

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK. NUR FÜR DEN EXPORT.

## Verwendungszweck

Das Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit enthält Reagenzien und Verbrauchsmaterialien zur Vorbereitung von Probenbibliotheken aus genomischer DNA, die aus humanen Zellen und humanem Gewebe zur Entwicklung von *In-vitro*-Diagnose-Assays gewonnen wurde. Für die Vorbereitung von Bibliotheken werden vom Benutzer bereitgestellte Sondenpanels benötigt, die auf spezifische genomische Regionen von Interesse abzielen. Die generierten Probenbibliotheken sind für die Verwendung auf Sequenzierungssystemen von Illumina vorgesehen. Das Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx enthält Software für die Einrichtung, Überwachung und Analyse von Sequenzierungsläufen.

## Verfahrensprinzipien

Das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ist für die manuelle Vorbereitung von DNA-Sequenzierungsbibliotheken bestimmt, die für Zielregionen aus genomischer DNA aus menschlichen Zellen und Gewebe angereichert sind.

Für die Zielanreicherung sind vom Benutzer bereitgestellte biotinylierte Oligonukleotid-Panels erforderlich. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ist mit einer Reihe von Panelgrößen kompatibel, einschließlich kleiner Panels (< 20.000 Sonden) bis hin zu großen Panels (> 200.000 Sonden). Die generierten angereicherten Bibliotheken sind für die Sequenzierung auf Sequenzierungssystemen von Illumina vorgesehen.

Das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-Verfahren besteht aus den folgenden Schritten:

- **Taggmentierung genomischer DNA:** Verwendet Enrichment BLT Small (eBLTS) zur Taggmentierung der DNA-Zugabe. Bei der Taggmentierung wird die gDNA in einem einzigen Schritt fragmentiert und mit Adaptern getaggt. Für die Sättigung des eBLTS in der Taggmentierungsreaktion ist eine Mindestzugabe von 50 ng DNA erforderlich. Wenn der Sättigungsgrad erreicht ist, fragmentiert das eBLTS eine bestimmte Anzahl von DNA-Molekülen, um normalisierte Bibliotheken mit einheitlicher Fragmentgrößenverteilung zu erzeugen.
- **Reinigung nach der Taggmentierung:** Reinigt die mit Adapter-Tags versehene DNA auf dem eBLTS für die Verwendung bei der Amplifikation.
- **Amplifikation der taggmentierten DNA**— In diesem Schritt wird die taggmentierte DNA mit einem PCR-Programm mit begrenzten Zyklen amplifiziert. An den Enden der DNA-Fragmente werden eindeutige duale Indizes (UD) hinzugefügt, die eine zweifache eindeutige Barcodierung der DNA-Bibliotheken und eine Clusterbildung während der Sequenzierung ermöglichen.
- **Reinigung der Bibliotheken**— Verwendet ein Bead-Reinigungsverfahren zur Reinigung und Größenauswahl der amplifizierten DNA-Bibliotheken.
- **Pooling der Bibliotheken**— Kombiniert DNA-Bibliotheken mit eindeutigen Indizes in einem Pool von bis zu 12 Bibliotheken. Sie können Bibliotheken nach Volumen oder Masse poolen.

- **Hybridisierung von Sonden**— Besteht aus einer Hybridisierungsreaktion, bei der die doppelsträngigen DNA-Bibliotheken denaturiert werden und ein Panel an biotinylierten DNA-Sonden an die gewünschten Genomregionen hybridisiert wird.
  - Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ist mit mehreren Panels kompatibel. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit enthält kein Anreicherungspanel. Die Sonden-Panels werden vom Anwender geliefert und müssen die erforderlichen Spezifikationen erfüllen. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-Reagenzien sind mit DNA-Oligonukleotid-Panels von Illumina und von Drittanbietern kompatibel, sofern sie die erforderlichen Spezifikationen erfüllen. Informationen zu den Anforderungen an Panels von Drittanbietern finden Sie unter [Anforderungen an Anreicherungs sonden-Panels auf Seite 11](#)
- **Hybridisierte Sonden erfassen:** In diesem Schritt werden mit Magnetische Streptavidin-Beads (SMB3) biotinylierte Sonden erfasst, die an Zielregionen von Interesse hybridisiert wurden.
- **Amplifizieren angereicherter Bibliotheken:** Verwendet PCR zur Amplifikation der angereicherten Bibliotheken.
- **Reinigung amplifizierter angereicherter Bibliotheken:** Verwendet ein Bead-Reinigungsverfahren, um die angereicherten Bibliotheken für die Sequenzierung zu reinigen.
- **Sequenzierung:** Die Sequenzierung der angereicherten Bibliotheken wird auf MiSeqDx-, NextSeq 550Dx- oder NovaSeq 6000Dx-Sequenzierungssystemen durchgeführt. Beim MiSeqDx und NextSeq 550Dx wird das integrierte DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module für die Einrichtung von Sequenzierungsläufen, die Überwachung von Läufen und die FASTQ-Generierung aus Base-Calls verwendet. Beim NextSeq 550Dx mit DRAGEN Server und beim NovaSeq 6000Dx wird die DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application für die Laufkonfiguration und Sekundäranalyse mit mehreren verfügbaren Workflows verwendet.

## Einschränkungen des Verfahrens

- Für die *In-vitro*-Diagnostik.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ist kompatibel mit genomischer DNA aus menschlichen Zellen und menschlichem Gewebe.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ist mit doppelsträngigen gDNA-Zugaben von 50–1000 ng kompatibel. Bei Zugaben außerhalb dieser Schwellenwerte ist die Leistung nicht garantiert.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit enthält keine Reagenzien für die DNA-Extraktion. Die analytischen Testergebnisse, einschließlich Interferenztests, die in den [Leistungsmerkmale auf Seite 61](#) angegeben sind, wurden mit Vollblut und FFPE als repräsentative Probentypen mit repräsentativen DNA-Extraktionskits erzielt. Alle diagnostischen Tests, die für die Verwendung von Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-Reagenzien entwickelt wurden, erfordern eine vollständige Validierung aller Leistungsaspekte mit dem DNA-Extraktionskit der Wahl.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit wird nicht empfohlen für FFPE-Proben schlechter Qualität mit  $\Delta Cq > 5$ . Die Verwendung von Proben mit  $\Delta Cq > 5$  kann die Wahrscheinlichkeit eines Versagens der Bibliotheksvorbereitung erhöhen und die Assayleistung verringern.
- Die Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-Reagenzien wurden für die in der folgenden Tabelle angegebenen Probenzugaben, Anreicherungsreaktionen und Plexitäten konfiguriert und getestet.

<b>Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit</b>	<b>Probenzugabe</b>	<b>Anreicherungsreaktionen</b>	<b>Anreicherungsplexität</b>
16-Proben-Kit	Geringe Qualität (FFPE)	16 Reaktionen	1-Plex
96-Proben-Kit	Hohe Qualität (z. B. Vollblut)	8 Reaktionen	12-Plex

- Die Verarbeitung von FFPE-Zugaben wurde getestet und wird ausschließlich für 1-Plex-Anreicherungsreaktionen unter Verwendung des 16-Proben-Kits empfohlen.
- Für das 96-Proben-Kit sind nicht standardisierte Plexitäten (2-Plex bis 11-Plex) möglich, die jedoch die folgenden Einschränkungen aufweisen:
  - Die Verarbeitung von Proben in 2-Plex- bis 11-Plex-Anreicherungsreaktionen verringert den Durchsatz des Kits.
  - Optimale Ergebnisse sind nicht garantiert. Das Erzielen eines angemessenen Anreicherungsresultates für nicht standardmäßige Plexitäten kann zusätzliche Optimierungen erfordern.
  - Bei Pooling-Strategien mit geringer Plexität (2-Plex bis 8-Plex) ist die Auswahl von Indexadaptern mit unterschiedlichen Sequenzen erforderlich, um die Farbbalance für eine erfolgreiche Sequenzierung und Datenanalyse zu optimieren. Das DNA GenerateFASTQ Dx-Modul auf MiSeqDx und NextSeq 550Dx bietet Optionen für farbbalancierte Indexkombinationen während der Laufeinrichtung. Weitere Informationen zu Pooling-Strategien finden Sie unter [Pooling-Methoden auf Seite 36](#).
- Mit dem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit können nur angereicherte Bibliotheken zur Sequenzierung auf dem MiSeqDX, NextSeq 550Dx und NovaSeq 6000Dx bereitgestellt werden. Die Verwendung anderer Sequenzierungssysteme erfordert eine vollständige Validierung aller Leistungsaspekte.
- Anreicherungspanels sind nicht Bestandteil dieses Produkts. Die unter den [Leistungsmerkmale auf Seite 61](#) angegebenen analytischen Testergebnisse wurden mit repräsentativen Anreicherungspanels erzielt und dienen nur zu Informationszwecken. Die Kennwerte zur Analyseleistung dienen zur Veranschaulichung der allgemeinen Fähigkeiten des Assays und dienen nicht als Angabe bezüglich der Fähigkeiten oder Eignung in Bezug auf bestimmte Leistungsversprechen zum Assay. Jeder für die Verwendung mit diesen Reagenzien entwickelte Diagnosetest erfordert eine vollständige Validierung aller Leistungsmerkmale.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ist mit Anreicherungspanels von Illumina und von Drittanbietern kompatibel. Die Leistung von Anreicherungspanels von Drittanbietern, die die Anforderungen an Panels nicht erfüllen, kann jedoch nicht garantiert werden. Informationen zu den Anforderungen an Panels finden Sie unter [Anforderungen an Anreicherungs sonden-Panels auf Seite 11](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit verwendet eine Hybridisierungszeit von 2 Stunden. Die Verwendung einer längeren Hybridisierungszeit kann sich auf die Leistungskennzahlen auswirken.
- Die DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager-Module für MiSeqDx und NextSeq 550Dx liefern nur FASTQ-Dateien. Wenn Sie diese Module verwenden, müssen Sie eine sekundäre Analysevalidierung durchführen.
- Die DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application ist auf NextSeq 550Dx mit DRAGEN Server und NovaSeq 6000Dx verfügbar. Die Anwendung unterstützt mehrere sekundäre Analyseworkflows, einschließlich FASTQ-Generierung, FASTQ- und VCF-Generierung für die Keimbahn-Variantenerkennung und FASTQ- und VCF-Generierung für die Erkennung somatischer Varianten. Wenn Sie die Anwendung für die VCF-Generierung verwenden, müssen Sie keine sekundäre Analysevalidierung durchführen. Die Anwendung hat folgende Schwächen:
  - Insertionen der Länge > 18 bp und Deletionen der Länge > 21 bp wurden nicht überprüft.
  - Große Varianten wie Mehrfachnukleotidvarianten (MNV) und große Indels werden in der VCF-Ausgabedatei möglicherweise als separate kleinere Varianten aufgeführt.
  - Kleine MNV werden als separate Varianten in der VCF-Ausgabedatei aufgeführt.
  - Deletionen werden in der VCF-Datei an der Koordinate der vorhergehenden Base gemäß VCF-Format aufgeführt. Daher müssen benachbarte Varianten in Betracht gezogen werden, bevor ein individueller Base-Call als homozygote Referenz aufgeführt wird.
  - Keimbahn-spezifische Einschränkungen:
    - Der Germline FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Workflow der DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application ist darauf ausgelegt, qualitative Ergebnisse für das Calling von Keimbahnvarianten (z. B. homozygot, heterozygot, Wildtyp) zu liefern.
    - Kopienzahlvariation hat einen Einfluss darauf, ob eine Variante als homozygot oder heterozygot identifiziert wird.
    - Das System führt nicht mehr als zwei Varianten an einer einzigen Position auf, selbst bei Vorhandensein einer Kopienzahlvariation.
  - Spezifische Einschränkungen für somatische Varianten:
    - Der Somatic FASTQ- und VCF-Generierungsanalyse-Workflow der DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application ist darauf ausgelegt, qualitative Ergebnisse für das Calling von somatischen Varianten (d. h. Vorhandensein einer somatischen Variante) zu liefern.
    - Der Arbeitsablauf zur Generierungsanalyse von Somatic FASTQ und VCF kann nicht zwischen Keimbahn- und somatischen Varianten unterscheiden. Der Arbeitsablauf ist darauf ausgelegt,

Varianten über einen Bereich von Variantenhäufigkeiten hinweg zu erkennen. Jedoch können mit der Variantenhäufigkeit nicht die somatischen Varianten von Keimbahn-Varianten unterschieden werden.

- Normales Gewebe in der Probe beeinträchtigt den Nachweis von Varianten. Die gemeldete Nachweisgrenze basiert auf einer Variantenhäufigkeit bezogen auf die Gesamt-DNA, die aus dem Tumor und normalem Gewebe extrahiert wurde.
- Bei einem Call von mehr als einem Varianten-Allel am selben Locus wird keines der Allele als erfolgreiche Variante gemeldet. Stattdessen wird der vollständige Satz von Allelen aufgeführt, aber über das multiallelische Tag gefiltert.

## Produktkomponenten

Der Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit umfasst folgende Komponenten:

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, Katalog-Nr. 20051354 (16 Proben), oder Nr. 20051352 (96 Proben)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, Katalog-Nr. 20051355 (16 Proben) oder Nr. 20051353 (96 Proben)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module for NextSeq 550Dx, Katalog-Nr. 20063024
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module for MiSeqDx, Katalog-Nr. 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NovaSeq 6000Dx, Katalog-Nr. 20074609
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NextSeq 550Dx, Katalog-Nr. 20074730

## Bereitgestellte Reagenzien

Für die Durchführung des Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ist Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A oder Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B erforderlich. Sie können die folgende Anzahl von Bibliotheksvorbereitungs- und Anreicherungsreaktionen mit einem Kit für 16 oder 96 Proben durchführen.

<b>Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit</b>	<b>Probenzugabe</b>	<b>Anreicherungsreaktionen</b>	<b>Anreicherungsplexität</b>
16-Proben-Kit	Geringe Qualität (FFPE)	16 Reaktionen	1-Plex
96-Proben-Kit	Hohe Qualität (z. B. Vollblut)	8 Reaktionen	12-Plex

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

### Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, Lagerung bei 15 bis 30 °C

Die folgenden Reagenzien werden bei Raumtemperatur versandt. Lagern Sie die Reagenzien unverzüglich bei der angegebenen Lagertemperatur, um eine einwandfreie Funktion zu gewährleisten.

Name des Reagenzes	Röhrchenmenge		Verschlussfarbe	Füllvolumen	Erläuterung
	16 Proben (Nr. 20050020)	96 Proben (Nr. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Rot	350 µl	Reinigungslösung in Wasser.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Grün	41 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Reinigungsmittel und Salz.
Cleanup Beads (CB)	1	n. z.*	Rot	10 ml	Festphasige paramagnetische Beads in gepufferter wässriger Lösung.

\* Cleanup Beads für 96 Proben sind in Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Proben (Nr. 20050030) enthalten.

### Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 Proben), Lagerung bei 15 bis 30 °C

Bei Kits mit 96 Proben sind Cleanup Beads in den Illumina Prep Dx Cleanup Beads (Katalog-Nr. 20050030) enthalten. Das folgende Reagenz wird bei Raumtemperatur versandt. Lagern Sie die Reagenzien unverzüglich bei der angegebenen Lagertemperatur, um eine einwandfreie Funktion zu gewährleisten. Bei Kits mit 16 Proben sind Cleanup Beads in den Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (Katalog-Nr. 20050020) enthalten.

Name des Reagenzes	Menge	Verschlussfarbe	Füllvolumen	Erläuterung
Cleanup Beads (CB)	4	Rot	10 ml	Festphasige paramagnetische Beads in gepufferter wässriger Lösung.

### Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 2, Lagerung bei 2 bis 8 °C

Die folgenden Reagenzien werden gekühlt versandt. Lagern Sie die Reagenzien unverzüglich bei der angegebenen Lagertemperatur, um eine einwandfreie Funktion zu gewährleisten. Bewahren Sie das eBLTS-Röhrchen aufrecht auf, sodass die Beads immer in den Puffer eingetaucht sind.

Name des Reagenzes	Röhrchenmenge		Verschlussfarbe	Füllvolumen		Erläuterung
	16 Proben (Nr. 20050021)	96 Proben (Nr. 20050026)		16 Proben n	96 Proben n	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Gelb	200 µl	290 µl	Magnetische Streptavidin-Beads, die mit Transposomen in gepuffert wässriger Lösung verbunden sind, die Glycerin, EDTA, Dithiothreitol, Salz und Reinigungsmittel enthält.
Resuspensionspuffer (RSB)	1	4	Transparent	1,8 ml	1,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung.

### Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, Lagerung bei -25 bis -15 °C

Folgende Reagenzien werden in gefrorenem Zustand geliefert. Lagern Sie die Reagenzien unverzüglich bei der angegebenen Lagertemperatur, um eine einwandfreie Funktion zu gewährleisten.

Name des Reagenzes	Röhrchenmenge		Verschlussfarbe	Füllvolumen		Erläuterung
	16 Proben (Nr. 20050022)	96 Proben (Nr. 20050027)		16 Proben n	96 Proben n	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Transparent	290 µl	290 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Magnesiumsalz und Dimethylformamid.

Name des Reagenzes	Röhrchenmenge		Verschlussfarbe	Füllvolumen		Erläuterung
	16 Proben (Nr. 20050022)	96 Proben (Nr. 20050027)		16 Proben	96 Proben	
Verbesserte PCR-Mischung (EPM)	2	4	Transparent	200 µl	610 µl	DNA-Polymerase und dNTPs in gepufferter wässriger Lösung.

### Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 Proben), Lagerung bei 2 bis 8 °C

Bei Kits mit 16 Proben sind die folgenden Reagenzien in Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (Katalognummer 20050023) enthalten. Bei Kits mit 96 Proben sind die folgenden Reagenzien in Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (Katalognummer 20050028) enthalten.

Die folgenden Reagenzien werden gekühlt versandt. Lagern Sie die Reagenzien unverzüglich bei der angegebenen Lagertemperatur, um eine einwandfreie Funktion zu gewährleisten.

Name des Reagenzes	Röhrchenmenge	Verschlussfarbe	Füllvolumen	Erläuterung
Magnetische Streptavidin-Beads (SMB3)	4	Transparent	1,2 ml	Magnetische Streptavidin-Beads in gepufferter wässriger Lösung mit Formamid, Reinigungsmittel und Salz.
Resuspensionspuffer (RSB)	1	Transparent	1,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Transparent	200 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Reinigungsmittel und Salz.
Elutions-Targetpuffer 2 (ET2)	1	Transparent	200 µl	Gepufferte wässrige Lösung.



**Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 Proben), Lagerung bei 2 bis 8 °C**

Für Kits mit 96 Proben sind die folgenden Reagenzien in den Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (Katalognummer 20050028) enthalten. Für Kits mit 16 Proben sind die Reagenzien in den Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (Katalognummer 20050023) enthalten.

Die folgenden Reagenzien werden gekühlt versandt. Lagern Sie die Reagenzien unverzüglich bei der angegebenen Lagertemperatur, um eine einwandfreie Funktion zu gewährleisten.

Name des Reagenzes	Röhrchenmenge	Verschlussfarbe	Füllvolumen	Erläuterung
Magnetische Streptavidin-Beads (SMB3)	2	Transparent	1,2 ml	Magnetische Streptavidin-Beads in gepufferter wässriger Lösung mit Formamid, Reinigungsmittel und Salz.
Resuspensionspuffer (RSB)	4	Transparent	1,8 ml	Gepufferte wässrige Lösung.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Transparent	200 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Reinigungsmittel und Salz.
Elutions-Targetpuffer 2 (ET2)	1	Transparent	200 µl	Gepufferte wässrige Lösung.

**Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, Lagerung bei -25 bis -15 °C**

Folgende Reagenzien werden in gefrorenem Zustand geliefert. Lagern Sie die Reagenzien unverzüglich bei der angegebenen Lagertemperatur, um eine einwandfreie Funktion zu gewährleisten.

Name des Reagenzes	Röhrchenmenge		Verschlussfarbe	Füllvolumen	Erläuterung
	16 Proben (Nr. 20050024)	96 Proben (Nr. 20050029)			
Anreicherungs-elutionspuffer 1 (EE1)	1	1	Transparent	580 µl	Reinigungslösung in Wasser.

Name des Reagenzes	Röhrchenmenge		Verschlussfarbe	Füllvolumen	Erläuterung
	16 Proben	96 Proben			
	n (Nr. 20050024)	n (Nr. 20050029)			
Verbesserter Anreicherungs- waschpuffer (EEW)	4	4	Gelb	4,1 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Salz und Reinigungsmittel.
PCR-Primer-Cocktail (PPC)	1	1	Transparent	320 µl	PCR-Primer (Oligonukleotide)-Mischung.
2 N NaOH (HP3)	1	1	Transparent	200 µl	2N Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung.
79HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Blau	480 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Cot-1-DNA, Crowding Agent und Formamid
Verbesserte PCR-Mischung (EPM)	2	1	Transparent	200 µl	DNA-Polymerase und dNTPs in gepufferter wässriger Lösung.

### Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, Lagerung bei -25 bis -15 °C

Folgende Reagenzien werden in gefrorenem Zustand geliefert. Lagern Sie die Reagenzien unverzüglich bei der angegebenen Lagertemperatur, um eine einwandfreie Funktion zu gewährleisten. Informationen zu Indexadaptersequenzen finden Sie unter [Anhang: Illumina UD Indizes-Adaptersequenzen auf Seite 66](#).

Komponente	Menge
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Indizes), Nr. 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Indizes), Nr. 20050039	1

# Nicht bereitgestellte Reagenzien

## Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Reagenzien

- Reagenzien zur DNA-Extraktion und -Reinigung
- Reagenzien für die DNA-Quantifizierung
- Ethanol (200 Proof, für die Molekularbiologie)
- Nukleasefreies Wasser
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 1N NaOH-Lösung, in Molekularbiologie-Qualität
- Bei Verwendung eines NextSeq 550Dx-Sequenziersystems:
  - 200 mM Tris, pH 7,0 (verdünntbar aus 1 M Tris-HCl, pH 7,0)
  - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen) (Katalog-Nr. 20028871)
- Bei Verwendung eines MiSeqDx-Sequenziersystems:
  - MiSeqDx Reagent Kit v3 (Katalog-Nr. 20037124)
- Bei Verwendung eines NovaSeq 6000Dx-Sequenziersystems:
  - 400 mM Tris, pH 8,0 (verdünntbar aus 1 M Tris-HCl, pH 8,0)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 Zyklen) (Katalog-Nr. 20046931)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 Zyklen) (Katalog-Nr. 20046933)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (Katalog-Nr. 20062292)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (Katalog-Nr. 20062293)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube (Katalog-Nr. 20062290)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube, Packung mit 24 Stück (Katalog-Nr. 20062291)

## Anforderungen an Anreicherungs sonden-Panels

Die Reagenzien des Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sind sowohl mit Oligonukleotid-DNA-Anreicherungspanels von Illumina als auch mit solchen von Drittanbietern kompatibel. Wenn Sie biotinylierte DNA-Sonden von Drittanbietern verwenden (feste oder benutzerdefinierte Panels), vergewissern Sie sich, dass diese den erforderlichen Spezifikationen entsprechen.

Das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit wurde anhand der folgenden Spezifikationen von Drittanbieter-Panels optimiert und validiert. Eine vergleichbare Leistung kann nicht garantiert werden, wenn Panels von Drittanbietern verwendet werden, die nicht den Spezifikationen entsprechen.

- 80 bp oder 120 bp Sondenlänge
- Zwischen 500 und 675.000 Sonden
- Einzel- oder Doppelstrang-DNA
- Gesamtsondenzugabe von  $\geq 3$  pmol für die Anreicherung bei Plexitäten von 1-Plex bis 12-Plex

## Lagerung und Handhabung

- Die Raumtemperatur ist mit 15 bis 30 °C definiert.
- Die Reagenzien sind bis zu dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, wenn sie wie angegeben gelagert werden. Die Lagertemperaturen finden Sie unter [Bereitgestellte Reagenzien auf Seite 5](#).
- Die gefrorenen Reagenzien bleiben über maximal vier Gefrier-/Auftauzyklen, die vor dem angegebenen Verfallsdatum erfolgen, stabil.
- Das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-Verfahren enthält die folgenden sicheren Haltepunkte:
  - Nach dem [Amplifizieren von tagmentierter DNA auf Seite 31](#) sind die amplifizierten Bibliotheken bis zu 30 Tage lang stabil, wenn sie bei -25 bis -15 °C gelagert werden.
  - Nach der [Reinigung der Bibliotheken auf Seite 33](#) sind die gereinigten amplifizierten Bibliotheken bis zu 30 Tage lang stabil, wenn sie bei -25 bis -15 °C gelagert werden.
  - Nach dem [Pooling vorangereicherter Bibliotheken auf Seite 35](#) sind die gepoolten Bibliotheken bis zu 30 Tage lang stabil, wenn sie bei -25 bis -15 °C gelagert werden.
  - Nach der [Amplifikation der angereicherten Bibliothek auf Seite 47](#) kann die Platte mit den angereicherten, amplifizierten Bibliotheken bis zu 24 Stunden auf dem Thermocycler verbleiben. Alternativ kann die Platte bis zu 48 Stunden bei 2 bis 8 °C gelagert werden.
  - Die endgültigen gereinigten und angereicherten Bibliotheken sind bis zu 7 Tage lang stabil, wenn sie bei -25 bis -15 °C gelagert werden.
- Sollte die Verpackung oder der Inhalt des Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit beschädigt oder beeinträchtigt sein, wenden Sie sich an den Kundendienst von Illumina.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) kann sichtbare Ausfällungen oder Kristalle bilden. Werden Ausfällungen beobachtet, 10 Minuten lang bei 37 °C erhitzen und dann vortexen, bis die Ausfällungen aufgelöst sind.
- Hybridisierungs-Oligos (HYB) und Verbesserter Anreicherungs Waschpuffer (EEW) müssen auf die gleiche Temperatur vorgeheizt werden wie die für den Probenotyp und das Sondenfeld geltende Hybridisierungshaltetemperatur. Weitere Informationen zum Umgang mit NHB2 und EEW finden Sie unter [Verfahrenshinweise auf Seite 18](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) und HYB Buffer+IDT NXT Blocker (NHB2) können Kristalle und Trübungen bilden. Wenn Kristalle und Trübungen beobachtet werden, vortexen oder mit der Pipette auf und ab bewegen, bis die Lösung klar ist. Stellen Sie sicher, dass Sie NHB2 vor dem Pipettieren vorwärmen.
- Bei der Handhabung von Cleanup Beads (CB) sollten Sie die folgenden bewährten Praktiken anwenden:

- Frieren Sie Beads niemals ein.
- Mischen Sie die Beads unmittelbar vor der Verwendung mit dem Vortexmischer, bis sie resuspendiert sind und die Farbe homogen erscheint.
- Bei der Handhabung von Enrichment BLT Small (eBLTS) sollten Sie die folgenden bewährten Praktiken anwenden:
  - Lagern Sie das eBLTS-Röhrchen aufrecht, sodass die Beads immer in den Puffer getaucht sind.
  - eBLTS gründlich vortexen, bis die Beads resuspendiert sind. Um ein erneutes Absetzen der Beads zu vermeiden, wird eine Zentrifugation vor dem Pipettieren nicht empfohlen.
  - Wenn die Beads an der Seite oder an der Oberseite einer 96-Well-Platte haften, 3 Sekunden lang bei  $280 \times g$  zentrifugieren und dann zum Resuspendieren pipettieren.
- Beachten Sie bei der Handhabung von Indexadapterplatten die folgenden bewährten Praktiken:
  - Geben Sie keine Proben in die Indexadapterplatte.
  - Jedes Well der Indexplatte darf nur einmal verwendet werden.

## Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Geräte und Materialien

Vergewissern Sie sich vor dem Starten des Protokolls, dass Sie neben dem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit auch über die erforderlichen Geräte und Materialien verfügen.

### Ausrüstung

Stellen Sie vor dem Starten des Protokolls sicher, dass Sie über die erforderlichen Geräte verfügen.

Das Protokoll wurde unter Verwendung von Elementen mit den aufgeführten Spezifikationen optimiert und validiert. Eine vergleichbare Leistung kann nicht garantiert werden, wenn Geräte verwendet werden, die nicht den Spezifikationen entsprechen.

Einige Elemente sind nur für bestimmte Workflows erforderlich. Diese Elemente sind in separaten Tabellen aufgeführt.

- Thermocycler mit den folgenden Spezifikationen:
  - Beheizbarer Deckel
  - Einstellbarer Temperaturbereich von mindestens 10 bis 98 °C
  - Minimale Temperaturgenauigkeit von  $\pm 0,25$  °C
  - Maximales Reaktionsvolumen von 100  $\mu$ l
  - Kompatibel mit 96-Well-PCR-Vollrahmenplatten
- Mikroproben-Inkubator mit den folgenden Spezifikationen:
  - Temperaturbereich Umgebungstemperatur plus 5,0 bis 99,0 °C

- Kompatibel mit 96-Well-MIDI-Platten
- Mikroproben-Inkubatoreinsätze, kompatibel mit 96-Well-MIDI-Platten
- Hochgeschwindigkeits-Mikroplattenschüttler mit einem Mischgeschwindigkeitsbereich von 200–3000 U/min
- Magnetstativ, kompatibel mit 96-Well-PCR-Platten
- Magnetstativ, kompatibel mit 96-Well-MIDI-Platten
- Fluorometer kompatibel mit Ihrem Quantifizierungsverfahren
- DNA-Fragmentanalysator
- Präzisionspipetten:
  - Einkanal- und Mehrkanalpipetten, 10 µl
  - Einkanal- und Mehrkanalpipetten, 20 µl
  - Einkanal- und Mehrkanalpipetten, 200 µl
  - Einkanalpipetten, 1.000 µl
  - Die Verwendung von Präzisionspipetten gewährleistet eine genaue Reagenz- und Probenabgabe. Sie können Einkanal- oder Mehrkanalpipetten verwenden, wenn diese regelmäßig kalibriert werden und ihre Genauigkeit innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens liegt.
- Mikroplattenzentrifuge
- Mikrozentrifuge
- Eines der folgenden Sequenziersysteme von Illumina:
  - MiSeqDx-Gerät, Katalog-Nr. DX-410-1001
  - NextSeq 550Dx-Gerät, Katalognr. 20005715 mit optionalem Illumina DRAGEN Server für NextSeq 550Dx, Katalognr. 20086130
  - NextSeq 6000Dx-Gerät, Katalog-Nr. 20068232
- [Optional] Vakuumkonzentrator
- [FFPE] Echtzeit-PCR-Nachweissystem

## Materialien

Stellen Sie vor dem Starten des Protokolls sicher, dass Sie über die erforderlichen Materialien verfügen.

Einige Elemente sind nur für bestimmte Workflows erforderlich. Diese Elemente sind in separaten Tabellen aufgeführt.

Das Protokoll wurde unter Verwendung der aufgeführten Elemente optimiert und validiert. Bei Verwendung alternativer Materialien ist eine vergleichbare Leistung nicht gewährleistet.

- Gefilterte Pipettenspitzen
- Konische Zentrifugenröhrchen, 15 ml oder 50 ml

- Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml
- Einweg-Mehrkanal-Reagenzienbehälter, RNase/DNase-frei
- 8-fach-Röhrchenstreifen und Deckel, RNase/DNase-frei
- Serologische Pipetten
- 96-Well-Lagerplatte, Polypropylen, tiefes Well, 0,8 ml (MIDI-Platte)
- 96-Well-PCR-Vollrahmenplatten, harte Schale
- [FFPE] qPCR-Platten kompatibel mit qPCR-Gerät
- Selbsthaftende Verschlussfolie für 96-Well-Platten mit den folgenden Spezifikationen:
  - Abziehbares, optisch klares Polyester
  - Geeignet für PCR-Platten mit Rahmen
  - Starker Klebstoff, der wiederholten Temperaturänderungen zwischen -40 °C und 110 °C widersteht
  - DNase-/RNase-frei
- Kunststoff-Verbrauchsmaterialien, die mit dem gewählten Quantifizierungsverfahren kompatibel sind
- Fluorometrisches dsDNA-Quantifizierungskit, das mit dem gewählten Quantifizierungssystem kompatibel ist:
  - Für die Quantifizierung vorangereicherter amplifizierter Bibliotheken kann ein Breitband-Quantifizierungskit verwendet werden.
  - Für die Quantifizierung angereicherter Bibliotheken hängt der Bereich des Quantifizierungskits vom verwendeten Sondenpanel ab.
- Fragmentanalyse-Kit für die Bibliotheksqualifizierung mit dem gewählten Qualifizierungssystem:
  - Für die Qualifizierung vorangereicherter, amplifizierter Bibliotheken kann ein Breitband-Kit verwendet werden.
  - Für die Qualifizierung angereicherter Bibliotheken hängt der Bereich des Qualifizierungskits vom verwendeten Sondenpanel ab.
- [Optional] Kit für die DNA-Extraktion aus menschlichen Zellen und Gewebe. Sie können hierfür ein beliebiges validiertes Extraktionsverfahren verwenden.

