обозначаване на вариант
- гДНК, извлечена от кръв за оптимален баланс на индекса

Количествено определяне на предварително обогатени библиотеки

- Изпълнете 1 µl от предварително обогатените библиотеки, като използвате предпочитания от Вас метод за количествено определяне, базиран на флуоресценция, който използва двДНК интеркалиращо багрило.
 - За 50 – 1000 ng висококачествена гДНК, очаквайте ≥ 500 ng предварително обогатен библиотечен добив.
 - За 50 – 1000 ng гДНК, извлечена от FFPE, очаквайте 500 – 6000 ng предварително обогатен библиотечен добив, в зависимост от качеството на първоначалната проба.

ЗАБЕЛЕЖКА За методи за количествено определяне с различни отклонения, определете метода за количествено определяне за този работен процес. Резултатите за концентрацията може да се различават в зависимост от използвания метод.

Обединяване на предварително обогатени библиотеки с еднаква концентрация

Използвайте следната таблица, за да определите ДНК масата на библиотека, необходима за обогатяване, според типа на пробата и сложността на обогатяването. Оптималните добиви от обогатяването и функционирането на анализа не са гарантирани при използване на по-ниски добиви от предварително обогатената библиотека в сравнение с препоръчваните.

Общата ДНК маса в реакцията на обогатяване не трябва да надвишава 6000 ng.

Въвеждане на проба	Сложност на обогатяване	ДНК маса на библиотека (ng)	Обща маса на библиотека за ДНК (ng)
Висококачествена гДНК	12	250 – 500	3000 – 6000
гДНК, извлечена от FFPE	1	200	200

- Запишете индексите за библиотеките, които планирате да обедините в тази стъпка.
- Въз основа на концентрацията на всяка библиотека изчислете обема, който трябва да се добави към реакцията на обогатяване, за да се постигне необходимата ДНК маса.
 - Висококачествена гДНК: Изчислете обема на библиотеката, необходим за въвеждане на 250 – 500 ng.
 - гДНК, извлечена от FFPE: Изчислете обема на библиотеката, необходим за въвеждане на 200 ng.
- Добавете изчисления обем за всяка библиотека в една и съща ямка на PCR плаката.
- Ако използвате висококачествена гДНК, извършете едно от следните действия въз основа на общия обем на обединените предварително обогатени библиотеки:
 - Ако предварително обогатеният обем на библиотеката = 30 µl, преминете към [Хибридизиране на сонди на стр. 39](#).

- Ако предварително обогатеният библиотечен обем < 30 µl, добавете RSB, за да достигнете 30 µl общ обем.
 - Ако предварително обогатеният библиотечен обем > 30 µl, използвайте метод на базата на топчета или вакуумен концентратор, за да концентрирате обединената проба. Добавете RSB към концентрираната сборна проба, за да достигнете 30 µl общ обем.
5. Ако използвате гДНК, извлечена от FFPE, извършете едно от следните действия въз основа на общия обем на сборните предварително обогатени библиотеки.
- Ако предварително обогатеният обем на библиотеката = 7,5 µl, преминете към [Хибридизиране на сонди на стр. 39](#).
 - Ако предварително обогатеният библиотечен обем < 7,5 µl, добавете RSB, за да достигнете 7,5 µl общ обем.

ТОЧКА ЗА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката и я съхранявайте при -25°C до -15°C за период до 30 дни.

Обедняване по обем

Когато е въведена 50 – 1000 ng гДНК, не се изисква количествено определяне и нормализиране на индивидуални библиотеки, генерирани в един и същ експеримент.

За да постигнете оптимална производителност, само обединете предварително обогатени библиотечни проби, приготвени от един и същ потребител, партида реагенти и плака с индексни адаптери.

1. Запишете индексите за библиотеките, които планирате да обедините в тази стъпка.
2. Комбинирайте следните предварително обогатени библиотеки и RSB обеми за вашата комплексност на обогатяване в същата ямка на нова PCR плака.

Полученият обем е 30 µl.

Сложност на обогатяване *	Всеки предварително обогатен библиотечен обем (µl)	Обем на RSB (µl)
1-плекс	14	16
2-плекс	14	2
3-плекс	10	0
4-плекс	7,5	0
5-плекс	6	0
6-плекс	5	0
7-плекс	4,2	0,6
8-плекс	3,7	0,4
9-плекс	3,3	0,3

Сложност на обогатяване *	Всеки предварително обогатен библиотечен обем (µl)	Обем на RSB (µl)
10-плекс	3	0
11-плекс	2,7	0,3
12-плекс	2,5	0

*За информация относно нестандартни сложности (от 2-плекс до 11-плекс), вижте [Ограничения на процедурата на стр. 2](#).

ТОЧКА ЗА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката и я съхранявайте при -25°C до -15°C за период до 30 дни.

[Опционално] Количествено определяне на предварително обогатени библиотеки

Ако обединявате по обем, за да определите количествено предварително обогатените библиотеки, използвайте флуорометричен метод, който използва двДНК интеркалиращо багрило. За да се определите качествено предварително обогатените библиотеки, използвайте анализатор на ДНК фрагмент с подходящия комплект за анализ на фрагменти.

Използвайте общо 1 µl за качествено определяне на библиотека. Предварително обогатените библиотеки са достатъчно концентрирани, за да позволят малки разреждания за количествено определяне или анализ на фрагменти.

Хибридиране на сонди

Тази стъпка свързва целевите участъци на ДНК с улавящи сонди.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit реагентите са съвместими както с Illumina, така и с олигонуклеотидни панели на трети страни за обогатяване на ДНК. За информация относно необходимите спецификации за панели на трети страни вижте [Изисквания към панела на сондата за обогатяване на стр. 11](#).

Консумативи

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (синя капачка)
- Панел на сондата за обогатяване
- 96-ямкова PCR плака
- Залепващо уплътнение
- Подготовка за по-късна процедура:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (кехлибарена капачка)

Относно реагентите

- NHB2 се утаява и се отделя по време на съхранение.
- Панелът на сондата за обогатяване се отнася до избрания олигонуклеотиден панел за обогатяване от Illumina доставчика.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи:

Артикул	Съхранение	Инструкции
ЕНВ2	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура. Вортиксийрайте, за да се смесят. Ако се наблюдават кристали и помътняване, повторете завихрянето или пипетирайте нагоре и надолу, за да смесите, докато разтворът се изчисти.
Панел сонда за обогатяване	-25°C до -15°C (Illumina)	За панелите Illumina на трети страни, аклиматизирайте до стайна температура. Вортиксийрайте, за да се смесят.
NHB2 (синя капачка)	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Когато стигнат стайна температура, загрейте предварително в инкубатор за микропроби до същата температура като сондата, която използвате, в продължение на 5 минути. Вортиксийрайте при максимална скорост 3 пъти за по 10 секунди, за да ресуспендирате. Центрофугирайте за кратко. Пипетирайте нагоре и надолу от дъното на епруветката. Ако се наблюдават кристали и помътняване, повторете завихрянето или пипетирайте нагоре и надолу, за да смесите, докато разтворът се изчисти. Използвайте, докато е топло, за да избегнете реформирането на утайката.