## Erfassen, Transportieren und Lagern von Proben



### VORSICHT

Behandeln Sie alle Proben wie potenzielle Infektionserreger.

- Dieser Assay ist kompatibel mit genomischer DNA aus menschlichen Zellen und Gewebe.

- Bei handelsüblicher gereinigter gDNA ist darauf zu achten, dass die Proben unter den richtigen Bedingungen transportiert und gemäß den Anweisungen des Herstellers gelagert wurden. Befolgen Sie die bewährten Verfahren für die Lagerung und die Gefrier-/Auftauzyklen der gDNA.
- Befolgen Sie bei der Zugabe von Vollblut die Anforderungen an die Blutentnahme, den Transport und die Lagerung, die für die gewählte DNA-Extraktionsmethode gelten. Sie können hierfür ein beliebiges validiertes Extraktionsverfahren verwenden. Der Transport von Vollblut muss allen geltenden regionalen, nationalen und lokalen gesetzlichen Bestimmungen für den Transport von Infektionserregern entsprechen.
- Für die Extraktion von DNA aus FFPE-Gewebe kann jede validierte Extraktionsmethode verwendet werden. Befolgen Sie die Anweisungen und Empfehlungen, die für die gewählte Extraktionsmethode gelten, um die folgenden Praktiken zu bestimmen:
  - Formalinfixierung und Paraffineinbettung der Gewebe, um die beste Qualität der extrahierten DNA zu gewährleisten.
  - Lagerung von FFPE-Proben.
  - Die Anforderungen an das Ausgangsmaterial, wie z. B. die Anzahl und Dicke der FFPE-Abschnitte. Die meisten Reinigungsmethoden empfehlen die Verwendung frisch geschnittener Schnitte.

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Personen können sich durch Einatmen, orale Aufnahme oder durch den Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Tragen Sie eine dem Expositionsrisiko entsprechende Schutzausrüstung, insbesondere Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Weitere umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS) unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- Melden Sie schwerwiegende Vorkommnisse in Zusammenhang mit diesem Gerät unmittelbar an Illumina und die zuständigen Behörden des Mitgliedslandes, in dem sich Anwender und Patient befinden.
- Handhaben Sie alle Blutproben so, als wären sie mit HIV (Humanes Immundefizienzvirus), HBV (Humanes Hepatitis-B-Virus) und anderen über das Blut übertragenen Erregern infiziert (allgemein gültige Vorsichtsmaßnahmen).
- Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Benutzen Sie zum Pipettieren nicht den Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Kit-Reagenzien Einweg-Handschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach dem Umgang mit Proben und Kit-Reagenzien gründlich die Hände.
- Um den Abbau von Proben oder Reagenzien zu verhindern, stellen Sie sicher, dass alle Natriumhypochloritdämpfe der Reinigungslösung vollständig verflüchtigt sind, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen.



- Die Kontamination der Proben mit anderen PCR-Produkten/Amplikons kann zu ungenauen und unzuverlässigen Ergebnissen führen. Um eine Kontamination zu vermeiden, sollten Sie die folgenden bewährten Praktiken anwenden:
  - Wenden Sie korrekte Laborpraktiken und Laborhygiene an.
  - Führen Sie die Arbeitsschritte im vorgesehenen Vor- bzw. Nachamplifikationsbereich aus.
  - Lagern Sie gebrauchte Reagenzien vor der Reinigung der Bibliotheken in einem Voramplifikationsbereich.
  - Trennen Sie die Reagenzien für die Voramplifikation von denen für die Nachamplifikation.
  - Stellen Sie sicher, dass die Voramplifikations- und Nachamplifikationsbereiche über dafür vorgesehene Gerätschaften, wie z. B. Pipetten, Pipettenspitzen, Vortexer und Zentrifuge, verfügen.
- Vermeiden Sie eine Kreuzkontaminierung. Verwenden Sie nach jeder Probe und nach der Abgabe von Reagenzien jeweils frische Pipettenspitzen. Die Verwendung von gefilterten Spitzen verringert das Risiko einer Amplikon-Verschleppung und einer Kreuzkontaminierung von Probe zu Probe.
  - Wechseln Sie beim Hinzufügen oder Übertragen von Proben oder Reagenzien-Mastermixes die Spitzen zwischen den einzelnen Proben.
  - Wenn Sie Indexadapter mit einer Mehrkanalpipette hinzufügen, wechseln Sie die Spitzen zwischen jeder Reihe oder Spalte. Wenn Sie eine Einkanalpipette verwenden, wechseln Sie die Spitzen zwischen den einzelnen Proben.
  - Entfernen Sie nicht verwendete Index-Adapterplatten aus dem Arbeitsbereich.
- Wenden Sie die folgenden bewährten Praktiken für die Ethanol-Waschschritte an:
  - Bereiten Sie stets frisches 80%iges Ethanol zu. Ethanol kann Wasser aus der Luft aufnehmen, was die Ergebnisse verfälschen kann.
  - Stellen Sie sicher, dass während der Waschlaufschritte das gesamte Ethanol vom Boden der Wells entfernt wird. Ethanolreste können die Ergebnisse beeinträchtigen.
  - Halten Sie die angegebene Trockenzeit für Magnetstativ-Schritte ein, um eine vollständige Verdunstung sicherzustellen. Ethanolreste können den Ablauf nachfolgender Reaktionen beeinträchtigen.
- Bereiten Sie Mastermixe immer vor der Verwendung vor und lagern Sie die kombinierten Arbeitslösungen niemals.
- Die Leistung des Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kann nicht garantiert werden, wenn die Verfahren nicht wie in der Packungsbeilage beschrieben befolgt werden.
- Verwenden Sie Kit-Komponenten nicht mehr nach dem auf dem Etikett des Kits angegebenen Verfallsdatum.
- Tauschen Sie Kit-Komponenten aus unterschiedlichen Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-Kits nicht gegeneinander aus. Das Kit ist auf dem Etikett angegeben.

# Verfahrenshinweise

## Empfehlungen für DNA-Zugaben

Das Protokoll des Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ist kompatibel mit hochwertigen, doppelsträngigen genomischen DNA-Zugaben (gDNA) von 50–1000 ng.

Stellen Sie sicher, dass die ursprüngliche gDNA-Probe nicht > 1 mM EDTA enthält und frei von organischen Verunreinigungen, wie Phenol und Ethanol, ist. Diese Substanzen können die Tagmentierungsreaktion stören und zu einem Assay-Fehler führen.

### gDNA-Zugabe $\geq$ 50 ng

Für gDNA-Zugaben zwischen 50–1000 ng ist die Quantifizierung und Normalisierung der ursprünglichen gDNA-Probe nicht erforderlich.

### gDNA-Zugabe < 50 ng

DNA-Zugaben von 10–50 ng können mit den folgenden Anpassungen verwendet werden:

- Bei Verwendung von 10–49 ng gDNA-Zugabe wird die Quantifizierung der ursprünglichen gDNA-Probe empfohlen, um die Anzahl der nach der Tagmentierung erforderlichen PCR-Zyklen zu bestimmen. Verwenden Sie ein fluorometrisches Verfahren zur Quantifizierung von doppelsträngiger gDNA-Zugabe. Vermeiden Sie Verfahren zur Messung der gesamten Nukleinsäure, wie NanoDrop oder andere UV-Absorptionsverfahren.
- Dieses Protokoll normalisiert nicht die endgültigen Ergebnisse der vorangereicherten Bibliothek von 10–49 ng gDNA. Daher ist eine Quantifizierung und Normalisierung der Bibliotheken vor und nach der Anreicherung erforderlich.
- Das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit wurde für DNA-Zugaben von 50–1000 ng charakterisiert und verifiziert. Für gDNA-Zugaben < 50 ng kann eine gleichwertige Produktleistung nicht garantiert werden.

## Empfehlungen für Blutzugaben

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ist kompatibel mit gDNA, die aus peripherem Vollblut extrahiert wird. Sie können hierfür ein beliebiges validiertes Extraktionsverfahren verwenden. Bei der Extraktion von gDNA aus Vollblut ist eine anfängliche Quantifizierung der Input-DNA nicht erforderlich, und das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit erzeugt normalisierte, vorangereicherte Bibliotheksergebnisse.

Folgende Faktoren können die aus Vollblutproben gewonnene Menge an DNA und damit die Bibliotheksnormalisierung beeinträchtigen:

- Alter der Blutprobe
- Lagerbedingungen
- Zugrundeliegende Erkrankungen, die sich auf die Anzahl der weißen Blutkörperchen auswirken

## Empfehlungen für FFPE-Gewebeprobenzugaben

Verwenden Sie folgende FFPE-DNA-Qualitätskriterien, um die geeignete Zugabe für eine erfolgreiche Bibliothekspräparation zu bestimmen:

- Für FFPE-Proben mit einem  $\Delta Cq$ -Wert von  $\leq 5$  beträgt die empfohlene DNA-Zugabe 50–1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx wird nicht empfohlen für FFPE-Proben schlechter Qualität mit  $\Delta Cq > 5$ . Die Verwendung von Proben mit  $\Delta Cq > 5$  ist möglich, kann aber die Wahrscheinlichkeit eines Versagens der Bibliotheksvorbereitung erhöhen oder die Assayleistung verringern.

### FFPE-Extraktion

Verwenden Sie ein Nukleinsäure-Isolationsverfahren, das hohe Verwertungsergebnisse erzielt, den Probenverbrauch minimiert und die Integrität der Probe bewahrt. Sie können jedes validierte Verfahren zur DNA-Extraktion aus FFPE-Proben verwenden. Für aus FFPE-Gewebe extrahierte gDNA ist eine anfängliche Quantifizierung der Input-DNA erforderlich, und das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit erzeugt keine normalisierten vorangereicherten Bibliotheksergebnisse.

### FFPE-DNA-Qualifizierung

Die aus FFPE-Gewebe extrahierte gDNA muss vor Verwendung qualifiziert werden. Für eine optimale Leistung muss die Qualität der DNA-Probe mit einem validierten Extraktionsverfahren für die Qualifizierung der aus FFPE-Proben extrahierten DNA bewertet werden. Das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Protokoll ist mit FFPE-DNA-Proben mit einem  $\Delta Cq$ -Wert von  $\leq 5$  kompatibel. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit wird nicht für FFPE-Proben schlechter Qualität mit  $\Delta Cq > 5$  empfohlen. Die Verwendung von Proben mit  $\Delta Cq > 5$  ist möglich, kann aber die Wahrscheinlichkeit eines Versagens der Bibliotheksvorbereitung erhöhen oder die Assayleistung verringern.

### [Optional] FFPE-Referenzproben

Verwenden Sie charakterisierte Referenzmaterialien wie z. B. Horizon HD799 (DNA) als Positivkontrolle bei der Durchführung des Protokolls. Qualifiziertes FFPE-Material von Xenotransplantaten, die von Zelllinien stammen, kann ebenfalls als Referenzproben verwendet werden. Verwenden Sie ein fluorometrisches Verfahren, um die Referenzmaterialien vor der Verwendung zu quantifizieren.

**HINWEIS** Das Ausführen eines Laufs mit einer positiven Kontrollreferenzprobe oder einer Negativkontrolle verbraucht Reagenzien und reduziert die Gesamtzahl der unbekanntenen Proben, die verarbeitet werden können.

## Empfehlungen für Probenzugaben

Die Empfehlungen für Probenzugaben für das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 1 Empfehlungen für Probenzugaben

Art der Probenzugabe	Menge der Probenzugabe	Quantifizierung der DNA-Zugabe erforderlich	Erforderliche Qualität der DNA-Zugabe	Normalisierte vorangereicherte Bibliotheksergebnisse
gDNA	10–49 ng	Ja	Verhältnis 260/280 von 1,8–2,0	Nein
gDNA	50–1000 ng	Nein	Verhältnis 260/280 von 1,8–2,0	Ja
gDNA aus Blut	50–1000 ng	Nein	Verhältnis 260/280 von 1,8–2,0	Ja
gDNA aus FFPE	50–1000 ng	Ja	$\Delta$ Cq-Wert von $\leq 5$	Nein

Die empfohlenen PCR-Zyklen für das eBLTS-PCR-Programm werden auf der Grundlage der Konzentration und Qualität der Probenzugabe angepasst. Weitere Informationen finden Sie unter [Amplifizieren von tagmentierter DNA auf Seite 31](#).

## Tipps und Techniken

### Vermeiden einer Kreuzkontamination

- Wechseln Sie beim Hinzufügen oder Übertragen von Proben die Spitzen zwischen den *einzelnen Proben*.
- Wenn Sie Indexadapter mit einer Mehrkanalpipette hinzufügen, wechseln Sie die Spitzen zwischen *jeder Reihe* oder *Spalte*. Wenn Sie eine Einkanalpipette verwenden, wechseln Sie die Spitzen zwischen den einzelnen Proben.

### Versiegeln der Platte

- Versiegeln Sie die 96-Well-Platte immer mit einer neuen selbsthaftenden Verschlussfolie unter Verwendung eines Gummirollers, um die Platte vor den folgenden Schritten des Protokolls abzudecken:
  - Schüttel-Schritte
  - Inkubations-Schritte (Wird die Platte nicht ordnungsgemäß verschlossen, kann es zu Verdunstung während der Inkubation kommen).
  - Zentrifugierschritte
  - Hybridisierungs-Schritte
- Stellen Sie sicher, dass die Ränder und Wells vollständig versiegelt sind, um das Risiko für Kreuzkontamination und Verdunstung zu verringern.
  - Wenn an der Verschlussfolie oder den Seitenwänden der Platten-Wells Flüssigkeit oder Kondensation sichtbar ist, zentrifugieren Sie die Platte vor Entfernen der Versiegelung wie benötigt.
- Legen Sie die Platte auf eine ebene Oberfläche, bevor Sie die Versiegelung langsam entfernen.

**Handhabung von Enrichment BLT Small (eBLTS)**

- Bewahren Sie das eBLTS-Röhrchen aufrecht im Kühlschrank auf, sodass die Beads immer in den Puffer eingetaucht sind.
- Unmittelbar vor der Verwendung das eBLTS-Röhrchen gründlich vortexen, bis die Beads resuspendiert sind. Um ein erneutes Absetzen der Beads zu vermeiden, wird eine Zentrifugation vor dem Pipettieren nicht empfohlen.
- Wenn die Beads an der Seite oder an der Oberseite einer 96-Well-Platte haften, 3 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren und dann zum Resuspendieren pipettieren.
- Beim Waschen von eBLTS:
  - Verwenden Sie das passende Magnetstativ für die Platte.
  - Entfernen Sie die Platte erst vom Magnetstativ, wenn dies in der Anleitung angegeben ist.
  - Wenn Beads in die Pipettenspitzen aspiriert werden, geben Sie die Beads in die Platte auf dem Magnetstativ zurück. Warten Sie ca. 2 Minuten, bis die Flüssigkeit klar ist.

# Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Workflow

Das folgende Diagramm veranschaulicht den Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-Workflow. Zwischen den Schritten sind sichere Haltepunkte markiert. Die Zeitschätzungen basieren auf der Verarbeitung von 12 Proben bei 12-Plex-Anreicherung.



# Gebrauchsanweisung

In diesem Kapitel wird das Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Protokoll beschrieben.

- Überprüfen Sie den geplanten kompletten Sequenzierungs-Workflow, von der Probe bis zur Analyse, um die Kompatibilität der Produkte und Experimentparameter sicherzustellen.
- Bevor Sie fortfahren, überprüfen Sie den Inhalt des Kits und stellen Sie sicher, dass Sie die erforderlichen Komponenten, Geräte und Materialien haben.
  - Biotinylierte Sonden von Drittanbietern müssen bestimmte Anforderungen erfüllen. Siehe [Anforderungen an Anreicherungs sonden-Panels auf Seite 11](#), um sicherzustellen, dass Ihre Sonden von Drittanbietern die Anforderungen erfüllen.
- Gehen Sie gemäß dem Protokoll in der angezeigten Reihenfolge vor. Halten Sie sich dabei an die angegebenen Volumina, Zeiten und Inkubationsparameter.
- Fahren Sie umgehend mit dem nächsten Schritt fort, außer wenn im Protokoll ein sicherer Haltepunkt angegeben ist.
- Bei der Erstellung eines Mastermixes ist in den angegebenen Volumen Überschuss enthalten.
- Achten Sie darauf, dass Sie das passende Magnetstativ für Ihren Plattentyp verwenden.