Артикул	Съхранение	Инструкции
SMB3*	2°C до 8°C	Ако продължавате към следващата процедура веднага след 90-минутното задържане в програмата НУВ, аклиматизирайте до стайна температура най-малко 2 часа преди да стартирате програмата НУВ.
EEW* (кехлибарена епруветка)	-25°C до -15°C	Ако продължавате към следващата процедура веднага след 90-минутното задържане в програмата НУВ, аклиматизирайте до стайна температура най-малко 2 часа преди да стартирате програмата НУВ. Когато достигне стайна температура, загрейте предварително в инкубатор за микропроби до приложимата хибридизация и задръжте температурата в продължение на 30 минути преди края на програмата НУВ.

*Ако спирате преди следващата процедура, отложете подготовката на този реагент, докато не достигнете тази процедура.

- Запазете следната НУВ програма на термоциклера, като използвате съответния брой цикли, които са изброени в [Таблица 3](#).
 - Изберете опцията за предварително нагрят капак и задайте 100°C
 - Задайте обема на реакцията.
 - [Висококачествена гДНК] 100 µl
 - [gDNA, извлечена от FFPE] 25 µl
 - 98°C в продължение на 5 минути
 - X цикъла по 1 минута всеки, като се започне от 98°C за първия цикъл, след това се намалява с 2°C на цикъл
 - Задръжте за 90 минути при приложимата температура:
 - [гДНК, извлечена от FFPE] 58°C
 - [80 мер панели със сонда] 58°C
 - [Обозначаване на соматичен вариант] 58°C
 - [Всички други] 62°C
- Общото време за изпълняване е ~115 минути.

Таблица 3 Номер на цикъл на проба или панел

Тип проба и панел	Брой цикли (X)
гДНК, извлечена от FFPE (независимо от типа панел)	20
80 мер панели със сонда (независимо от типа проба)	20
Обозначаване на соматичен вариант	20
Всички други проби и панели	18

Процедура

1. **[Висококачествена гДНК]** Добавете следните реагенти *в реда, посочен* във всяка обединена библиотека в PCR плаката.
Не създавайте мастър микс. Създаването на мастър микс от NHB2 и ENB2 влияе отрицателно върху обогатяването.
 - NHB2 (синя капачка) (50 µl)
 - Панел на сондата за обогатяване (10 µl)
 - ENB2 (10 µl)
2. **[Висококачествена гДНК]** Като използвате пипета, зададена на 90 µl, пипетирайте всяка ямка 10 пъти, за да смесите.
3. **[Висококачествена гДНК, извлечена от FFPE]** Добавете следните реагенти *в реда, посочен* във всяка обединена библиотека в PCR плаката.
Не създавайте мастър микс. Създаването на мастър микс от NHB2 и ENB2 влияе отрицателно върху обогатяването.
 - NHB2 (синя капачка) (12,5 µl)
 - Панел на сондата за обогатяване (2,5 µl)
 - ENB2 (2,5 µl)
4. **[gDNA, извлечена от FFPE]** Като използвате пипета, зададена на 20 µl, пипетирайте всяка ямка 10 пъти, за да смесите.
5. Запечатайте плаката и центрофугирайте при 280 × g за 10 секунди.
6. Поставете плаката за пробите върху предварително програмирания термоциклер и стартирайте програмата HYB.
7. Преминете веднага към следващата процедура, когато времето за задържане на температурата на програмата HYB изтече.



ВНИМАНИЕ

Ако температурата на реакцията на хибридизация падне под стайната температура, се появява утаяване.

Улавяне на хибридлизирани сонди

Тази стъпка използва Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) за улавяне на сонди, хибридлизирани в целевите области, които са обект на интерес.

Консумативи

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (кехлибарена капачка)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- НР3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- Епруветка за микроцентрифугиране, 1,5 ml
- 96-ямкова MIDI плака
- 96-ямкова PCR плака
- Залепващо уплътнение
- Магнитна стойка за MIDI плаки
- Подготовка за по-късна процедура:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Относно реагентите

- EEW
 - Уверете се, че EEW е размразен на стайна температура в продължение на най-малко 2 часа преди предварително загряване в инкубатор за микропроби.
 - Уверете се, че EEW е загряван в инкубатор за микропроби в продължение на 30 минути, преди да приключи програмата HYB.
 - Оставете EEW в инкубатора за микропроби, когато не се използва. EEW трябва да остане загрят през целия протокол.
 - Може да бъде мътен след достигане на стайна температура.
 - Може да изглежда жълт.
- SMB3
 - SMB3 трябва да бъде на стайна температура преди употреба.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи.

Артикул	Съхранение	Инструкции
SMB3	2°C до 8°C	Оставете ги да престоят 2 часа, за да достигнат стайна температура. Обърнете и след това завихрете, докато напълно ресуспендирате.
EEW (кехлибарена епруветка)	-25°C до -15°C	След 2-часова инкубация на стайна температура загрейте предварително в инкубатор за микропроби до приложимата хибридизация и задръжте температурата в продължение на 30 минути преди края на програмата HYB.
EE1	-25°C до -15°C	Размразете при стайна температура и след това завихрете.
HP3	-25°C до -15°C	Размразете при стайна температура и след това завихрете.
ET2	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура. Вортексирайте, за да се смесят.
ERM	-25°C до -15°C	Размразете върху лед за един час. Обърнете, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана върху лед.
RPC	-25°C до -15°C	Размразете върху лед за един час. Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана върху лед.

- Загрейте предварително инкубатора с една микропроба с вложка за топлинен блок MIDI, за да инкубирате плаката с пробата до една от следните температури. За предварително загряване може да се използва опционален втори инкубатор за микропроби EEW. Поставете EEW върху вложката на топлинния блок MIDI.
 - [FFPE] 58°C
 - [80 мер на панели на сонда] 58°C
 - [Обозначаване на соматичен вариант] 58°C
 - [Всички останали] 62°C

Процедура

Улавяне

- Добавете SMB3 към съответната ямка на нова MIDI плака, както следва.
 - [Висококачествена гДНК] Добавете 250 µl SMB3.
 - [гДНК, извлечена от FFPE] Добавете 62,5 µl SMB3.

- С помощта на пипета, настроена на 100 µl за висококачествена гДНК, или 25 µl за FFPE прехвърлете всяка обединена библиотека от 96-ямковата PCR плака в съответната ямка на новата MIDI плака.
- Запечатайте плаката и разклатете при 1200 об./мин за 4 минути.
- Ако се появи разплискване, центрофугирайте плаката за кратко.
- Поставете плаката със сборни библиотеки върху вложката на топлинния блок MIDI в инкубатора за микропроби, под EEW епруветката, затворете капака и след това инкубирайте за 15 минути при приложимата температура:
 - [FFPE] 58°C
 - [80 мер панел на сондата] 58°C
 - [Обозначаване на соматичен вариант] 58°C
 - [Всички останали] 62°C
- Извадете плаката със сборни библиотеки и центрофугирайте при 280 × g за 30 секунди.
- Веднага поставете на магнитна стойка за MIDI плаки и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
- [Високо качествена гДНК]** Като използвате пипета, фиксирана на 200 µl, отстранете и изхвърлете целия супернатант от всяка ямка, без да се нарушавате гранулата.
- [гДНК, извлечена от FFPE]** Като използвате пипета, фиксирана на 90 µl, отстранете и изхвърлете целия супернатантот всяка ямка, без да се нарушавате гранулата.
- Отстранете и изхвърлете всички остатъчни супернатанти.

Измиване

- Извадете от магнитната стойка.
- [Висококачествена гДНК]** Бързо отстранете EEW от инкубатора за микропроби и добавете 200 µl към всяка ямка.
- [гДНК, извлечена от FFPE]** Бързо отстранете EEW от инкубатора за микропроби и добавете 50 µl към всяка ямка.
- Върнете неизползваните EEW в инкубатора за микропроби и ги поддържайте нагreti.
- Запечатайте и разклатете при 1800 об./мин за 4 минути.
- Поставете плаката за с проба върху вложката на топлинния блок MIDI в инкубатора за микропроби, под EEW епруветката, затворете капака и след това инкубирайте за 5 минути при приложимата температура:
 - [FFPE] 58°C
 - [80 мер панели със сонда] 58°C
 - [Обозначаване на соматичен вариант] 58°C
 - [Всички други панели] 62°C

7. Веднага поставете на магнитна стойка за MIDI плаки и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
8. Като използвате пипета, зададена на 200 µl за висококачествена гДНК или 50 µl за FFPE, отстранете и изхвърлете всички супернатанти от всяка ямка.
9. Повторете стъпки 1–8 два пъти за общо три измивания.

Прехвърляне на измиване

1. Извадете от магнитната стойка.
2. [Висококачествена гДНК] Бързо отстранете EEW от инкубатора за микропроби и добавете 200 µl към всяка ямка.
3. [гДНК, извлечена от FFPE] Бързо отстранете EEW от инкубатора за микропроби и добавете 50 µl към всяка ямка.
4. Запечатайте и разклатете при 1800 об./мин за 4 минути. Ако се появи разплискване, намалете скоростта до 1600 об./мин.
5. Прехвърлете ресуспендиращия разтвор на топчетата в нова MIDI плака.
Част от пробата може да остане в ямките.



ВНИМАНИЕ

Прехвърлянето на реагента свежда до минимум прехвърлянето на остатъчни реагенти, които могат да инхибират PCR надолу по веригата.

6. Поставете плаката на пробата върху вложката на топлинния блок MIDI в инкубатора за микропроби, затворете капака и след това инкубирайте за 5 минути при приложимата температура:
 - [FFPE] 58°C
 - [80 meg панели със сонда] 58°C
 - [Обозначаване на соматичен вариант] 58°C
 - [Всички останали] 62°C
7. Веднага поставете на магнитна стойка за MIDI плаки и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
8. Като използвате пипета, зададена на 200 µl за висококачествена гДНК или 50 µl за FFPE, отстранете и изхвърлете всички супернатанти от всяка ямка.
9. Центрофугирайте плаката при 280 × g за 30 секунди.
10. Поставете на магнитна стойка за MIDI плаки за 10 секунди.
11. Използвайте 20 µl пипета, за да отстраните и изхвърлите остатъчната течност от всяка ямка.
12. Незабавно продължете към [Елуиране на стр. 46](#), за да предотвратите прекомерното изсушаване на топчетата и загубата на библиотечен добив.

Елуиране

1. Комбинирайте следните обеми, за да пригответе смес Elution Master Mix. Умножете всеки обем по броя на обработваните обединени библиотеки.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)В обема е включено излишно количество реактив.
2. Вортексирайте и след това центрофугирайте за кратко.
3. Отстранете MIDI плаката от магнитната стойка.
4. Добавете 23 µl Elution Master Mix към всяка ямка.
5. Запечатайте плаката и разклатете при 1800 об./мин за 2 минути.
6. Инкубирайте плаката на стайна температура в продължение на 2 минути.
7. Центрофугирайте при 280 × g за 30 секунди.
8. Поставете на магнитна стойка за MIDI плаки и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
9. Прехвърлете 21 µl супернатант от MIDI плаката в съответната ямка на нова 96-ямкова MIDI плака.
10. Изхвърлете MIDI плаката.
11. Добавете 4 µl ET2 към всяка ямка, съдържаща 21 µl супернатант.
12. Задайте пипетата на 20 µl и бавно пипетирайте всяка ямка 10 пъти, за да смесите .
13. Запечатайте плаката и след това центрофугирайте при 280 × g за 10 секунди.
14. Инкубирайте плаката на стайна температура в продължение на 1 минута.

Усилване на обогатена библиотека

Тази стъпка използва PCR, за да усили обогатените библиотеки.

Консумативи

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Залепващо уплътнение

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи:

Артикул	Съхранение	Инструкции
ERM	-25°C до -15°C	Размразете при 4°C или върху лед за един час. Обърнете, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана върху лед.
PPC	-25°C до -15°C	Размразете при 4°C върху лед за един час. Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана върху лед.

2. Запазете следната AMP програма на термоциклера, като използвате съответния брой PCR цикли, които са изброени в следващата таблица.

- Изберете опцията за предварително нагрят капак и задайте 100°C
- Настройте обема на реакцията на 50 µl
- 98°C в продължение на 45 секунди
- (X) цикъла от:
 - 98°C в продължение на 30 секунди
 - 60°C в продължение на 30 секунди
 - 72°C в продължение на 30 секунди
- 72°C в продължение на 5 минути
- Задръжте на 10°C

Общото време на изпълняване е ~35 минути.

Тип проба и панел	(X) цикли
FPPE	14
Illumina Панел Exome (CEX) за висококачествена гДНК	10
Illumina Панел Exome (CEX) за FPPE	12
Всички други проби и панели	12 ¹²³⁴

¹ Може да се регулира до 15 цикъла за малки панели на трети страни чрез последваща оптимизация. Ако използвате FPPE, броят на циклите може да бъде коригиран до 17.

² Може да се регулира до 17 цикъла за панели на трети страни, които имат само 500 сонди. Ако използвате FPPE, броят на циклите може да бъде коригиран до 19.

³ Може да се регулира до 14 цикъла за FPPE проби.

⁴ Увеличаването на броя на PCR циклите може да доведе до по-висока дублирана скорост и по-малки размери на фрагментите за FPPE проби.

Процедура

1. Добавете 5 µl PPC към всяка ямка.
2. Добавете 20 µl EPM към всяка ямка.
3. Запечатайте плаката и разклатете при 1200 об./мин за 1 минута.
4. Центрофугирайте плаката при 280 × g за 10 секунди.
5. Поставете върху предварително програмирания термоциклер след амплификация и стартирайте програмата AMP.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, съхранявайте при температура от 2°C до 8°C за период до два дни. Алтернативно, оставете на термоциклера за до 24 часа.

Изчистване на усилена обогатена библиотека

Тази стъпка се използва Cleanup Beads за пречистване на обогатената библиотека и премахване на нежелани продукти.

Консумативи

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Пряко приготвен разтвор 80% етанол (EtOH)
- Залепващи се уплътнения
- 96-ямкова MIDI плака
- 96-ямкова PCR плака
- Магнитна стойка за MIDI плаки

Относно реагентите

- Cleanup Beads
 - Вортиксайте преди всяка употреба.
 - Вортиксайте често, за да се уверите, че топчетата са равномерно разпределени.
 - Аспирирайте и разпределете бавно поради вискозитета на разтвора.

Подготовка

1. Подгответе следните консумативи.

Артикул	Съхранение	Инструкции
CB	Стайна температура	Вортексирайте и обърнете, за да смесите, докато цветът на течността стане хомогенен.
RSB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура. Вортексирайте, за да се смесят.

- Пригответе пресен 80% EtOH от абсолютен етанол.