## Vorbereiten des Poolings

Dieser Schritt ist erforderlich, um eine erfolgreiche Sequenzierung der angereicherten Bibliotheken zu gewährleisten. Das Pooling von Bibliotheken kann vor der Anreicherung und vor der Sequenzierung erfolgen.

**Vor der Anreicherung:** Einzelne indizierte, amplifizierte Bibliotheken werden zur Anreicherung mit dem ausgewählten Sondenpanel gepoolt. Auf diese Weise entsteht ein Multiplex-Pool mit angereicherten Bibliotheken. Die Verarbeitung von FFPE-Probenzugabe wurde getestet und wird ausschließlich für 1-Plex-Anreicherungsreaktionen empfohlen. Für gDNA von hoher Qualität wurde 12-Plex getestet, aber auch 2-Plex bis 11-Plex sind möglich.

**Vor der Sequenzierung:** 1-Plex-angereicherte Bibliotheken und/oder multiplex-angereicherte Bibliotheken werden vor der Sequenzierung zusammengeführt. Die Anzahl der angereicherten Bibliotheken, die sequenziert werden können, hängt von der Ziel-Read-Tiefe für jede Probe auf Ihrem Sequenziersystem ab.

## Eindeutige doppelte Indizierung

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit verwendet eindeutige doppelte Indizes.

- Dual-indizierte Bibliotheken fügen Index 1 (i7)- und Index 2 (i5)-Sequenzen hinzu, um eindeutig getaggte Bibliotheken zu erzeugen.
- UD-Indizes haben unterschiedliche, nicht miteinander verbundene Indexsequenzen für den i7- und i5-Index-Read. Die Indizes sind 10 Basen lang.

Die Auswahl von Indexadaptern mit unterschiedlichen Sequenzen für gepoolte Bibliotheken optimiert die Farbbalance für eine erfolgreiche Sequenzierung und Datenanalyse. Plexitäts-Pools, die  $\geq 10$ -Plex sind, sind von Haus aus farbbalanciert, sodass Sie jede Indexadapterkombination verwenden können. Während Ihres Sequenzierungslaufs bietet das DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module Optionen für farbbalancierte Indexkombinationen und benachrichtigt Sie, wenn die ausgewählten Indexkombinationen keine ausreichende Diversität aufweisen.

Informationen zu Illumina UD-Indexadaptersequenzen und Plattenlayouts finden Sie im [Anhang: Illumina UD Indizes-Adaptersequenzen auf Seite 66](#)

## Unterstützte Anreicherungsplexitäten

Die Reagenzien des Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sind für 1-Plex und 12-Plex Anreicherungsplexität konfiguriert und getestet. Obwohl auch andere Anreicherungsplexitäten möglich sind, erfordern einige Plexitäten zusätzliche Reagenzien für die Bibliotheksvorbereitung vor der Anreicherung und das Anreicherungs sondens-Panel.

Das Erzielen eines angemessenen Anreicherungsergebnisses für nicht standardmäßige Anreicherungsplexitäten kann zusätzliche Optimierungen erfordern. Optimale Ergebnisse sind nicht garantiert.

- **Anreicherungsplexität:** Die Anzahl der vorangereicherten Bibliotheken (1–12), die in einer Anreicherungsreaktion für die Hybridisierung mit den Anreicherungs sondens-Panelen zusammengeführt werden. Wenn Sie zum Beispiel 12 vorangereicherte Bibliotheken miteinander kombinieren, entsteht ein 12-Plex-Anreicherungs pool.
- **Anreicherungsreaktion:** Die Anzahl der eindeutigen Anreicherungsreaktionsvorbereitungen, unabhängig von der Anzahl der vorangereicherten Bibliotheken, die pro Reaktion gepoolt werden. So kann beispielsweise mit einer einzigen Anreicherungsreaktion ein 1-Plex- oder 12-Plex-Anreicherungs pool erstellt werden.

Um die Gesamtzahl der angereicherten Bibliotheken zu berechnen, multiplizieren Sie die Anreicherungsplexität pro Reaktion mit der Anzahl der Anreicherungsreaktionen. Eine einzige Anreicherungsreaktion eines 12-Plex-Anreicherungs pools erzeugt beispielsweise einen Pool von 12 angereicherten Bibliotheken.

Beim Pooling vorangereicherter Bibliotheken unterstützen die Reagenzien des Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit die folgenden Anreicherungsreaktionen und Plexitäten.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-Reagenzien	Anreicherungsreaktionen	Anreicherungsplexität
16-Proben-Kit	16 Reaktionen	1-Plex
96-Proben-Kit	8 Reaktionen	12-Plex

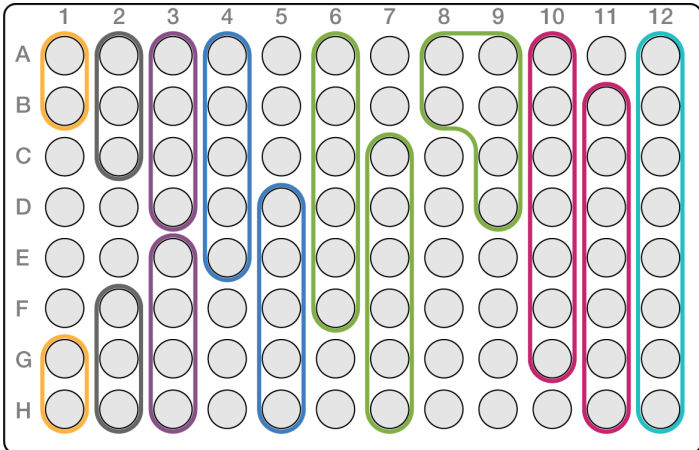
## Zwei-Plex- bis Acht-Plex-Pooling-Strategien

In der folgenden Tabelle sind Indexadapter (Wells) aufgeführt, die in einem 2–8-Plex-Pool kombiniert werden können, während die farbcodierte Abbildung jede Kombination veranschaulicht.

Poolen Sie jede Plexität  $\geq 2$  vom oberen oder unteren Ende einer Spalte. Poolen Sie nicht über eine Zeile.



Plexität	Kombinationen	Farbe in Abbildung
2	Die ersten beiden oder die letzten beiden Wells in einer Spalte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A und B</li> <li>• G und H</li> </ul> Die Zeilen C–F werden nicht verwendet.	Orange
3	Die ersten drei oder die letzten drei Wells in einer Spalte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–C</li> <li>• F–H</li> </ul> Die Zeilen D und E werden nicht verwendet.	Grau
4	Die ersten vier oder die letzten vier Wells in einer Spalte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–D</li> <li>• E–H</li> </ul>	Lila
5	Die ersten fünf oder die letzten fünf Wells in einer Spalte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–E</li> <li>• D–H</li> </ul>	Blau
6	[Option 1] Die ersten sechs oder die letzten sechs Wells in einer Spalte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–F</li> <li>• C–H</li> </ul> [Option 2] Die ersten beiden Wells (A und B) oder die letzten beiden Wells (G und H) in einer Spalte und vier beliebige Wells in einer benachbarten Spalte.	Grün
7	Die ersten sieben oder die letzten sieben Wells in einer Spalte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–G</li> <li>• B–H</li> </ul>	Pink
8	Die gesamte Spalte.	Blaugrün

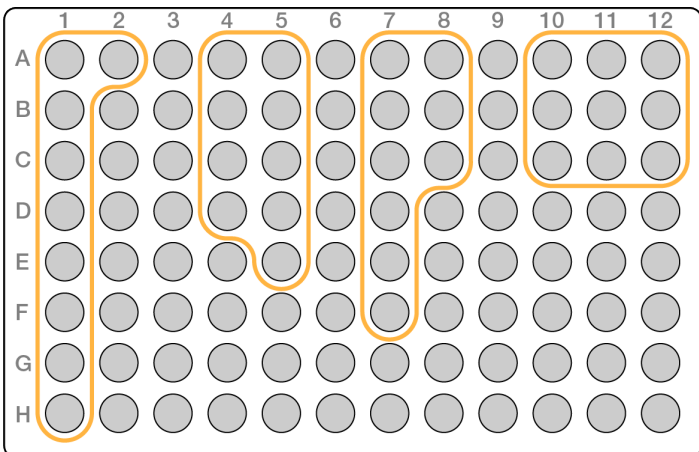


## 9-Plex-Pooling-Strategien

Verwenden Sie Indexadapter aus beliebigen Wells, die eine Farbbalance in einem Sequenzierungslauf optimieren, zum Beispiel:

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

In der folgenden Abbildung sind alle vier Beispiele dargestellt.



## Taggmentierung genomischer DNA

In diesem Schritt wird das Enrichment BLT Small (eBLTS) zur Markierung der DNA eingesetzt, ein Prozess, bei dem die DNA fragmentiert und mit Adaptersequenzen getagt wird.

## Verbrauchsmaterialien

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (gelber Verschluss)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nukleasefreies Wasser
- 96-Well-PCR-Platte
- Selbsthaftende Verschlussfolie
- Mikrozentrifugenröhrchen, 1,7 ml
- 8-Röhren-Streifen
- Pipettenspitzen
  - Mehrkanalpipetten, 200 µl



### VORSICHT

**Diese Reagenzien enthalten potenziell gesundheitsschädliche Chemikalien. Personen können sich durch Einatmen, orale Aufnahme oder durch den Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Tragen Sie eine dem Expositionsrisiko entsprechende Schutzausrüstung, insbesondere Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Weitere umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (Safety Data Sheet, SDS) unter [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**

## Allgemeines zu Reagenzien

- eBLTS muss bei Temperaturen von 2 bis 8 °C gelagert werden. Kein eBLTS verwenden, das unter 2 °C gelagert wurden.
- eBLTS nicht zentrifugieren.

## Vorbereitung

1. Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor:

Artikel	Lagerung	Anweisungen
eBLTS (gelber Verschluss)	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur. Unmittelbar vor Gebrauch vortexen, um zu mischen. Vor dem Pipettieren nicht zentrifugieren.
TB1	-25 bis -15 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur. Mischen Sie mit dem Vortexmischer.

2. DNA vortexen oder pipettieren und dann kurz zentrifugieren.

3. Speichern Sie das folgende TAG-Programm auf dem Thermocycler:
  - Wählen Sie die Option zum Vorheizen des Deckels und stellen Sie 100 °C ein.
  - Legen Sie ein Reaktionsvolumen von 50 µl fest.
  - 55 °C für 5 Minuten
  - Bei 10 °C halten

## Verfahren

1. Geben Sie 2–30 µl DNA in jedes Well einer 96-Well-PCR-Platte, sodass die Gesamtmenge 50–1000 ng beträgt.  
Wenn das DNA-Volumen < 30 µl ist, fügen Sie nukleasefreies Wasser zu den DNA-Proben hinzu, um das Gesamtvolumen auf 30 µl zu bringen.
2. eBLTS gründlich vortexen, bis die Beads vollständig resuspendiert sind.
3. Mischen Sie folgende Volumen in einem Röhrchen, um den Tagmentation Master Mix vorzubereiten. Multiplizieren Sie jedes Volumen mit der Anzahl der zu verarbeitenden Proben.
  - eBLTS (11,5 µl)
  - TB1 (11,5 µl)Das Volumen enthält einen Reagenzienüberschuss.
4. Pipettieren Sie den Tagmentation Master Mix gründlich, um ihn zu mischen.
5. Verteilen Sie das Volumen des Tagmentation Master Mix gleichmäßig auf einen 8-Röhrchen-Streifen.
6. Mit einer 200-µl-Mehrkanalpipette 20 µl Tagmentation Master Mix in jedes Well der PCR-Platte mit einer Probe geben. Verwenden Sie für jede Probenspalte oder -reihe neue Spitzen.
7. Entsorgen Sie den 8-Röhrchen-Streifen, nachdem der Tagmentation Master Mix dispensiert wurde.
8. Zum Mischen jede Probe zehnmal mit einer auf 40 µl eingestellten 200-µl-Multikanalpipette pipettieren. Verwenden Sie für jede Probenspalte neue Spitzen.  
Alternativ die PCR-Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1600 U/min mit einem Plattenschüttler schütteln.
9. Versiegeln Sie die Platte, legen Sie sie auf den vorprogrammierten Thermocycler und starten Sie das TAG-Programm.
10. Warten Sie, bis das TAG-Programm die Haltetemperatur von 10 °C erreicht hat, nehmen Sie die Platte dann sofort heraus.
11. Lassen Sie die 96-Well-PCR-Platte 2 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen.

## Reinigung nach der Tagmentierung

In diesem Schritt wird die Adapter-getaggte DNA vor der PCR-Amplifikation auf dem eBLTS gewaschen.

### Verbrauchsmaterialien

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)

- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- Magnetstativ für PCR-Platte, 96 Wells
- Selbsthaftende Verschlussfolie
- 8-Röhren-Streifen
- Pipettenspitzen
  - 20- $\mu$ l-Mehrkanalpipetten
  - Mehrkanalpipetten, 200  $\mu$ l
- Für das spätere Verfahren vorbereiten:
  - EPM (Verbesserte PCR-Mischung)
  - Index-Adapterplatte

### Allgemeines zu Reagenzien

- Achten Sie darauf, dass Sie das passende Magnetstativ für Ihre Platte verwenden. Die Verwendung eines MIDI-Platten-Magnetstativs für eine PCR-Platte könnte verhindern, dass TWB2 an den Beads haftet.
- Pipettieren Sie TWB2 langsam, um die Schaumbildung zu minimieren und eine falsche Volumenaufnahme und unvollständige Mischung zu vermeiden.

### Vorbereitung

1. Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor:

Artikel	Lagerung	Anweisungen
EPM	-25 bis -15 °C	Auf Eis 1 Stunde lang auftauen lassen. Zum Mischen invertieren, anschließend kurz zentrifugieren.
ST2	15 bis 30 °C	Werden Ausfällungen beobachtet, 10 Minuten lang bei 37 °C erhitzen und dann vortexen, bis die Ausfällungen aufgelöst sind. Bei Raumtemperatur verwenden.
TWB2	15 bis 30 °C	Bei Raumtemperatur verwenden.
Index-Adapterplatte	-25 bis -15 °C	30 Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen lassen.

### Verfahren

1. Geben Sie 10  $\mu$ l ST2 zu jeder Tagmentierungsreaktion hinzu. Wenn Sie eine Mehrkanalpipette verwenden, pipettieren Sie ST2 in einen 8er-Röhrchenstreifen und übertragen dann die entsprechenden Volumina auf die PCR-Platte. Verwenden Sie für jede Probenspalte oder -reihe neue Spitzen.
2. Mit einer 200- $\mu$ l-Pipette, die auf 50  $\mu$ l eingestellt ist, jedes Well langsam 10 Mal pipettieren, um die Beads zu resuspendieren.

Alternativ die Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1600 U/min schütteln. Wiederholen Sie den Vorgang nach Bedarf.