Процедура

- Центрофугирайте PCR плаката при 280 × g за 10 секунди.
- Вортексирайте CB 3 пъти за 10 секунди и след това обърнете.
- Добавете 40,5 µl CB към всяка ямка на нова **MIDI** плака.
- Прехвърлете 45 µl от всяка ямка на PCR плаката в съответната ямка на MIDI плаката.
- Запечатайте плаката и разклатете при 1800 об./мин за 1 минута.
- Инкубирайте MIDI плаката на стайна температура в продължение на 5 минути.
- Центрофугирайте при 280 × g за 10 секунди.
- Поставете на магнитна стойка за MIDI плаки и изчакайте до избистрянето на течността (5 минути).
- С помощта на пипета, настроена на 95 µl, отстранете и изхвърлете всички супернатанти от всяка ямка.
- Измийте два пъти, както следва.
 - С плаката на магнитната стойка добавете 200 µl пресен 80% EtOH, без да смесвате.
 - Инкубирайте за 30 секунди.
 - Без да нарушавате топчетата, отстранете и изхвърлете супернатанта.
- Изушете на въздух на магнитната стойка за 5 минути.
- Докато изсушавате на въздух, използвайте 20 µl пипета, за да отстраните и изхвърлите остатъчния EtOH от всяка ямка.
- Извадете от магнитната стойка и добавете 32 µl RSB към всяка ямка.
- Запечатайте плаката и разклатете при 1800 об./мин за 1 минута.
- Инкубирайте плаката на стайна температура в продължение на 5 минути.
- Центрофугирайте при 280 × g за 10 секунди.
- Поставете на магнитна стойка за MIDI плаки и изчакайте до избистрянето на течността (2 минути).
- Прехвърлете 30 µl супернатант от MIDI плаката с 96 ямки в съответната ямка на нова PCR плака.
- Изхвърлете MIDI плаката.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, запечатайте плаката и я съхранявайте при -25°C до -15°C за период до 7 дни.

Проверка на обогатени библиотеки

За да определите количествено въвеждането на двойноверижната gDNA, използвайте флуоресцентен метод, който използва интеркалиращо багрило. Избягвайте методи, които измерват общата нуклеинова киселина, като NanoDrop или други методи за UV абсорбция.

1. Изпълнете 1 μl от обогатените библиотеки, като използвате метода си за количествено определяне.

ЗАБЕЛЕЖКА Общият моларитет на сондата влияе пропорционално на добива на библиотеката след обогатяване.

Очаквайте среден размер на вложката от 125 – 235 bp и разпределение на библиотечни фрагменти с диапазон на размера от ~200 bp до ~1000 bp.

Разредете библиотеките до началната концентрация

Тази стъпка разрежда библиотеките до началната концентрация за вашата система за секвениране и е първата стъпка в серийно разреждане. След разреждане до началната концентрация библиотеките са готови да бъдат денатурирани и разредени до крайна зареждаща концентрация.

За секвениране, независимо от панела на сондата за обогатяване, който използвате, Illumina препоръчва настройка на изпълняване със сдвоен край със 151 цикъла на разчитане (2 × 151) и 10 цикъла на индексно разчитане. Ако искате по-малко припокриващи се разчитания или по-малко необработено покритие, можете да секвенирате надолу до 2 × 126 или 2 × 101.

- Изчислете стойността на моларитета на библиотеката или обединените библиотеки, като използвате следната формула.
 - За библиотеки, качествено определени за анализ на ДНК фрагмент, използвайте средния размер, получен за библиотеката.
 - За всички други методи за качествено определяне използвайте 350 bp като среден размер на библиотеката.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{среден размер на библиотеката (bp)}} = \text{Моларност (nM)}$$

Например, ако концентрацията в библиотеката ви е 20 ng/μl, а средният размер е 350 bp, получената стойност на моларитета е 86,58 nM.

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

- Като използвате стойността за моларитет, изчислете обемите RSB и библиотеката, необходими за разреждане на библиотеките до началната концентрация за вашата система.

Система за секвениране	Минимален задължителен обем на библиотеката (μl)	Начална концентрация (nM)	Крайна зареждаща концентрация (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) или 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM е началната концентрация за крайна зареждаща концентрация от 350 pM. Ако е необходимо, регулирайте крайната концентрация на зареждане, като използвате следната таблица.

Крайна зареждаща концентрация (pM)	Концентрация на сборна библиотека (nM)
100	0,50

Крайна зареждаща концентрация (pM)	Концентрация на сборна библиотека (nM)
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

- Разредете библиотеките, като използвате RSB:
 - Библиотеки, количествено определени като мултиплексирани обединени библиотеки** — Разредете обединението до началната концентрация за вашата система.
 - Библиотеки, количествено определени като отделни** — Разредете всяка библиотека до началната концентрация за вашата система. Добавете 10 µl от всяка разредена библиотека към епруветка, за да създадете мултиплексирана обединена библиотека.
- Следвайте инструкциите за денатуриране и разреждане за вашата система, за да я разредите до крайната концентрация на зареждане.
 - За системата NextSeq 550Dx вижте [Подготовка за секвениране на NextSeq 550Dx на стр. 53](#).
 - За системата MiSeqDx вижте [Подготовка за секвениране на MiSeqDx на стр. 55](#).
 - За системата NovaSeq 6000Dx вижте [Подготовка за секвениране на NextSeq 6000Dx на стр. 57](#).Окончателните зареждащи концентрации са отправна точка и обща насока. Оптимизирайте концентрациите за Вашия работен процес и метод за количествено определяне при последващи цикли на секвениране или чрез титриране на поточните клетки.

Подготовка за секвениране на NextSeq 550Dx

Използвайте следните инструкции за денатуриране и разреждане на библиотеки за секвениране в системата за секвениране NextSeq 550Dx.

Консумативи

- HT1 (Буфер за хибридизация)
- 1N NaOH
- 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

Подготовка

Пригответе *свеж* разтвор от 0,2N NaOH, за да денатурирате библиотеките за секвениране. Подготвя се допълнителен обем, за да се предотврати малки грешки в пипетирането да повлияят на крайната концентрация на NaOH.



ВНИМАНИЕ

Прясно разреденият 0,2N NaOH е от съществено значение за процеса на денатурация. Неправилната денатурация може да намали добива.

1. Подгответе следните консумативи

Артикул	Съхранение	Инструкции
HT1	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Да се съхранява при температура от 2°C до 8°C, докато не сте готови да разредите денатурираните библиотеки.

2. Комбинирайте следните обеми в микроцентрифужна епруветка, за да пригответе пресен разтвор на NaOH:

- Лабораторен клас вода (800 µl)
- 1N NaOH (200 µl)

Резултатът е 1 ml 0,2N NaOH.

3. Обърнете епруветката неколkokратно, за да смесите съдържанието.

4. Комбинирайте следните обеми в микроцентрифужна епруветка, за да пригответе 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

- Лабораторен клас вода (800 µl)
- 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

Резултатът е 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

ЗАБЕЛЕЖКА Дръжте епруветката затворена. Използвайте пресният разтвор в рамките на **12 часа**.

Денатурирани библиотеки

1. Комбинирайте следните обеми на библиотека и прясно разреден 0,2N NaOH в микроцентрифужна епруветка.

- Библиотека 10 µl
- 10 µl 0,2N NaOH

2. Вортексирайте за кратко, след което центрофугирайте при 280 × g за 1 минута.

3. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.

4. Добавете 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Разреждане на денатурирани библиотеки до 20 pM

1. Добавете 970 µl предварително охладен HT1 в епруветката с денатурирани библиотеки. Резултатът е денатурирана библиотека от 20 pM.
2. Вортексирайте за кратко, след което центрофугирайте при 280 × g за 1 минута.
3. Поставете библиотеките от 20 pM върху лед, докато не сте готови да продължите към окончателно разреждане.