3. Die Platte versiegeln und 10 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
4. Inkubieren Sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur.
5. Auf einem Magnetstativ für PCR-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (3 Minuten).
6. [≤ 48 Proben] Dreimal wie folgt waschen.
  - a. Mit einer auf 60 µl eingestellten 200-µl-Mehrkanalpipette den gesamten Überstand entfernen und entsorgen. Vermeiden Sie eine Berührung des Bead-Pellets.
  - b. Vom Magnetstativ entfernen.
  - c. Unmittelbar danach langsam 100 µl TWB2 direkt auf die Beads geben.
  - d. Pipettieren Sie langsam, bis die Beads vollständig resuspendiert sind. Alternativ die Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1600 U/min schütteln.
  - e. Falls Spritzer auftreten, 10 Sekunden lang bei 280 × g abschleudern.
  - f. Auf einem Magnetstativ für PCR-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (3 Minuten). Lassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ und TWB2 in den Wells, um ein Übertrocknen beim dritten Waschgang zu vermeiden. Entfernen und entsorgen Sie den Überstand, nachdem Sie den PCR-Mastermix hergestellt haben.
  - g. Mit einer auf 100 µl eingestellten 200-µl-Mehrkanalpipette den gesamten Überstand entfernen und entsorgen.
  - h. Wiederholen Sie die Schritte c–f zwei Mal für insgesamt drei Waschgänge.
7. [> 48 Proben] Dreimal wie folgt waschen.
  - a. Führen Sie die Schritte b und c in Schritten von 1 bis 2 Spalten durch, bis alle Säulen abgearbeitet sind, um eine Übertrocknung zu vermeiden.
  - b. Mit einer auf 60 µl eingestellten 200-µl-Mehrkanalpipette den gesamten Überstand entfernen und entsorgen.
  - c. Vom Magnetstativ entfernen.
  - d. Unmittelbar danach langsam 100 µl TWB2 direkt auf die Beads geben.
  - e. Pipettieren Sie langsam, bis die Beads vollständig resuspendiert sind. Alternativ die Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1600 U/min schütteln.
  - f. Falls Spritzer auftreten, 10 Sekunden lang bei 280 × g abschleudern.
  - g. Auf einem Magnetstativ für PCR-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (3 Minuten). Lassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ und TWB2 in den Wells, um ein Übertrocknen beim dritten Waschgang zu vermeiden. Entfernen und entsorgen Sie den Überstand, nachdem Sie den PCR-Mastermix hergestellt haben.
  - h. Mit einer auf 100 µl eingestellten 200-µl-Mehrkanalpipette den gesamten Überstand entfernen und entsorgen.
  - i. Vom Magnetstativ nehmen und langsam 100 µl TWB2 direkt auf die Beads geben.

- j. Wiederholen Sie die Schritte h und i in 1- oder 2-Spalten-Schritten, bis alle Spalten bearbeitet wurden.
  - k. Wiederholen Sie die Schritte e–h zwei Mal für insgesamt drei Waschgänge.
8. Auf dem Magnetständer bis zu Schritt 4 des Abschnitts *Verfahren unter Amplifizieren von markierter DNA* belassen.

Das TWB2 verbleibt in den Wells, um ein Übertrocknen der Beads zu verhindern.

## Amplifizieren von tagmentierter DNA

In diesem Schritt wird die tagmentierte DNA mit einem PCR-Programm mit begrenzten Zyklen amplifiziert. Der PCR-Schritt fügt Index-1-Adapter (i7), Index-2-Adapter (i5) und Sequenzen hinzu, die für die Generierung von Sequenzierclustern erforderlich sind.

### Verbrauchsmaterialien

- EPM (Verbesserte PCR-Mischung)
- Index-Adapterplatte
- 96-Well-PCR-Platte
- Nukleasefreies Wasser
- Selbsthaftende Verschlussfolie
- Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml
- Pipettenspitzen
  - 20- $\mu$ l-Mehrkanalpipetten
  - Mehrkanalpipetten, 200  $\mu$ l

### Allgemeines zu Reagenzien

- Index-Adapterplatten
  - Ein Well kann > 10  $\mu$ l Indexadapter enthalten.
  - Geben Sie keine Proben in die Indexadapterplatte.
  - Jedes Well der Indexplatte darf nur einmal verwendet werden.

### Vorbereitung

1. Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor:

Artikel	Lagerung	Anweisungen
EPM	-25 bis -15 °C	Bei 4 °C oder auf Eis 1 Stunde lang auftauen. Zum Mischen invertieren, anschließend kurz zentrifugieren.
Index-Adapterplatte	-25 bis -15 °C	30 Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen lassen.

2. Speichern Sie das folgende eBLTS-PCR-Programm auf einem Thermocycler unter Verwendung der in der nachstehenden Tabelle angegebenen Anzahl von PCR-Zyklen.
- Wählen Sie die Option zum Vorheizen des Deckels und stellen Sie 100 °C ein.
  - Legen Sie ein Reaktionsvolumen von 50 µl fest.
  - 72 °C für 3 Minuten
  - 98 °C für 3 Minuten
  - X der folgenden Zyklen:
    - 98 °C für 20 Sekunden
    - 60 °C für 30 Sekunden
    - 72 °C für 1 Minute
  - 72 °C für 3 Minuten
  - Bei 10 °C halten

Die Gesamtlaufzeit beträgt ~38 Minuten für 9 Zyklen und ~46 Minuten für 12 Zyklen.

Art der Probenzugabe	Anzahl der PCR-Zyklen (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1000 ng gDNA	9
50–1000 ng gDNA, extrahiert aus FFPE	12
gDNA extrahiert aus Blut	9

## Verfahren

1. Mischen Sie Folgendes, um den PCR-Mastermix vorzubereiten. Multiplizieren Sie jedes Volumen mit der Anzahl der zu verarbeitenden Proben.
  - EPM (23 µl)
  - Nukleasefreies Wasser (23 µl)
 Das Volumen enthält einen Reagenzienüberschuss.
2. Den PCR-Mastermix zehnmal pipettieren, um ihn zu mischen, und anschließend kurz zentrifugieren.
3. Mit der Platte auf dem Magnetstativ eine 200-µl-Mehrkanalpipette verwenden, um TWB2 zu entfernen und zu entsorgen.  
Der an den Well-Wänden verbleibende Schaum hat keine negativen Auswirkungen auf die Bibliothek.
4. Vom Magnetstativ entfernen.
5. Sofort 40 µl PCR-Mastermix direkt zu den Beads in jedem Well hinzufügen.
6. Sofort zum Mischen pipettieren, bis die Beads vollständig resuspendiert sind. Alternativ die Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1600 U/min schütteln.



7. Die Probenplatte versiegeln und 10 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
8. Die Indexadapterplatte 1 Minute lang bei 1000 × g zentrifugieren.
9. Bereiten Sie die Indexadapterplatte vor.
  - [< 96 Proben] Durchstechen Sie die Verschlussfolie der Indexadapterplatte mit einer neuen Pipettenspitze für jedes Well nur für die Anzahl der zu bearbeitenden Proben.
  - [96 Proben] Richten Sie eine neue PCR-Platte mit Halbrahmen über der Indexadapterplatte aus und drücken Sie diese nach unten, um die Verschlussfolie zu durchstechen. Entsorgen Sie die zum Durchstechen der Verschlussfolie verwendete PCR-Platte.
10. Mit einer neuen Pipettenspitze 10 µl vorab gepaarte Indexadapter in jedes Well geben.
11. Zum Mischen zehnmal mit einer auf 40 µl eingestellten Pipette pipettieren. Alternativ die Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1600 U/min schütteln.
12. Die Platte versiegeln und 10 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
13. Platzieren Sie die Platte auf einem Thermocycler und führen Sie das Programm eBLTS PCR aus.

#### **SICHERER HALTEPUNKT**

Wenn Sie den Vorgang stoppen, kann eine Lagerung bis zu 30 Tage lang bei -25 bis -15 °C erfolgen.

## **Reinigung der Bibliotheken**

In diesem Schritt werden die amplifizierten Bibliotheken mit einem doppelseitigen Bead-Reinigungsverfahren aufgereinigt.

#### **Verbrauchsmaterialien**

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspensionspuffer)
- Ethanol (EtOH), 80 %, frisch zubereitet
- 96-Well-Lagerplatte, 0,8 ml, Polypropylen, tiefes Well (MIDI-Platte)
- 96-Well-PCR-Platte
- Magnetstativ für MIDI-Platten
- Magnetstativ für PCR-Platten
- Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml
- Nukleasefreies Wasser

#### **Allgemeines zu Reagenzien**

- Cleanup Beads
  - Vor jeder Verwendung mit dem Vortexer mischen.
  - Häufig mit dem Vortexer mischen, um eine gleichmäßige Verteilung der Beads sicherzustellen.

- Aufgrund der Viskosität der Lösung langsam aspirieren und abgeben.

## Vorbereitung

1. Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor:

Artikel	Lagerung	Anweisungen
CB	Raumtemperatur	Mit dem Vortexer mischen und zum Mischen invertieren, bis die Farbe der Flüssigkeit homogen ist.
RSB	2–8 °C	30 Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen lassen. Mischen Sie mit dem Vortexmischer.

## Verfahren

1. Die 96-Well-PCR-Platte 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln und anschließend kurz zentrifugieren.
2. Auf einem Magnetstativ für PCR-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (1 Minute).
3. CB 10 Sekunden lang 3-mal vortexen und dann mehrmals umdrehen, um es zu resuspendieren.
4. Für hochwertige gDNA wie folgt vorgehen.
  - a. 77 µl nukleasefreies Wasser in jedes Well einer neuen MIDI-Platte geben.
  - b. 88 µl CB zu jedem Well der MIDI-Platte hinzufügen.
  - c. 45 µl Überstand aus jedem Well der PCR-Platte in das entsprechende Well der MIDI-Platte übertragen.
  - d. Die PCR-Platte entsorgen.
  - e. Jedes Well zum Mischen zehnmal pipettieren. Alternativ die Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.
  - f. Die Platte versiegeln und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
  - g. Auf Luftblasen prüfen. Falls vorhanden, herunterzentrifugieren.
  - h. Auf dem Magnetstativ für MIDI-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (5 Minuten).
  - i. Während der Inkubation die CB sorgfältig mit dem Vortexer mischen und anschließend 20 µl in jedes Well einer *neuen* MIDI-Platte geben.
  - j. 200 µl Überstand aus jedem Well der ersten MIDI-Platte in das entsprechende Well der neuen MIDI-Platte übertragen (mit 20 µl CB).
  - k. Die erste MIDI-Platte entsorgen.
  - l. Jedes Well der neuen MIDI-Platte zum Mischen 10 Mal pipettieren. Alternativ die Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.
5. Bei extrahiertem FFPE wie folgt vorgehen.
  - a. 81 µl CB in jedes Well einer neuen MIDI-Platte geben.
  - b. 45 µl Überstand aus jedem Well der PCR-Platte in das entsprechende Well der MIDI-Platte übertragen.
  - c. Die PCR-Platte entsorgen.

- d. Jedes Well zum Mischen zehnmal pipettieren. Alternativ die Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.
6. Bei Raumtemperatur 5 Minuten lang inkubieren.
7. Auf Luftblasen prüfen. Falls vorhanden, herunterzentrifugieren.
8. Auf dem Magnetstativ für MIDI-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (5 Minuten).
9. Den Überstand entfernen und entsorgen, ohne die Beads zu berühren.
10. Führen Sie Waschläufe für Beads wie folgt durch.
  - a. Wenn sich die Platte auf dem Magnetstativ befindet, 200 µl frisches 80%iges EtOH ohne Mischen hinzufügen.
  - b. 30 Sekunden lang inkubieren.
  - c. Den Überstand entfernen und entsorgen, ohne die Beads zu berühren.
11. Führen Sie einen **zweiten** Waschlauf für die Beads durch.
12. Auf dem Magnetstativ 5 Minuten lang an der Luft trocknen lassen.
13. Während des Trocknens an der Luft restliches EtOH mit einer 20-µl-Pipette aus den einzelnen Wells entnehmen und entsorgen.
14. Vom Magnetstativ entfernen.
15. 17 µl RSB zu den Beads hinzufügen.
16. Die Platte versiegeln und 2 Minuten lang bei 1800 U/min schütteln.
17. Inkubieren Sie 2 Minuten lang bei Raumtemperatur.
18. Auf Luftblasen prüfen. Falls vorhanden, herunterzentrifugieren.
19. Die Platte auf einem Magnetstativ für MIDI-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (2 Minuten).
20. 15 µl Überstand in eine neue 96-Well-PCR-Platte übertragen.

#### **SICHERER HALTEPUNKT**

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die Platte und lagern Sie sie bis zu 30 Tage lang bei -25 bis -15 °C.

## **Pooling vorangereicherter Bibliotheken**

Dieser Schritt kombiniert DNA-Bibliotheken mit eindeutigen Indizes in einem Pool von bis zu 12 Bibliotheken.

## Pooling-Methoden

Sie können nach Volumen oder Masse poolen. Verwenden Sie die folgende Tabelle, um die geeignete Methode für Ihr Volumen zu bestimmen.

Tabelle 2 Empfohlene Pooling-Methoden

Probenzugabe	Pooling-Methode
10–49 ng gDNA	Masse
50–1000 ng gDNA	Volumen
Aus FFPE extrahierte gDNA	Masse
gDNA extrahiert aus Blut	Volumen

- Bei der 1-Plex-Anreicherung ist kein Pooling von vorangereicherten Bibliotheken erforderlich. Es könnte jedoch notwendig sein, RSB hinzuzufügen.
- Nach der Quantifizierung der vorangereicherten Bibliothek können alle Probenarten nach Masse gepoolt werden, um eine optimale Indexbalance zu erreichen.
- Das endgültige Ergebnis an vorangereicherten Bibliotheken, die in separaten Versuchsansätzen erzeugt wurden, kann variieren. Daher wird ein Pooling nach Masse empfohlen, um eine optimale Indexbilanz zu erreichen.
- Verwenden Sie die 1-Plex-Anreicherung in den folgenden Situationen.
  - 10–49 ng gDNA
  - 50–1000 ng gDNA, extrahiert aus FFPE
  - Geringe Erkennung der Häufigkeit des seltenen Allels beim Calling somatischer Varianten.

## Pooling nach Masse

In den folgenden Situationen quantifizieren Sie Ihre Bibliotheken, um eine DNA-Masse pro Bibliothek für die Anreicherung zu verwenden, die in [Pooling vorangereicherter Bibliotheken mit gleicher Konzentration auf Seite 37](#) angegeben ist.

- 10–49 ng gDNA-Probenzugabe
- 50–1000 ng gDNA-Probenzugabe, extrahiert aus FFPE
- Geringe Erkennung der Häufigkeit des seltenen Allels beim Calling somatischer Varianten
- Aus Blut extrahierte gDNA für optimale Indexbilanz

## Quantifizierung vorangereicherter Bibliotheken

- Führen Sie einen Lauf mit 1 µl der vorangereicherten Bibliotheken mit der von Ihnen bevorzugten fluoreszenzbasierten Quantifizierungsmethode durch, die einen dsDNA-Interkalationsfarbstoff verwendet.
  - Bei 50–1000 ng gDNA von hoher Qualität ist mit einem Ergebnis von  $\geq 500$  ng vorangereicherter Bibliothek zu rechnen.
  - Bei 50–1000 ng gDNA, die aus FFPE extrahiert wurde, ist mit einem Ergebnis von 500–6000 ng vorangereicherter Bibliothek zu rechnen, abhängig von der Qualität der Ausgangsprobe.

**HINWEIS** Bei Quantifizierungsmethoden mit unterschiedlichen Verzerrungen ist die Quantifizierungsmethode für diesen Arbeitsablauf zu qualifizieren. Die Konzentrationsergebnisse können je nach verwendeter Methode abweichen.

### Pooling vorangereicherter Bibliotheken mit gleicher Konzentration

Verwenden Sie die folgende Tabelle, um die für die Anreicherung erforderliche DNA-Masse pro Bibliothek je nach Probentyp und Anreicherungsplexität zu bestimmen. Ein optimales Anreicherungsergebnis und optimale Assay-Leistung können nicht garantiert werden, wenn ein geringeres als das empfohlene Ergebnis an vorangereicherten Bibliotheken verwendet wird.

Die Gesamt-DNA-Masse in der Anreicherungsreaktion sollte 6000 ng nicht überschreiten.

Probenzugabe	Anreicherungsplexität	DNA-Masse pro Bibliothek (ng)	Gesamtmasse der DNA-Bibliothek (ng)
gDNA von hoher Qualität	12	250–500	3000–6000
Aus FFPE extrahierte gDNA	1	200	200

- Erfassen Sie in diesem Schritt die Indizes für die Bibliotheken, die Sie zusammenführen wollen.
- Berechnen Sie auf der Grundlage der Konzentration der einzelnen Bibliotheken das Volumen, das der Anreicherungsreaktion zugesetzt werden muss, um die erforderliche DNA-Masse zu erreichen.
  - Hochwertige gDNA: Berechnen Sie das Bibliotheksvolumen, das für 250–500 ng Zugabe benötigt wird.
  - Aus FFPE extrahierte gDNA: Berechnen Sie das Bibliotheksvolumen, das für 200 ng Zugabe benötigt wird.
- Geben Sie das berechnete Volumen für jede Bibliothek in das gleiche Well der PCR-Platte.
- Wenn Sie gDNA von hoher Qualität verwenden, führen Sie je nach Gesamtvolumen der gepoolten, vorangereicherten Bibliotheken eine der folgenden Methoden durch:
  - Wenn das Volumen der vorangereicherten Bibliothek 30 µl beträgt, fahren Sie mit [Hybridisieren von Sonden auf Seite 39](#) fort.
  - Wenn das Volumen der vorangereicherten Bibliothek < 30 µl beträgt, fügen Sie RSB hinzu, um ein Gesamtvolumen von 30 µl zu erreichen.

- Wenn das Volumen der vorangereicherten Bibliothek > 30 µl beträgt, verwenden Sie eine Bead-basierte Methode oder einen Vakuumkonzentrator, um die gepoolte Probe zu konzentrieren. Geben Sie RSB zu der konzentrierten gepoolten Probe, um ein Gesamtvolumen von 30 µl zu erreichen.
5. Wenn Sie aus FFPE extrahiertes gDNA verwenden, führen Sie je nach Gesamtvolumen der gepoolten, vorangereicherten Bibliotheken eine der folgenden Methoden durch:
- Wenn das Volumen der vorangereicherten Bibliothek 7,5 µl beträgt, fahren Sie mit [Hybridisieren von Sonden auf Seite 39](#) fort.
  - Wenn das Volumen der vorangereicherten Bibliothek < 7,5 µl beträgt, fügen Sie RSB hinzu, um ein Gesamtvolumen von 7,5 µl zu erreichen.

### SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die Platte und lagern Sie sie bis zu 30 Tage lang bei -25 bis -15 °C.

### Pooling nach Volumen

Wenn es sich bei der Zugabe um 50–1000 ng gDNA handelt, ist eine Quantifizierung und Normalisierung der einzelnen Bibliotheken, die im selben Experiment erzeugt wurden, nicht erforderlich.

Um eine optimale Leistung zu erzielen, sollten Sie nur vorangereicherte Bibliotheksproben zusammenfassen, die vom gleichen Benutzer, der gleichen Reagenziencharge und der gleichen Indexadapterplatte hergestellt wurden.

1. Erfassen Sie in diesem Schritt die Indizes für die Bibliotheken, die Sie zusammenführen wollen.
2. Kombinieren Sie die folgenden vorangereicherten Bibliotheks- und RSB-Volumina für Ihre Anreicherungsplexität im gleichen Well einer neuen PCR-Platte.  
Das resultierende Volumen beträgt 30 µl.

Anreicherungsplexität*	Volumen jeder vorangereicherten Bibliothek (µl)	Volumen RSB (µl)
1-Plex	14	16
2-Plex	14	2
3-Plex	10	0
4-Plex	7,5	0
5-Plex	6	0
6-Plex	5	0
7-Plex	4,2	0,6
8-Plex	3,7	0,4

Anreicherungsplexität*	Volumen jeder vorangereicherten Bibliothek (µl)	Volumen RSB (µl)
9-Plex	3,3	0,3
10-Plex	3	0
11-Plex	2,7	0,3
12-Plex	2,5	0

\* Informationen über nicht standardmäßige Plexitäten (2-Plex bis 11-Plex) finden Sie unter [Einschränkungen des Verfahrens auf Seite 2](#).

### SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die Platte und lagern Sie sie bis zu 30 Tage lang bei -25 bis -15 °C.

## [Optional] Qualifizierung von vorangereicherten Bibliotheken

Beim Pooling nach Volumen wird zur Quantifizierung der vorangereicherten Bibliotheken eine fluorometrische Methode mit einem dsDNA-Interkalationsfarbstoff verwendet. Um die vorangereicherten Bibliotheken zu qualifizieren, verwenden Sie einen DNA-Fragmentanalysator mit dem entsprechenden Fragmentanalyse-Kit.

Verwenden Sie insgesamt 1 µl für die Bibliotheksqualifizierung. Vorangereicherte Bibliotheken sind so konzentriert, dass kleine Verdünnungen für die Quantifizierung oder Fragmentanalyse möglich sind.

## Hybridisieren von Sonden

In diesem Schritt werden gezielte Bereiche der DNA mit Erfassungssonden gebunden.

Die Reagenzien des Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sind sowohl mit Oligonukleotid-DNA-Anreicherungspanels von Illumina als auch mit solchen von Drittanbietern kompatibel. Informationen zu den Anforderungen an Panels von Drittanbietern finden Sie unter [Anforderungen an Anreicherungsplatten-Panels auf Seite 11](#).

### Verbrauchsmaterialien

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (blauer Verschluss)
- Anreicherungsplatten-Panels
- 96-Well-PCR-Platte
- Selbsthaftende Verschlussfolie

- Für das spätere Verfahren vorbereiten:
  - SMB3 (Magnetische Streptavidin-Beads)
  - EEW (Verbesserter Anreicherungs-waschpuffer) (oranger Verschluss)

## Allgemeines zu Reagenzien

- NHB2 präzipitiert und separiert bei Lagerung.
- Anreicherungs-sonden-Panel bezieht sich auf das ausgewählte Anreicherungs-Oligonukleotid-Panel von Illumina oder einem-Drittanbieter.

## Vorbereitung

1. Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor:

Artikel	Lagerung	Anweisungen
EHB2	2–8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur. Mischen Sie mit dem Vortexmischer. Wenn Kristalle und Trübungen beobachtet werden, muss erneut mit dem Vortexer gemischt oder auf und ab pipettiert werden, bis die Lösung klar ist.
Anreicherungs-sonden-Panel	-25 bis -15 °C (Illumina)	Die Panels von Illumina und Drittanbietern auf Raumtemperatur bringen. Mischen Sie mit dem Vortexmischer.
NHB2 (blauer Verschluss)	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz bei Raumtemperatur auftauen. Bei Raumtemperatur 5 Minuten lang in einem Mikroproben-Inkubator auf die gleiche Temperatur wie die verwendete Sonde vorheizen. Zum Resuspendieren dreimal mit maximaler Geschwindigkeit jeweils 10 Sekunden lang mit dem Vortexer mischen. Zentrifugieren Sie kurz. Vom Boden des Röhrchens auf und ab pipettieren. Wenn Kristalle und Trübungen beobachtet werden, muss erneut mit dem Vortexer gemischt oder auf und ab pipettiert werden, bis die Lösung klar ist. Im warmen Zustand verwenden, damit sich keine Präzipitationen bilden.



Artikel	Lagerung	Anweisungen
SMB3*	2–8 °C	Wenn Sie unmittelbar nach der 90-minütigen Pause im HYB-Programm mit dem nächsten Verfahren fortfahren, bringen Sie es mindestens 2 Stunden vor Beginn des HYB-Programms auf Raumtemperatur.
EEW* (oranges Röhrchen)	-25 bis -15 °C	Wenn Sie unmittelbar nach der 90-minütigen Pause im HYB-Programm mit dem nächsten Verfahren fortfahren, bringen Sie es mindestens 2 Stunden vor Beginn des HYB-Programms auf Raumtemperatur. Wenn die Raumtemperatur erreicht ist, 30 Minuten vor Beendigung des HYB-Programms in einem Mikroproben-Inkubator auf die entsprechende Hybridisierungs- und Erfassungstemperatur vorheizen.

\* Wenn Sie vor dem nächsten Verfahren anhalten, warten Sie mit der Zubereitung dieses Reagenzes, bis Sie zu diesem Verfahren kommen.

2. Speichern Sie das folgende HYB-Programm auf dem Thermocycler unter Verwendung der entsprechenden Anzahl von Zyklen, die in [Tabelle 3](#).

- Wählen Sie die Option zum Vorheizen des Deckels und stellen Sie 100 °C ein.
- Legen Sie ein Reaktionsvolumen fest.
  - [Hochwertige gDNA] 100 µl
  - [Aus FFPE extrahierte gDNA] 25 µl
- 98 °C für 5 Minuten
- X Zyklen von je 1 Minute, beginnend bei 98 °C für den ersten Zyklus, dann 2 °C pro Zyklus abnehmend
- 90 Minuten lang bei angegebener Temperatur halten:
  - [Aus FFPE extrahierte gDNA] 58 °C
  - [80-Mer-Sondenpanel] 58 °C
  - [Calling somatischer Varianten] 58 °C
  - [Alle anderen] 62 °C

Die Gesamtlaufzeit beträgt ~115 Minuten.

Tabelle 3 Anzahl der Zyklen pro Probe oder Panel

Probe und Panel-Typ	Anzahl der Zyklen (X)
Aus FFPE extrahierte gDNA (unabhängig vom Panel-Typ)	20
80-Mer-Sondenpanels (unabhängig vom Probentyp)	20

Probe und Panel-Typ	Anzahl der Zyklen (X)
Calling somatischer Varianten	20
Alle anderen Proben und Panels	18

## Verfahren

- [Hochwertige gDNA]** Geben Sie folgende Reagenzien *in der angegebenen Reihenfolge* zu jeder gepoolten Bibliothek in der PCR-Platte.  
Erstellen Sie keine Master-Mischung. Das Erstellen einer Master-Mischung aus NHB2 und EHB2 hat negative Auswirkungen auf die Anreicherungsleistung.
  - NHB2 (blauer Verschluss) (50 µl)
  - Anreicherungs sonden-Panel (10 µl)
  - EHB2 (10 µl)
- [Hochwertige gDNA]** Zum Mischen mit einer auf 90 µl eingestellten Pipette jedes Well 10 Mal pipettieren.
- [Aus FFPE extrahierte gDNA]** Geben Sie folgende Reagenzien *in der angegebenen Reihenfolge* zu jeder gepoolten Bibliothek in der PCR-Platte.  
Erstellen Sie keine Master-Mischung. Das Erstellen einer Master-Mischung aus NHB2 und EHB2 hat negative Auswirkungen auf die Anreicherungsleistung.
  - NHB2 (blauer Verschluss) (12,5 µl)
  - Anreicherungs sonden-Panel (2,5 µl)
  - EHB2 (2,5 µl)
- [Aus FFPE extrahierte gDNA]** Zum Mischen mit einer auf 20 µl eingestellten Pipette jedes Well 10 Mal pipettieren.
- Die Platte versiegeln und 10 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
- Die Probenplatte auf den vorprogrammierten Thermocycler platzieren und das HYB-Programm ausführen.
- Sobald die Temperaturhaltezeit des HYB-Programms abgelaufen ist, sofort mit dem nächsten Verfahren fortfahren.



### VORSICHT

Wenn die Temperatur der Hybridisierungsreaktion unter Raumtemperatur fällt, kommt es zur Präzipitation.

## Hybridisierte Sonden erfassen

In diesem Schritt werden mit Magnetische Streptavidin-Beads (SMB3) Sonden erfasst, die an Zielregionen von Interesse hybridisiert wurden.

## Verbrauchsmaterialien

- EEW (Verbesserter Anreicherungswaschpuffer) (oranger Verschluss)
- EE1 (Anreicherungselutionspuffer 1)
- ET2 (Elutions-Targetpuffer 2)
- HP3 (2 N NaOH)
- SMB3 (Magnetische Streptavidin-Beads)
- Mikrozentrifugenröhrchen, 1,5 ml
- 96-Well-MIDI-Platte
- 96-Well-PCR-Platte
- Selbsthaftende Verschlussfolie
- Magnetstativ für MIDI-Platten
- Für das spätere Verfahren vorbereiten:
  - Verbesserte PCR-Mischung (EPM)
  - PCR-Primer-Cocktail (PPC)

## Allgemeines zu Reagenzien

- EEW
  - Stellen Sie sicher, dass EEW vor dem Erwärmen in einem Mikroproben-Inkubator mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur aufgetaut wurde.
  - Stellen Sie sicher, dass EEW 30 Minuten lang in einem Mikroproben-Inkubator erwärmt wurde, bevor das Programm HYB endet.
  - Bei Nichtgebrauch EEW im Mikroproben-Inkubator lassen. EEW sollte während des gesamten Protokolls erhitzt bleiben.
  - Kann nach Erreichen der Raumtemperatur trüb sein.
  - Kann gelb erscheinen.
- SMB3
  - SMB3 muss vor der Verwendung Raumtemperatur haben.

## Vorbereitung

1. Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor.

Artikel	Lagerung	Anweisungen
SMB3	2–8 °C	2 Stunden stehen lassen, um Raumtemperatur anzunehmen. Invertieren und anschließend bis zur vollständigen Resuspendierung mit dem Vortexer mischen.

Artikel	Lagerung	Anweisungen
EEW (oranges Röhrchen)	-25 bis -15 °C	Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur werden die Proben in einem Mikroproben-Inkubator 30 Minuten lang auf die entsprechende Hybridisierungs- und Erfassungstemperatur erwärmt, bevor das Programm HYB endet.
EE1	-25 bis -15 °C	Bei Raumtemperatur auftauen lassen und anschließend mit dem Vortexer mischen.
HP3	-25 bis -15 °C	Bei Raumtemperatur auftauen lassen und anschließend mit dem Vortexer mischen.
ET2	2–8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur. Mischen Sie mit dem Vortexmischer.
EPM	-25 bis -15 °C	Auf Eis eine Stunde lang auftauen lassen. Zum Mischen invertieren, anschließend kurz zentrifugieren. Lagern Sie sie auf Eis.
PPC	-25 bis -15 °C	Auf Eis eine Stunde lang auftauen lassen. Mit dem Vortexer mischen und anschließend kurz zentrifugieren. Lagern Sie sie auf Eis.

2. Einen Mikroproben-Inkubator mit einem MIDI-Hitzeblock-Einsatz vorheizen, um die Probenplatte auf eine der folgenden Temperaturen zu inkubieren. Ein optionaler zweiter Mikroproben-Inkubator kann zum Vorwärmen von EEW verwendet werden. EEW auf den MIDI-Hitzeblock-Einsatz legen.
  - [FFPE] 58 °C
  - [80 mer pro Sondenpanel] 58 °C
  - [Calling somatischer Varianten] 58 °C
  - [Alle anderen] 62 °C

## Verfahren

### Erfassung

1. SMB3 wie folgt in das entsprechende Well einer neuen MIDI-Platte geben.
  - [Hochwertige gDNA] 250 µl hinzufügen SMB3.
  - [Aus FFPE extrahierte gDNA] 62,5 µl hinzufügen SMB3.
2. Mit einer auf 100 µl für hochwertige gDNA bzw. 25 µl für FFPEeingestellten Pipette jede gepoolte Bibliothek von der 96-Well-PCR-Platte in das entsprechende Well der neuen MIDI-Platte transferieren.
3. Die Platte versiegeln und 4 Minuten lang bei 1200 U/min schütteln.
4. Im Falle von Spritzern die Platte kurz zentrifugieren.

5. Die Platte mit den gepoolten Bibliotheken auf dem MIDI-Hitzeblock-Einsatz des Mikroproben-Inkubators unter dem EEW-Röhrchen platzieren, den Deckel schließen und anschließend 15 Minuten lang bei der entsprechenden Temperatur inkubieren:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80-Mer-Sondenpanel] 58 °C
  - [Calling somatischer Varianten] 58 °C
  - [Alle anderen] 62 °C
6. Die Platte mit den gepoolten Bibliotheken herausnehmen und 30 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
7. Sofort auf einem Magnetstativ für MIDI-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (2 Minuten).
8. [**Hochwertige gDNA**] Mit einer auf 200 µl eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus den einzelnen Wells entnehmen und entsorgen; dabei eine Berührung des Bead-Pellets vermeiden.
9. [**Aus FFPE extrahierte gDNA**] Mit einer auf 90 µl eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus den einzelnen Wells entnehmen und entsorgen; dabei eine Berührung des Bead-Pellets vermeiden.
10. Entfernen und entsorgen Sie den gesamten Restüberstand.