Разреждане на библиотеките до зареждащата концентрация.

1. Добавете следните обеми, за да разредите денатурирания 20 pM библиотечен разтвор до 1,2 pM.
 - Денатуриран библиотечен разтвор (78 µl)
 - Предварително охладен HT1 (1222 µl)Общият обем е 1,3 ml при 1,2 pM.
2. Обърнете, за да смесите и след това пулсирайте центрофугата.
3. Пристъпете към секвенирането. За инструкции вижте *справочното ръководство на инструмент NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)* и *ръководството за потребителя на приложението за генериране на ДНК FASTQ Dx за локален мениджър на работния цикъл за NextSeq 550Dx (документ № 200015671)* или *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx в ръководството за потребителя на приложението NextSeq 550Dx (документ № 200025238)*.

Подготовка за секвениране на MiSeqDx

Използвайте следните инструкции за денатуриране и разреждане на библиотеки за секвениране в системата за секвениране MiSeqDx.

Консумативи

- HT1 (Буфер за хибридизация)
- 1N NaOH

Подготовка

Пригответе *свеж* разтвор от 0,2N NaOH, за да денатурирате библиотеките за секвениране. Подготвя се допълнителен обем, за да се предотврати малки грешки в пипетирането да повлияят на крайната концентрация на NaOH.

**ВНИМАНИЕ**

Прясно разреденият 0,2N NaOH е от съществено значение за процеса на денатурация. Неправилната денатурация може да намали добива.

1. Подгответе следните консумативи

Артикул	Съхранение	Инструкции
HT1	-25°C до -15°C	Размразете на стайна температура. Да се съхранява при температура от 2°C до 8°C, докато не сте готови да разределите денатурираните библиотеки.

2. Комбинирайте следните обеми в микроцентрифужна епруветка, за да пригответе пресен разтвор на NaOH:

- Лабораторен клас вода (800 µl)
- 1N NaOH (200 µl)

Резултатът е 1 ml 0,2N NaOH.

ЗАБЕЛЕЖКА Дръжте епруветката затворена. Използвайте пресният разтвор в рамките на **12 часа**.

Денатуриране на библиотека 4 nM

1. Комбинирайте следните обеми в епруветката за микроцентрифугиране.

- 4 nM библиотека (5 µl)
- 0,2N NaOH (5 µl)

2. Вортексирайте за кратко, след което центрофугирайте при 280 × g за 1 минута.

3. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.

4. Добавете 990 µl предварително охладен HT1 към епруветката, съдържаща денатурирана библиотека.

Резултатът е 1 ml 20 pM денатурирана библиотека.

Разреждане на денатурирани библиотеки 20 pM

1. Разрежете до желаната концентрация, като използвате следните обеми.

Концентрация	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Библиотека 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Предварително охладен HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Обърнете, за да смесите и след това пулсирайте центрофугата.

3. Пристъпете към секвенирането. За инструкции вижте *Наръчник за справка за инструмент MiSeqDx за MOS v4 (документ № 1000000157953)* и Ръководството за работен процес на мениджъра на локално изпълнение за генериране на ДНК FASTQ Dx за MiSeqDx (документ № 200015661).

Подготовка за секвениране на NextSeq 6000Dx

Използвайте следните инструкции за денатуриране и разреждане на библиотеки за секвениране в системата за секвениране NovaSeq 6000Dx.

Консумативи

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

Подготовка

Пригответе *свеж* разтвор от 0,2N NaOH, за да денатурирате библиотеките за секвениране. Подготвя се допълнителен обем, за да се предотврати малки грешки в пипетирането да повлияят на крайната концентрация на NaOH.



ВНИМАНИЕ

Прясно разределеният 0,2N NaOH е от съществено значение за процеса на денатурация. Неправилната денатурация може да намали добива.

1. Комбинирайте следните обеми в микроцентрифужна епруветка, за да разредите 1N NaOH до 0,2N NaOH:

Таблица 4 Режим S2

Реактив	Обем за една поточна клетка (µl)	Обем за две поточни клетки (µl)
Лабораторен клас вода	40	80
Запас от 1N NaOH	10	20

Тези обеми водят до 50 µl 0,2N NaOH за една поточна клетка или 100 µl 0,2 N NaOH за две поточни клетки.

Таблица 5 Режим S4

Реактив	Обем за една поточна клетка (µl)	Обем за две поточни клетки (µl)
Лабораторен клас вода	80	160
Запас от 1N NaOH	20	40

Тези обеми водят до 100 µl 0,2N NaOH за една поточна клетка или 200 µl 0,2 N NaOH за две поточни клетки.

- Обърнете няколко пъти, за да смесите или вортексирайте добре.
 - Комбинируйте следните обеми в микроцентрифужна епруветка, за да пригответе 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.
 - Лабораторен клас вода (600 µl)
 - 1M Tris-HCl, pH 8,0 (400 µl)
- Резултатът е 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0

ЗАБЕЛЕЖКА Дръжте епруветката затворена. Използвайте пресният разтвор в рамките на **12 часа**.

Създаване на нормализирано библиотечно обединяване

Зареждащата концентрация може да варира в зависимост от методите на приготвяне, количествено определяне и нормализиране на библиотеките.

Използвайте следните инструкции, за да нормализирате библиотеките до съответната концентрация и след това да обедините. Библиотеките, секвенирани върху една и съща проточна клетка, трябва да се комбинират в едно нормализирано обединение.

ЗАБЕЛЕЖКА Максималният брой проби, които могат да се изпълняват на линия с Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit е 192. Това ограничение се дължи на общия брой UD индекси в комплект А и Б.

Нормализиране на библиотеките за обединяване

- Определете необходимата концентрация на обединената библиотека въз основа на желаната крайна концентрация на зареждане.
 - За крайна зареждаща концентрация от 350 pM, необходимата сборна концентрация на библиотеките е 1,75 nM.
 - За да определите сборната концентрация на библиотеките за различна крайна концентрация на зареждане, вижте [Разредете библиотеките до началната концентрация на стр. 52](#).
- Нормализирайте библиотеките до желаната концентрация в сборната библиотека с помощта на 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
За помощ при разреждане на библиотеки до подходяща концентрация, вижте [Калкулатора за обединяване](#) на уебсайта Illumina.

Препоръчителни зареждащи концентрации

Оптималната зареждаща концентрация на ДНК зависи от вида на библиотеката и размера на вложката. За библиотеки > 450 bp може да са необходими по-високи концентрации на зареждане.

Обединяване на нормализирани библиотеки и добавяне на опционална PhiX контрола

1. Комбинирайте подходящия обем на всяка нормализирана библиотека в нова микроцентрифужна епруветка, за да се стигне до един от следните окончателни обеми:

Режим	Окончателен обем (µl)
S2	150
S4	310

2. [Опционално] Добавете 1% неденатуриран PhiX, както следва.
 - a. Разрежете 10 nM PhiX до 2,5 nM с помощта на 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
 - b. Добавете подходящия обем неденатуриран 2,5 nM PhiX към епруветката с неденатурирани обединени библиотеки.

Режим	Неденатуриран 2,5 nM PhiX (µl)	Неденатурирани обединени библиотеки (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

При добавяне на PhiX, 1% е препоръчителното количество за добре балансирани библиотеки. Библиотеките с ниско разнообразие може да изискват повече. За да използвате PhiX контрола с библиотеки с ниско разнообразие, свържете се с Техническа поддръжка на Illumina за насоки.

Обединени денатурирани библиотеки и опционален PhiX контрол

1. Добавете 0,2N NaOH към епруветката с обединени неденатурирани библиотеки и опционно PhiX, както следва.

Поточна клетка	0,2N NaOH	Неденатуриран обединени библиотеки (µl)	Резултатен обем
S2	37	150	187 µl или 187,9 µl с PhiX
S4	77	310	387 µl или 388,9 µl с PhiX

2. Затворете и след това завихрете за кратко.
3. Центрофугирайте при 280 × g в продължение на максимум 1 минута.
4. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 8 минути за денатуриране.
5. Добавете 400 mM Tris-HCl, pH 8,0, както следва, за да неутрализирате.

Режим	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Резултатен обем
S2	38	225 µl или 225,9 µl с PhiX
S4	78	465 µl или 466,9 µl с PhiX

6. Затворете и след това завихрете за кратко.
7. Центрофугирайте при 280 × g в продължение на максимум 1 минута.
8. Прехвърлете целия обем денатурирана библиотека или денатурирана библиотека и PhiX в библиотечната епруветка NovaSeq 6000Dx.
9. Пристъпете към секвенирането. За инструкции вижте *документацията за продукта на инструмента NovaSeq 6000Dx (документ № 200010105)* и *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx за NovaSeq 6000Dx (документ № 200014776)*.

Отстраняване на неизправности

Използвайте таблицата по-долу, за да отстраните проблема в работния процес. Ако изпълняването на секвениране или приготвянето на библиотеката за проба са неуспешни два пъти, може да е необходимо допълнително отстраняване на неизправности. Свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina.

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчано действие
Изпълняването на секвениране не преминава спецификациите за контрол на качеството Спецификации	Грешка на потребителя или на лабораторното оборудване в работния процес на анализа	<p>Определете качествено обогатените библиотеки, за да осигурите подходящ библиотечен добив и разпределение на размера на фрагментите. Повторете приготвянето на библиотеката от една от следните стъпки в зависимост от това къде е възникнала предполагаема грешка при използване или грешка в оборудването. Ако са неизвестни или възникнат други грешки, свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да отстраните неизправностите при изпълняване.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Повторно секвениране на библиотеки. Вижте Подготовка за секвениране на NextSeq 550Dx на стр. 53, Подготовка за секвениране на MiSeqDx на стр. 55 или Подготовка за секвениране на NextSeq 6000Dx на стр. 57. • Повторно обогатяване на библиотеки. Вижте Хибридизиране на сонди на стр. 39. • Започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Инструкции за употреба на стр. 22.
	Проблем с инструмента	Свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina.

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчано действие
Грешка при генериране на FASTQ или обща грешка в системата за секвениране (напр. мрежова грешка, грешки при зареждане/разтоварване на реагенти и т.н.)	Проблем със софтуера или инструмента	Вижте ръководството за модула или за приложението за помощ при анализа или вижте <i>NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Справочно ръководство за инструмента NextSeq 550Dx) (документ № 100000009513)</i> , <i>Наръчник за справка за инструмент MiSeqDx за MOS v4 (документ № 1000000157953)</i> или <i>Документацията за продукта на инструмента NovaSeq 6000Dx (документ № 200010105)</i> . Свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina за допълнителна помощ.
ДНК библиотеката не генерира достатъчно добив за секвениране на зареждането	Изискванията за въвеждане на проба не бяха изпълнени	Осигурете подходящо въвеждане на пробата и повторете приготвянето на библиотеката. Вижте Вижте Препоръки за въвеждане на проби. на стр. 19.
	Грешка при използване или оборудване в работния процес на анализа	Повторете приготвянето на библиотеката от една от следните стъпки в зависимост от това къде е възникнала предполагаема грешка при използване или грешка в оборудването. Ако са неизвестни или възникнат други грешки, свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да отстраните неизправностите при изпълняване. <ul style="list-style-type: none"> • Повторно секвениране на библиотеки. Вижте Подготовка за секвениране на NextSeq 550Dx на стр. 53, Подготовка за секвениране на MiSeqDx на стр. 55 или Подготовка за секвениране на NextSeq 6000Dx на стр. 57. • Повторно обогатяване на библиотеки. Вижте Хибридизиране на сонди на стр. 39. • Започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Инструкции за употреба на стр. 22.
	Не са изпълнени изискванията за панел на сонда за обогатяване	Уверете се в подходящия панел на сондата за обогатяване и повторете подготовката на библиотеката. Вижте Изисквания към панела на сондата за обогатяване на стр. 11.

Функционални характеристики

Работа с панели цял екзом

Работата на екзомния панел е тествана чрез използване на най-ниското (50 ng) и най-високото (1000 ng) препоръчано въвеждане на клетъчна линия Coriell gDNA NA12878, с известен реален набор за откриване на герминативни варианти (Coriell платинения геном). Екзомен панел 1 (45 Mb) и екзомен панел 2 (36,8 Mb) са използвани като представителни панели. 24 технически репликата са тествани чрез Illumina DNA Prep with Enrichment Dx анализ с помощта на екзомен панел 1 (45 Mb) в две 12-плексни реакции на обогатяване. 12 технически репликата са тествани чрез Illumina DNA Prep with Enrichment Dx анализ с помощта на екзомен панел 2 (36,8 Mb) в единична 12-плексна реакция на обогатяване. Обогатените библиотеки са секвенирани в системата за секвениране NextSeq 550Dx с модул DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

Следващата таблица показва средните стойности на вторичните показатели за секвениране и обозначаване на варианти за техническите репликати, тествани с всеки панел.

Таблица 6 Функциониране на анализ с два панела цял екзом

Панел	Уникално обогатяване с падирано разчитане	Еднородност на покритието	Медианни стойности за дължина на фрагмента	Връщане на SNV ¹	Прецизност на SNV ²	Връщане на индел ¹	Прецизност на индел ²
Екзомен панел 1 (45 Mb)	80%	96%	186 bp	96%	99%	90%	89%
Екзомен панел 2 (36,8 Mb)	93%	98%	188 bp	96%	99%	92%	93%

¹Връщане = Позитиви/(истински положителни + фалшиви отрицателни)

²Прецизност = Истински положителни/(истински положителни + фалшиви положителни)

Граница на откриване

За тестване на границата на откриване е използван референтен стандарт за ДНК на Horizon HD799. HD799 се състои от умерено компрометирана ДНК, третирана с формалин, с известни SNV в алелни честоти, вариращи от 1 до 24,5%. Използва се най-ниската препоръчителна ДНК вход (50 ng) и се оценява степента на откриване на SNV с $\geq 5,0\%$ честота на варианта на алела (VAF). 16 технически репликата са тествани чрез Illumina DNA Prep with Enrichment Dx анализа с помощта на работния процес FFPE, обогатени с панел за обогатяване на панрак (1,94 Mb) в 16 (1-плексни) обогатявания и след това секвенирани върху инструмент NextSeq 550Dx с DNA GenerateFASTQ Dx модула.

Всички проби са преминали специфичните за панела изисквания за работа на пробите, както е показано в следващата таблица.

Таблица 7 Изпълнение на пробата за граница на детекция

Панел	Честота на откриване на варианти на SNV \geq 5,0% VAF	Средно Еднородност на покритието
Панел за обогатяване на рака (1,94 Mb, 523 гени)	100%	99%

Смущаващи процеса вещества

Въздействието на потенциално смущаващи вещества е оценено за Illumina DNA Prep with Enrichment Dx чрез оценка на ефективността на анализа в присъствието на такива вещества.