## Waschlauf

1. Vom Magnetstativ entfernen.
2. [ **Hochwertige gDNA** ] Schnell EEW aus dem Mikroproben-Inkubator nehmen und 200 µl in jedes Well geben.
3. [**Aus FFPE extrahierte gDNA**] EEW schnell aus dem Mikroproben-Inkubator nehmen und 50 µl in jedes Well geben.
4. Unbenutztes EEW in den Mikroproben-Inkubator zurückgeben und warmhalten.
5. Versiegeln und 4 Minuten lang bei 1800 U/min schütteln.
6. Die Probenplatte auf den MIDI-Hitzeblock-Einsatz im Mikroproben-Inkubator unter dem EEW-Röhrchen platzieren, den Deckel schließen und anschließend 5 Minuten lang bei entsprechender Temperatur inkubieren:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80-Mer-Sondenpanel] 58 °C
  - [Calling somatischer Varianten] 58 °C
  - [Alle anderen Panels] 62 °C
7. Sofort auf einem Magnetstativ für MIDI-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (2 Minuten).
8. Mit einer auf 200 µl für hochwertige gDNA bzw. auf 50 µl für FFPEeingestellten Pipette den gesamten Überstand aus jedem Well entnehmen und entsorgen.
9. Wiederholen Sie die Schritte 1–8 zwei Mal für insgesamt drei Waschgänge.

## Übertragungswaschlauf

1. Vom Magnetstativ entfernen.
2. [Hochwertige gDNA ] EEW schnell aus dem Mikroproben-Inkubator nehmen und 200 µl in jedes Well geben.
3. [Aus FFPE extrahierte gDNA] EEW schnell aus dem Mikroproben-Inkubator nehmen und 50 µl in jedes Well geben.
4. Versiegeln und 4 Minuten lang bei 1800 U/min schütteln. Wenn Spritzer auftreten, reduzieren Sie die Drehzahl auf 1600 U/min.
5. Übertragen Sie die resuspendierte Bead-Lösung auf eine neue MIDI-Platte.  
Ein Teil der Probe kann in den Wells verbleiben.



### VORSICHT

Durch die Übertragung des Reagenzes wird die Verschleppung von Reagenzienrückständen, die die nachgeschaltete PCR hemmen können, minimiert.

6. Die Probenplatte auf dem MIDI-Hitzeblock-Einsatz des Mikroproben-Inkubators platzieren, den Deckel schließen und anschließend 5 Minuten lang bei der entsprechenden Temperatur inkubieren:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80-Mer-Sondenpanel] 58 °C
  - [Calling somatischer Varianten] 58 °C
  - [Alle anderen] 62 °C
7. Sofort auf einem Magnetstativ für MIDI-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (2 Minuten).
8. Mit einer auf 200 µl für hochwertige gDNA bzw. 50 µl für FFPE eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus den einzelnen Wells entnehmen und entsorgen.
9. Die Platte 30 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
10. Platzieren Sie die Platte 10 Sekunden lang auf einem MIDI-Platten-Magnetstativ.
11. Restliche Flüssigkeit mit einer 20-µl-Pipette aus den einzelnen Wells entfernen und entsorgen.
12. Fahren Sie sofort mit [Eluieren auf Seite 46](#) fort, um ein übermäßiges Austrocknen der Beads und einen Verlust des Bibliotheksergebnisses zu vermeiden.

## Eluieren

1. Kombinieren Sie folgende Volumen zur Vorbereitung einer Elutions-Master-Mischung. Multiplizieren Sie jedes Volumen mit der Anzahl der zu verarbeitenden Pool-Bibliotheken.
  - EE1 (28,5 µl)
  - HP3 (1,5 µl)Das Volumen enthält einen zusätzlichen Reagenzienüberschuss.
2. Mit dem Vortexer mischen und anschließend kurz zentrifugieren.
3. Die MIDI-Platte vom Magnetstativ entfernen.
4. 23 µl Elutions-Master-Mischung zu jedem Well hinzufügen.

5. Die Platte versiegeln und 2 Minuten lang bei 1800 U/min schütteln.
6. Die Platte 2 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
7. 30 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
8. Auf einem Magnetstativ für MIDI-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (2 Minuten).
9. 21 µl Überstand aus der MIDI-Platte in das entsprechende Well einer neuen 96-Well-PCR-Platte übertragen.
10. Die MIDI-Platte entsorgen.
11. 4 µl ET2 in jedes Well mit 21 µl Überstand geben.
12. Die Pipette auf 20 µl einstellen und jedes Well zum Mischen zehnmal langsam pipettieren.
13. Die Platte versiegeln und 10 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
14. Die Platte 1 Minute lang bei Raumtemperatur inkubieren.

## Amplifikation der angereicherten Bibliothek

In diesem Schritt wird die angereicherte Bibliothek mithilfe von PCR amplifiziert.

### Verbrauchsmaterialien

- EPM (Verbesserte PCR-Mischung)
- PPC (PCR-Primer-Cocktail)
- Selbsthaftende Verschlussfolie

### Vorbereitung

1. Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor:

Artikel	Lagerung	Anweisungen
EPM	-25 bis -15 °C	Bei 4 °C oder auf Eis eine Stunde lang auftauen. Zum Mischen invertieren, anschließend kurz zentrifugieren. Lagern Sie sie auf Eis.
PPC	-25 bis -15 °C	Bei 4 °C auf Eis eine Stunde lang auftauen. Mit dem Vortexer mischen und anschließend kurz zentrifugieren. Lagern Sie sie auf Eis.

2. Speichern Sie das folgende AMP-Programm auf dem Thermocycler unter Verwendung der entsprechenden Anzahl von PCR-Zyklen, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

- Wählen Sie die Option zum Vorheizen des Deckels und stellen Sie 100 °C ein.
- Legen Sie ein Reaktionsvolumen von 50 µl fest.
- 98 °C für 45 Sekunden
- X der folgenden Zyklen:
  - 98 °C für 30 Sekunden
  - 60 °C für 30 Sekunden
  - 72 °C für 30 Sekunden
- 72 °C für 5 Minuten
- Bei 10 °C halten

Die Gesamtlaufzeit beträgt ~35 Minuten.

Probe und Panel-Typ	(X) Zyklen
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) für hochwertige gDNA	10
Illumina Exome Panel (CEX) für FFPE	12
Alle anderen Proben und Panels	12 <sup>1234</sup>

<sup>1</sup> Kann durch nachträgliche Optimierung auf bis zu 15 Zyklen für kleine Panels von Drittanbietern eingestellt werden. Bei Verwendung von FFPE kann die Anzahl der Zyklen auf bis zu 17 eingestellt werden.

<sup>2</sup> Kann bei Panels von Drittanbietern mit nur 500 Sonden auf bis zu 17 Zyklen eingestellt werden. Bei Verwendung von FFPE kann die Anzahl der Zyklen auf bis zu 19 eingestellt werden.

<sup>3</sup> Kann bei FFPE-Proben auf bis zu 14 Zyklen eingestellt werden.

<sup>4</sup> Eine Erhöhung der Anzahl der PCR-Zyklen kann bei FFPE-Proben zu einer höheren Duplikatrate und kleineren Fragmentgrößen führen.

## Verfahren

1. 5 µl PPC zu jedem Well hinzufügen.
2. 20 µl EPM zu jedem Well hinzufügen.
3. Die Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1200 U/min schütteln.
4. Die Platte 10 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
5. Auf dem vorprogrammierten Thermocycler platzieren und das Programm AMP ausführen.

### SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, kann eine Lagerung bis zu zwei Tage lang bei 2 bis 8 °C erfolgen. Alternativ bis zu 24 Stunden lang im Thermocycler lassen.



## Reinigung der amplifizierten angereicherten Bibliothek

In diesem Schritt werden Cleanup Beads zur Reinigung der angereicherten Bibliothek und zur Entfernung unerwünschter Produkte verwendet.

### Verbrauchsmaterialien

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspensionspuffer)
- Ethanol (EtOH), 80 %, frisch zubereitet
- Selbsthaftende Verschlussfolien
- 96-Well-MIDI-Platte
- 96-Well-PCR-Platte
- Magnetstativ für MIDI-Platten

### Allgemeines zu Reagenzien

- Cleanup Beads
  - Vor jeder Verwendung mit dem Vortexer mischen.
  - Häufig mit dem Vortexer mischen, um eine gleichmäßige Verteilung der Beads sicherzustellen.
  - Aufgrund der Viskosität der Lösung langsam aspirieren und abgeben.

### Vorbereitung

1. Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor.

Artikel	Lagerung	Anweisungen
CB	Raumtemperatur	Mit dem Vortexer mischen und zum Mischen invertieren, bis die Farbe der Flüssigkeit homogen ist.
RSB	2 bis 8 °C	Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur. Mischen Sie mit dem Vortexmischer.

2. Frisches 80%iges EtOH aus reinem Ethanol vorbereiten.

### Verfahren

1. Die PCR-Platte 10 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
2. CB 3 Mal 10 Sekunden lang mit dem Vortexer mischen und anschließend invertieren.
3. 40,5 µl CB zu jedem Well einer neuen **MIDI**-Platte geben.
4. Übertragen Sie 45 µl aus jedem Well der PCR-Platte in das entsprechende Well der MIDI-Platte.
5. Die Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.

6. Die MIDI-Platte 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
7. 10 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
8. Auf einem Magnetstativ für MIDI-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (5 Minuten).
9. Mit einer auf 95 µl eingestellten Pipette den gesamten Überstand aus den einzelnen Wells entnehmen und entsorgen.
10. Zwei Mal wie folgt waschen.
  - a. Wenn sich die Platte auf dem Magnetstativ befindet, 200 µl frisches 80%iges EtOH ohne Mischen hinzufügen.
  - b. 30 Sekunden lang inkubieren.
  - c. Den Überstand entfernen und entsorgen, ohne die Beads zu berühren.
11. Auf dem Magnetstativ 5 Minuten lang an der Luft trocknen lassen.
12. Während des Trocknens an der Luft restliches EtOH mit einer 20-µl-Pipette aus den einzelnen Wells entnehmen und entsorgen.
13. Vom Magnetstativ entfernen und 32 µl RSB zu jedem Well hinzufügen.
14. Die Platte versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.
15. Die Platte 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
16. 10 Sekunden lang bei 280 × g zentrifugieren.
17. Auf einem Magnetstativ für MIDI-Platten platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (2 Minuten).
18. 30 µl Überstand aus der 96-Well-MIDI-Platte in das entsprechende Well einer neuen PCR-Platte übertragen.
19. Die MIDI-Platte entsorgen.

#### SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie den Vorgang stoppen, versiegeln Sie die Platte und lagern Sie sie bis zu 7 Tage lang bei -25 bis -15 °C.

## Angereicherte Bibliotheken prüfen

Für die Quantifizierung von doppelsträngiger gDNA-Zugabe verwenden Sie ein fluoreszenzbasiertes Verfahren mit interkalierendem Farbstoff. Vermeiden Sie Verfahren zur Messung der gesamten Nukleinsäure, wie NanoDrop oder andere UV-Absorptionsverfahren.

1. Führen Sie einen Lauf mit 1 µl der angereicherten Bibliotheken unter Verwendung Ihres Quantifizierungsverfahrens durch.

**HINWEIS** Die Gesamtmolarität der Sonden wirkt sich proportional auf das Bibliotheksergebnis nach der Anreicherung aus.

Erwarten Sie eine mittlere Fragmentgröße von 125–235 bp und eine Verteilung der DNA-Fragmente in einem Größenbereich von ~200 bp bis ~1000 bp.

## Verdünnen von Bibliotheken auf Anfangskonzentration

In diesem Schritt werden die Bibliotheken auf die Anfangskonzentration für Ihr Sequenziersystem verdünnt, wobei dieser Schritt der erste Schritt in einer seriellen Verdünnung ist. Nach der Verdünnung auf die Anfangskonzentration können Bibliotheken denaturiert und auf die Endladekonzentration verdünnt werden.

Für die Sequenzierung empfiehlt Illumina, unabhängig vom verwendeten Anreicherungs-Panel, das Einrichten eines Paired-End-Laufs mit 151 Zyklen pro Read (2 × 151) und Index-Reads mit 10 Zyklen. Wenn Sie weniger überlappende Reads oder eine geringere Roh-Coverage wünschen, können Sie die Sequenzierung auf 2 × 126 oder 2 × 101 reduzieren.

1. Berechnen Sie den Molaritätswert der Bibliothek oder der gepoolten Bibliotheken anhand der folgenden Formel.
  - Für die mit einem DNA-Fragmentanalysator qualifizierten Bibliotheken wird die für die Bibliothek ermittelte Durchschnittsgröße verwendet.
  - Für alle anderen Qualifizierungsverfahren sind 350 bp als durchschnittliche Bibliotheksgröße zu verwenden.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{durchschnittliche Bibliotheksgröße (bp)}} = \text{Molarität (nM)}$$

Wenn Ihre Bibliothekskonzentration beispielsweise 20 ng/μl beträgt und die durchschnittliche Größe 350 bp ist, ergibt sich ein Molaritätswert von 86,58 nM.

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

2. Berechnen Sie anhand des Molaritätswerts die Volumen von RSB und Bibliothek, die zur Verdünnung der Bibliotheken auf die Anfangskonzentration für Ihr System erforderlich sind.

Sequenziersystem	Minimal erforderliches Bibliotheksvolumen (μl)	Anfangskonzentration (nM)	Endladekonzentration (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) oder 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx ] 1,75 nM ist die Ausgangskonzentration für eine Endbelastungskonzentration von 350 pM. Falls erforderlich, die endgültige Ladekonzentration anhand der folgenden Tabelle anpassen.

Endladekonzentration (pM)	Konzentration der Poolbibliothek (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

### 3. Verdünnen von Bibliotheken mit RSB:

- **Als Multiplex-Bibliotheks-Pool quantifizierte Bibliotheken:** Verdünnen Sie den Pool auf die Anfangskonzentration für Ihr System.
- **Individuell quantifizierte Bibliotheken:** Verdünnen Sie jede Bibliothek auf die Anfangskonzentration für Ihr System. Geben Sie 10 µl jeder verdünnten Bibliothek in ein Röhrchen, um einen Multiplex-Bibliotheks-Pool zu erstellen.

### 4. Befolgen Sie die Anweisungen zum Denaturieren und Verdünnen für Ihr System, um auf die Endladekonzentration zu verdünnen.

- Informationen zum NextSeq 550Dx-System finden Sie unter [NextSeq 550Dx-Sequenzierungsvorbereitung auf Seite 52](#).
- Informationen zum MiSeqDx-System finden Sie unter [MiSeqDx-Sequenzierungsvorbereitung auf Seite 54](#).
- Informationen zum NovaSeq 6000Dx System finden Sie unter [NovaSeq 6000Dx-Sequenzierungsvorbereitung auf Seite 56](#).

Die Endladekonzentrationen sind ein Ausgangspunkt und eine allgemeine Richtlinie. Optimieren Sie die Konzentrationen für Ihren Workflow und Ihr Quantifizierungsverfahren in nachfolgenden Sequenzierungsläufen oder durch Fließzellentitration.

## NextSeq 550Dx-Sequenzierungsvorbereitung

Verwenden Sie die folgenden Anweisungen zum Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken für die Sequenzierung mit dem NextSeq 550Dx-Sequenzierungssystem.

## Verbrauchsmaterialien

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

## Vorbereitung

Bereiten Sie eine *frische* Verdünnung von 0,2 N NaOH vor, um Bibliotheken für die Sequenzierung zu denaturieren. Um zu vermeiden, dass kleine Pipettierfehler die NaOH-Konzentration beeinträchtigen, wird ein zusätzliches Volumen vorbereitet.



### VORSICHT

Frisch verdünntes 0,2 N NaOH ist unerlässlich für den Denaturierungsprozess. Durch falsche Denaturierung kann sich die Ergiebigkeit verschlechtern.

1. Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor.

Artikel	Lagerung	Anweisungen
HT1	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz bei Raumtemperatur auftauen. Bei 2 bis 8 °C aufbewahren, bis Sie bereit sind, denaturierte Bibliotheken zu verdünnen.

2. Mischen Sie folgende Volumen in einem Mikrozentrifugenröhrchen, um eine frische Verdünnung von NaOH vorzubereiten:

- Wasser in Laborqualität (800 µl)
- 1 N NaOH (200 µl)

Das Ergebnis ist 1 ml 0,2 N NaOH.

3. Invertieren Sie das Röhrchen zum Mischen mehrmals.

4. Mischen Sie folgende Volumen in einem Mikrozentrifugenröhrchen, um 200 mM Tris-HCl, pH 7,0 vorzubereiten:

- Wasser in Laborqualität (800 µl)
- 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

Das Ergebnis ist 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

### HINWEIS

Halten Sie den Röhrchenverschluss verschlossen. Die frische Verdünnung innerhalb von **12 Stunden** verwenden.