Интерференция в цяла кръв

Ацетаминофен (екзогенно съединение, лекарство), креатинин и триглицериди (ендогенни метаболити) са тествани чрез тяхното добавяне в проби от цяла човешка кръв преди извличане на ДНК. За да се оцени интерференцията, получена в резултат от вземането на кръв (кратко вземане на кръв), EDTA също се добавя в проби от цяла кръв. Освен това, за да се оценят смущенията, произтичащи от приготвянето на пробата, етанол от молекулярен клас се добавя в ДНК, извлечена от цяла кръв.

Следващата таблица показва тестовите концентрации на интерферент.

Таблица 8 Потенциално интерфериращи вещества и концентрации, тествани в цяла кръв

Тестови субстанции	Тестова концентрация
Ацетаминофен	15,6 mg/dL* Три пъти по-висока концентрация от очакваната след лекарствена терапевтична доза.
Креатинин	15 mg/dL* Най-висока наблюдавана концентрация в популацията.
Триглицериди	1,5 g/dL* Най-висока наблюдавана концентрация в популацията.
EDTA	6 mg/ml Три пъти очакваната концентрация в кръвта, взета в EDTA епруветки.
Молекулярен клас етанол	15% v/v В елуата след извличане на ДНК.

*Съгласно CLSI EP37-ED1:2018

На едно интерфериращо вещество, 12 технически репликата са тествани чрез Illumina DNA Prep with Enrichment Dx анализ, обогатени с екзомен панел 1 (45 Mb) в единично (12-плексно) обогатяване и след това секвенирани върху инструмент NextSeq 550Dx с DNA GenerateFASTQ Dx модул.

За тестваните вещества, всички 12 проби отговарят на изискванията за работа на пробата и не се наблюдава интерференция в анализа.

Интерференция в FFPE тъкан

Две колоректални FFPE проби са тествани в присъствието и отсъствието на хемоглобин при 0,1 mg на 10 µm FFPE секция, за да представляват най-лошия сценарий за 50% FFPE тъканна проба замърсена с кръв с високо ниво на хемоглобин. Пробите са тествани чрез Illumina DNA Prep with Enrichment Dx анализ с помощта на панел за обогатяване с панкарцином 1 (1,94 Mb) като представителен панел в едноплексни обогатявания. След това обогатените библиотеки бяха секвенирани на инструмент NextSeq 550Dx с DNA GenerateFASTQ Dx модула. Всички проби отговарят на изискванията за характеристики на пробата и е доказано, че хемоглобинът не пречи на извършването на анализа.

За да се оценят смущенията, произтичащи от приготвянето на пробата, две екзогенни съединения са добавени в ДНК, извлечена от FFPE тъканна проба от рак на пикочния мехур. Екзогенните вещества, които са тествани, са екстракционни разтвори, често използвани по време на процеса на извличане на ДНК и са изброени с тествани количества в следната таблица.

Разтворите на тестваното вещество се предлагат в търговската мрежа в комплекти за изолиране на ДНК, въз основа на колона.

Таблица 9 Потенциално интерфериращи екзогенни вещества и концентрации, тествани във FFPE

Тестови субстанции	Тестова концентрация (µl / 30 µl елуат)
Разтвор за депарафинизация	113 x 10 ⁻⁶
Промиващ буфер AW2	0,417

На едно интерфериращо вещество, осем технически репликата са тествани чрез Illumina DNA Prep with Enrichment Dx анализ, обогатени с панел за обогатяване с панкарцином (1,94 Mb) в едноплексни обогатявания и след това секвенирани върху инструмент NextSeq 550Dx с DNA GenerateFASTQ Dx модул.

За двете тествани вещества, всички осем проби отговарят на изискванията за характеристики на пробата и не се наблюдава интерференция в анализа.

Кръстосано замърсяване

Клетъчна линия Coriell гДНК NA12878 (женски, 10 проби), Клетъчна линия Coriell гДНК NA12877 (мъжки, 12 проби) и без контроли на шаблони (NTC, 2 проби) са тествани чрез Illumina DNA Prep with Enrichment Dx анализ на плака във формата на шахматна дъска. Всички проби са използвали най-високата (1000 ng) препоръка за въвеждане на гДНК като най-строгото условие за оценка на кръстосаното замърсяване на пробата. Тестването е извършено два пъти от двама отделни оператори. Екзомен панел 1 (45 Mb) се

използва при 12-плексни реакции на обогатяване. Обогатените библиотеки са секвенирани на NextSeq 550Dx с DNA GenerateFASTQ Dx. Оценката е направена чрез оценяване на покритието на мъжката специфична Y-хромозома в женските проби чрез сравняване с фоновите нива на пълна плака от женски проби, както и индексното представяне на NTC пробите.

Таблица 10 Резултати от кръстосано замърсяване

Проби от жени с мъжко Y-хромозомно покритие при < 3x шум на базово ниво	Индексно представяне в NTC
100%	< 0,0005%

Функциониране на приложение за DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Работните характеристики приложението за NovaSeq 6000Dx на DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx са предоставени в *листовката на инструмента NovaSeq 6000Dx (документ № 200025276)*.

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx на NextSeq 550Dx предоставя същите работни потоци за вторичен анализ като приложението на NovaSeq 6000Dx, включително следните три работни процеса: Генериране на FASTQ, генериране на FASTQ и VCF за откриване на герминативни варианти и генериране на FASTQ и VCF за откриване на соматични варианти.

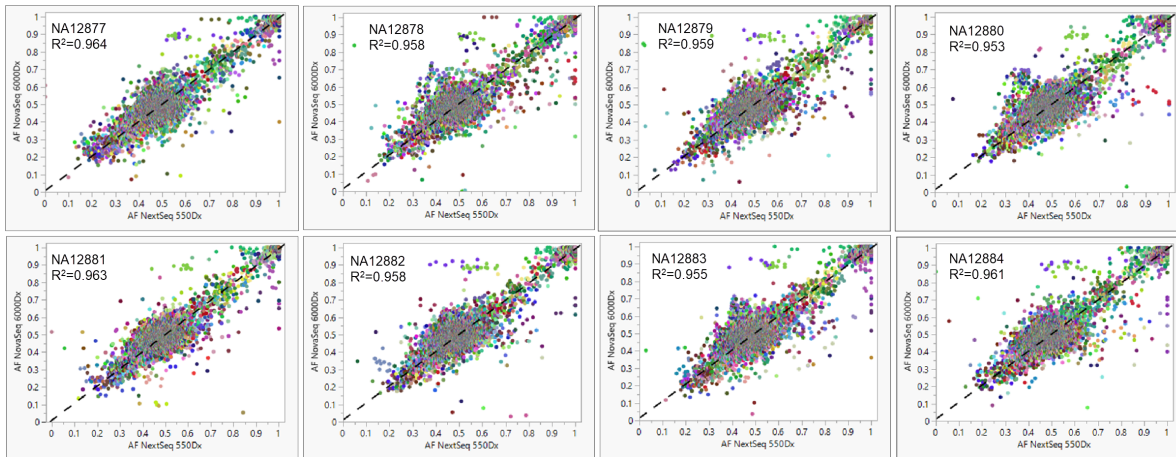
Сравнимите резултати от вторичния анализ са получени от една и съща библиотечна подготовка, секвенирана и на двете платформи. Честотата на откриване на варианти ([Таблица 11](#)) и съгласуването на честотата ([Фигура 1](#)) за проби от гДНК на клетъчна линия Coriell са оценени с помощта на представителен анализ, предназначен да изследва различни гени, покриващи 1 970 505 бази (9 232 цели) във всичките 23 човешки хромозоми. Тествани са осем ДНК проби от платинения геном, седем в репликати по шест (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) и една (NA12881) в репликати по пет (вижте [Фигура 1](#)). Библиотеките са секвенирани с по три изпълнявания на всеки от инструментите NovaSeq 6000Dx и NextSeq 550Dx и се извършва обозначаване на варианти с използване на генерирането на FASTQ и VCF за работен процес за анализ на герминативни варианти на DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx приложение.

Въз основа на силната корелация между ефективността на приложението на инструментите NovaSeq 6000Dx и NextSeq 550Dx, работните характеристики, свързани с вторичния анализ, предоставен в *Листовката за инструмент NovaSeq 6000Dx (документ № 200025276)*, също се определят като приложими за DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx за приложението NextSeq 550Dx.

Таблица 11 Ефективност на приложението – скорост на откриване на варианти за SNV, инсерции и делеции

Панел	Честота на откриване на варианти на NovaSeq 6000Dx	Честота на откриване на варианти на NextSeq 550Dx
Панел за пангеном (1,97 Mb, 9 232 цели, 23 Chr.)	99,9%	99,9%

Фигура 1 Сравнение на честотата на вариантите за NovaSeq 6000Dx и NextSeq 550Dx работи с DRAGEN за анализ на приложението IDPE Dx



Приложение: UD индекси на Illumina за адаптерни секвенции

Тези уникални индексни (UD) адаптери са разположени в плаката, за да се приложи препоръчителната стратегия за сдвояване. Индексните адаптери са с дължина 10 бази, вместо типичните осем бази.

Адаптери за индекс 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Адаптери за индекс 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Следната секвенция се използва за подрязване на адаптерите Read 1 (Разчитане 1) и Read 2 (Разчитане 2).

CTGTCTCTTATACACATCT

Индексни адаптери на плака A/комплект 1

Име на индекса	i7 основи в адаптер	i5 основи в адаптер
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT

Име на индекса	i7 основи в адаптер	i5 основи в адаптер
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTТААТ
UDP0009	СТАСТСАГТС	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	ТААТGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	СТААТГАТGG
UDP0019	СТААТГАТGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	ТААGGAAСGT
UDP0024	GTATGTAGAA	СТААСТGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	СТТАТGGAAТ
UDP0031	TGCGTGTСAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTСGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA

Име на индекса	i7 основи в адаптер	i5 основи в адаптер
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAAC TGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA

Име на индекса	i7 основи в адаптер	i5 основи в адаптер
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGACTAATG	TGACTACATA
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGGT	CTCATAGCGA
UDP0083	GTAAGGCATA	AGACACATTA
UDP0084	GTCCACTTGT	GCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	CATGAGTACT
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	CATGTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Индексни адаптери на плака Б/комплект 2

Име на индекса	i7 основи в адаптер	i5 основи в адаптер
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATCTTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT

Име на индекса	i7 основи в адаптер	i5 основи в адаптер
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GSTATCTCTA	TATAGATTCTG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA

Име на индекса	i7 основи в адаптер	i5 основи в адаптер
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	CGAAGGTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA

Име на индекса	i7 основи в адаптер	i5 основи в адаптер
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	СТААТГТСТТ
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	ТТАGGАТАGА
UDP0191	CAACATТСAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGТАCT

Хронология на редакциите

Документ	Дата	Описание на промяната
Документ № 200038118 в.00	Юли 2023 г.	<p>Първоначално издание.</p> <p>Предишен документ 200019584, заменен с този.</p> <p>Промени от документ 200019584 в.2 в този нов документ:</p> <ul style="list-style-type: none"> Добавено е съдържание, за да се подкрепи секвениране на апарата NextSeq 550Dx с използване на DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx приложение за NextSeq 550Dx. Не е предоставен списък с изяснени реагенти. Добавена е информация за докладване на честотата към Предупреждения и предпазни мерки. Очаквания за по-ясни библиотеки за обогатяване. Добавена е инструкция за приготвяне на 400 mM Tris-HCl, pH 8,0. Премахната печатна грешка в стъпката за подготовка на секвениране. <p>Промени, направени преди това в документ 200019584:</p> <ul style="list-style-type: none"> Добавено е съдържание за подкрепа на секвениране на инструмента NovaSeq 6000Dx. Добавени са имена на системи за секвениране и каталожни номера. Премахната е информация за уникално двойно индексирание за библиотеки с една индексация.

Патенти и търговски марки

Настоящият документ и съдържанието му са собственост на Illumina, Inc. и нейните филиали („Illumina“) и са предназначени само за употреба по силата на договор от страна на клиента и във връзка с използването на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ, и с никаква друга цел. Този документ и съдържанието му не трябва да се използват или разпространяват за никаква друга цел и/или по друг начин да бъдат съобщавани, разкривани или възпроизведени по какъвто и да е начин без предварителното писмено съгласие на Illumina. Illumina не предоставя посредством този документ никакъв лиценз за свой патент, търговска марка, авторско право или права по силата на общото право, нито подобни права на която и да е трета страна.

Инструкциите в този документ трябва да се следват строго и изрично от страна на квалифициран и правилно обучен персонал, за да се гарантират правилната и безопасната употреба на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ. Цялото съдържание на този документ трябва да бъде прочетено и разбрано напълно, преди да се използва(т) такъв(такива) продукт(и).

АКО ВСИЧКИ ИНСТРУКЦИИ, СЪДЪРЖАЩИ СЕ В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ, НЕ БЪДАТ НАПЪЛНО ПРОЧЕТИ И ИЗРИЧНО СПАЗВАНИ, ТОВА МОЖЕ ДА ДОВЕДЕ ДО ПОВРЕДА НА ПРОДУКТА(ИТЕ), НАРАНЯВАНЕ НА ЛИЦА, ВКЛЮЧИТЕЛНО НА ПОТРЕБИТЕЛИ ИЛИ ДРУГИ ЛИЦА, И УВРЕЖДАНЕ НА ДРУГО ИМУЩЕСТВО, И ЩЕ ОТМЕНИ ВСЯКАКВА ГАРАНЦИЯ, ПРИЛОЖИМА ЗА ПРОДУКТА(ИТЕ).

ILLUMINA НЕ ПОЕМА НИКАКВА ОТГОВОРНОСТ В РЕЗУЛТАТ НА НЕПРАВИЛНАТА УПОТРЕБА НА ПРОДУКТА(ИТЕ), ОПИСАН(И) В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ (ВКЛЮЧИТЕЛНО ТЕХНИ ЧАСТИ ИЛИ СОФТУЕР).

© 2023 Illumina, Inc. Всички права запазени.

Всички търговски марки са собственост на Illumina, Inc. или съответните си притежатели. За конкретна информация относно търговските марки вижте www.illumina.com/company/legal.html.

Информация за контакт



Illumina, Inc.

5200 Illumina Way

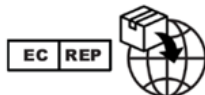
San Diego, California 92122, САЩ

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (извън Северна Америка)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



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

Спонсор в Австралия

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Австралия

Етикетиране на продукта

За пълна справка за символите, които може да се появяват на опаковката и етикетите на продукта, вижте легендата на символите за Вашия комплект на support.illumina.com в раздела *Документация*.