## Denaturieren von Bibliotheken

1. Mischen Sie folgende Volumen der Bibliothek und frisch verdünnte 0,2 N NaOH in einem Mikrozentrifugenröhrchen.

- 10 µl Bibliothek
  - 10 µl 0,2 N NaOH
2. Mischen Sie kurz mit dem Vortexer und zentrifugieren Sie anschließend eine Minute lang bei 280 × g.
  3. Inkubieren Sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur.
  4. Fügen Sie 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7 hinzu.

## Verdünnen denaturierter Bibliotheken auf 20 pM

1. Geben Sie 970 µl vorgekühltes HT1 in das Röhrchen mit denaturierten Bibliotheken.  
Das Ergebnis ist eine 20 pM denaturierte Bibliothek.
2. Mischen Sie kurz mit dem Vortexer und zentrifugieren Sie anschließend eine Minute lang bei 280 × g.
3. Legen Sie die 20 pM-Bibliotheken auf Eis, bis Sie mit der endgültigen Verdünnung fortfahren können.

## Verdünnen von Bibliotheken auf Ladekonzentration

1. Fügen Sie folgende Volumen hinzu, um die denaturierte 20-pM-Bibliothekslösung auf 1,2 pM zu verdünnen.
  - Denaturierte Bibliothekslösung (78 µl)
  - Vorgekühltes HT1 (1222 µl)Das Gesamtvolumen beträgt 1,3 ml bei 1,2 pM.
2. Invertieren Sie zum Mischen und pulscentrifugieren Sie anschließend.
3. Fahren Sie mit der Sequenzierung fort. Anweisungen finden Sie im *Referenzhandbuch für das NextSeq 550Dx-Gerät (Dokumentnr. 100000009513)* und in der *Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Workflow-Anleitung für NextSeq 550Dx (Dokumentnr. 200015671)* oder in *Benutzerhandbuch für die DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on NextSeq 550Dx Application (Dokumentnr. 200025238)*.

## MiSeqDx-Sequenzierungsvorbereitung

Verwenden Sie die folgenden Anweisungen zum Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken für die Sequenzierung mit dem MiSeqDx-Sequenzierungssystem.

### Verbrauchsmaterialien

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1N NaOH

### Vorbereitung

Bereiten Sie eine *frische* Verdünnung von 0,2 N NaOH vor, um Bibliotheken für die Sequenzierung zu denaturieren. Um zu vermeiden, dass kleine Pipettierfehler die NaOH-Konzentration beeinträchtigen, wird ein zusätzliches Volumen vorbereitet.

**VORSICHT**

Frisch verdünntes 0,2 N NaOH ist unerlässlich für den Denaturierungsprozess. Durch falsche Denaturierung kann sich die Ergiebigkeit verschlechtern.

1. Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor.

Artikel	Lagerung	Anweisungen
HT1	-25 bis -15 °C	Lassen Sie das Reagenz bei Raumtemperatur auftauen. Bei 2 bis 8 °C aufbewahren, bis Sie bereit sind, denaturierte Bibliotheken zu verdünnen.

2. Mischen Sie folgende Volumen in einem Mikrozentrifugenröhrchen, um eine frische Verdünnung von NaOH vorzubereiten:

- Wasser in Laborqualität (800 µl)
- 1 N NaOH (200 µl)

Das Ergebnis ist 1 ml 0,2 N NaOH.

**HINWEIS**

Halten Sie den Röhrchenverschluss verschlossen. Die frische Verdünnung innerhalb von **12 Stunden** verwenden.

**Denaturierung einer 4-nM-Bibliothek**

1. Mischen Sie folgende Volumen in einem Mikrozentrifugenröhrchen:
  - 4 nM Bibliothek (5 µl)
  - 0,2 N NaOH (5 µl)
2. Mischen Sie kurz mit dem Vortexer und zentrifugieren Sie anschließend eine Minute lang bei 280 × g.
3. Inkubieren Sie 5 Minuten lang bei Raumtemperatur.
4. Geben Sie 990 µl vorgekühltes HT1 in das Röhrchen mit der denaturierten Bibliothek.  
Das Ergebnis ist 1 ml 20 pM denaturierte Bibliothek.

**Verdünnen von denaturierter 20-pM-Bibliothek**

1. Verdünnen Sie mit den folgenden Volumen auf die gewünschte Konzentration.

Konzentration	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
<b>20 pM Bibliothek</b>	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
<b>Vorgekühltes HT1</b>	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Invertieren Sie zum Mischen und pulscentrifugieren Sie anschließend.

3. Fahren Sie mit der Sequenzierung fort. Anweisungen finden Sie im *MiSeqDx-Gerät Referenzhandbuch für MOS Version 4 (Dokument-Nr. 1000000157953)* und in der *Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Workflow-Anleitung für MiSeqDx (Dokumentnr. 200015661)*.

## NovaSeq 6000Dx-Sequenzierungsvorbereitung

Verwenden Sie die folgenden Anweisungen zum Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken für die Sequenzierung mit dem NovaSeq 6000Dx-Sequenzierungssystem.

### Verbrauchsmaterialien

- HP3 (2 N NaOH)
- RSB (Resuspensionspuffer)
- 1N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- NovaSeq 6000Dx Library Tube

### Vorbereitung

Bereiten Sie eine *frische* Verdünnung von 0,2 N NaOH vor, um Bibliotheken für die Sequenzierung zu denaturieren. Um zu vermeiden, dass kleine Pipettierfehler die NaOH-Konzentration beeinträchtigen, wird ein zusätzliches Volumen vorbereitet.



#### VORSICHT

Frisch verdünntes 0,2 N NaOH ist unerlässlich für den Denaturierungsprozess. Durch falsche Denaturierung kann sich die Ergiebigkeit verschlechtern.

1. Mischen Sie die folgenden Volumina in einem Mikrozentrifugenröhrchen, um 1 N NaOH auf 0,2 N NaOH zu verdünnen:

Tabelle 4 S2-Modus

Reagenz	Volumen für eine Fließzelle ( $\mu$ l)	Volumen für zwei Fließzellen ( $\mu$ l)
Wasser in Laborqualität	40	80
1 N NaOH aus dem Handel	10	20

Diese Volumina ergeben 50  $\mu$ l von 0,2 N NaOH für eine Fließzelle oder 100  $\mu$ l von 0,2 N NaOH für zwei Fließzellen.



Tabelle 5 S4-Modus

Reagenz	Volumen für eine Fließzelle ( $\mu$ l)	Volumen für zwei Fließzellen ( $\mu$ l)
Wasser in Laborqualität	80	160
1 N NaOH aus dem Handel	20	40

Diese Volumina ergeben 100  $\mu$ l von 0,2 N NaOH für eine Fließzelle oder 200  $\mu$ l von 0,2 N NaOH für zwei Fließzellen.

- Zum Mischen mehrmals invertieren oder einen Vortexer benutzen.
- Mischen Sie folgende Volumen in einem Mikrozentrifugenröhrchen, um 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 vorzubereiten:

- Wasser in Laborqualität (600  $\mu$ l)
- 1M Tris-HCl, pH 8,0 (400  $\mu$ l)

Das Ergebnis ist 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0

**HINWEIS** Halten Sie den Röhrchenverschluss verschlossen. Die frische Verdünnung innerhalb von **12 Stunden** verwenden.

## Erstellen eines normalisierten Bibliothekspools

Die Ladekonzentration variiert abhängig von der Methode für Bibliotheksvorbereitung, Quantifizierung und Normalisierung.

Gehen Sie nach den folgenden Anweisungen vor, um Bibliotheken auf die entsprechende Konzentration zu normalisieren und dann zu poolen. Bibliotheken, die auf derselben Durchflusszelle sequenziert werden, müssen zu einem gemeinsamen normalisierten Pool kombiniert werden.

**HINWEIS** Die maximale Anzahl von Proben, die pro Bahn mit dem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit analysiert werden können, ist 192. Dieser Grenzwert ist auf die Gesamtzahl der UD-Indizes in Satz A und B zurückzuführen.

## Normalisierung von Bibliotheken für das Pooling

- Bestimmen Sie die erforderliche Konzentration für die Poolbibliothek basierend auf der Endladekonzentration.
  - Für eine Endladekonzentration von 350 pM beträgt die erforderliche gepoolte Bibliothekskonzentration 1,75 nM.

- Informationen zur Bestimmung der gepoolten Bibliothekskonzentration für eine andere Endladekonzentration finden Sie unter [Verdünnen von Bibliotheken auf Anfangskonzentration auf Seite 51](#).
2. Normalisieren Sie Bibliotheken auf die gewünschte Konzentration der Poolbibliothek mithilfe von 10 mM Tris-HCL, pH 8,5.  
Hilfe zur Verdünnung von Bibliotheken auf die entsprechende Konzentration finden Sie im [Pooling-Rechner](#) auf der Illumina-Website.

### Empfohlene Ladekonzentrationen

Die optimale DNA-Ladekonzentration ist vom Bibliothekstyp und der Eingabegröße abhängig. Bei Bibliotheken > 450 bp sind möglicherweise höhere Ladekonzentrationen erforderlich.

## Zusammenfassen normalisierter Bibliotheken in einem Pool und Hinzufügen einer optionalen PhiX-Kontrolle

1. Mischen Sie das entsprechende Volumen der einzelnen normalisierten Bibliotheken in einem neuen Mikrozentrifugenröhrchen, um eines der folgenden Endvolumina zu erhalten:

Modus	Endvolumen (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Optional]** Gehen Sie beim Spike-in von 1 % nicht denaturierter PhiX-Kontrolle wie folgt vor.
  - a. Verdünnen Sie 10 nM PhiX auf 2,5 nM mithilfe von 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
  - b. Fügen Sie das entsprechende Volumen an nicht denaturierten 2,5 nM PhiX zu dem Röhrchen mit dem nicht denaturierten Bibliothekspool hinzu.

Modus	Nicht denaturierter 2,5 nM PhiX (µl)	Nicht denaturierter Bibliothekspool (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Beim Spike-in der PhiX-Kontrolle ist 1 % die empfohlene Menge für gut ausgewogene Bibliotheken. Für Bibliotheken mit geringer Diversität kann mehr erforderlich sein. Um eine PhiX-Kontrolle bei Bibliotheken mit geringer Diversität zu verwenden, wenden Sie sich zur Unterstützung an den technischen Kundendienst von Illumina.

## Denaturieren des Bibliothekspools und optionale PhiX-Kontrolle

1. Geben Sie wie folgt 0,2 NaOH in das Röhrchen mit dem nicht denaturierten Bibliothekspool und der optionalen PhiX-Kontrolle.

Fließzelle	0,2 N NaOH	Nicht denaturierter Bibliothekspool (µl)	Endvolumen
S2	37	150	187 µl oder 187,9 µl mit PhiX
S4	77	310	387 µl oder 388,9 µl mit PhiX

2. Verschließen Sie das Röhrchen und mischen Sie es kurz mit dem Vortexer.
3. Zentrifugieren Sie es bis zu eine (1) Minute lang bei 280 × g.
4. Inkubieren Sie es 8 Minuten lang bei Raumtemperatur, um es zu denaturieren.
5. Geben Sie 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 folgendermaßen zum Neutralisieren hinzu.

Modus	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Endvolumen
S2	38	225 µl oder 225,9 µl mit PhiX
S4	78	465 µl oder 466,9 µl mit PhiX

6. Verschließen Sie das Röhrchen und mischen Sie es kurz mit dem Vortexer.
7. Zentrifugieren Sie es bis zu eine (1) Minute lang bei 280 × g.
8. Geben Sie das Gesamtvolumen der denaturierten Bibliothek oder der denaturierten Bibliothek mit PhiX in das Bibliotheksröhrchen des NovaSeq 6000Dx.
9. Fahren Sie mit der Sequenzierung fort. Anweisungen finden Sie in der *Produktdokumentation des NovaSeq 6000Dx-Geräts (Dok.-Nr. 200010105)* und in *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx für NovaSeq 6000Dx (Dok.-Nr. 200014776)*.

## Fehlerbehebung

In der folgenden Tabelle finden Sie Hinweise zur Behebung von Fehlern im Workflow. Wenn ein Sequenzierungslauf oder eine Bibliotheksvorbereitung für eine Probe zweimal fehlschlägt, sind möglicherweise weitere Schritte zur Fehlerbehebung erforderlich. Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.

Problem	Möglich Ursache	Empfohlen Aktion
Der Sequenzierungslauf entspricht nicht dem Qualitätskontrolllauf. Spezifikationen	Anwendungsfehler oder fehlerhafte Laborausüstung im Assay-Workflow	<p>Qualifizieren Sie angereicherte Bibliotheken, um ein angemessenes Bibliotheksergebnis und eine angemessene Fragmentgrößenverteilung sicherzustellen. Wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung ab einem der folgenden Schritte, je nachdem, in welcher Phase der vermutete Anwendungs- oder Ausrüstungsfehler aufgetreten ist. Ist dies nicht bekannt oder sind weitere Fehler aufgetreten, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Sequenzieren Sie die Bibliotheken erneut. Siehe <a href="#">NextSeq 550Dx-Sequenzierungsvorbereitung auf Seite 52</a>, <a href="#">MiSeqDx-Sequenzierungsvorbereitung auf Seite 54</a> oder <a href="#">NovaSeq 6000Dx-Sequenzierungsvorbereitung auf Seite 56</a>.</li> <li>Reichern Sie die Bibliotheken erneut an. Siehe <a href="#">Hybridisieren von Sonden auf Seite 39</a>.</li> <li>Beginnen Sie mit der Bibliotheksvorbereitung ab dem Start des Workflows. Siehe <a href="#">Gebrauchsanweisung auf Seite 23</a>.</li> </ul>
	Geräteproblem	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Fehler bei der FASTQ-Erstellung oder allgemeiner Sequenziersystemfehler (z. B. Netzwerkfehler, Fehler beim Laden/Entladen der Reagenzien usw.)	Software- oder Geräteproblem	<p>Informationen zur Analyse finden Sie im Modul- oder Anwendungshandbuch oder in der Produktdokumentation des <i>NextSeq 550Dx Gerät Referenzhandbuch (Dokument-Nr. 1000000009513)</i>, <i>MiSeqDx-Gerät Referenzhandbuch für MOS Version 4 (Dokument-Nr. 1000000157953)</i> oder <i>NovaSeq 6000Dx-Geräts (Dokumentnr. 200010105)</i>. Weitere Unterstützung erhalten Sie vom technischen Support von Illumina.</p>

Problem	Möglich Ursache	Empfohlen Aktion
Die DNA-Bibliothek liefert kein ausreichendes Ergebnis für die Sequenzierungsladung	Die Anforderungen hinsichtlich der Probenzugabe wurden nicht erfüllt.	Stellen Sie die ordnungsgemäße Probenzugabe sicher und wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung. Siehe <a href="#">Empfehlungen für Probenzugaben auf Seite 19</a> .
	Anwendungs- oder Ausrüstungsfehler im Assay-Workflow	<p>Wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung ab einem der folgenden Schritte, je nachdem, in welcher Phase der vermutete Anwendungs- oder Ausrüstungsfehler aufgetreten ist. Ist dies nicht bekannt oder sind weitere Fehler aufgetreten, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sequenzieren Sie die Bibliotheken erneut. Siehe <a href="#">NextSeq 550Dx-Sequenzierungsvorbereitung auf Seite 52</a>, <a href="#">MiSeqDx-Sequenzierungsvorbereitung auf Seite 54</a> oder <a href="#">NovaSeq 6000Dx-Sequenzierungsvorbereitung auf Seite 56</a>.</li> <li>• Reichern Sie die Bibliotheken erneut an. Siehe <a href="#">Hybridisieren von Sonden auf Seite 39</a>.</li> <li>• Beginnen Sie mit der Bibliotheksvorbereitung ab dem Start des Workflows. Siehe <a href="#">Gebrauchsanweisung auf Seite 23</a>.</li> </ul>
	Die Anforderungen für das Anreicherungsplatten-Panel wurden nicht erfüllt	Sorgen Sie für ein geeignetes Anreicherungsplatten-Panel und wiederholen Sie die Bibliotheksvorbereitung. Siehe <a href="#">Anforderungen an Anreicherungsplatten-Panels auf Seite 11</a> .

## Leistungsmerkmale

### Leistung mit Gesamtexom-Panels

Die Leistung des Exom-Panels wurde unter Verwendung der niedrigsten (50 ng) und höchsten (1000 ng) empfohlenen Zugabe an Coriell Cell Line gDNA NA12878 mit einem bekannten Referenzsatz für die Erkennung von Keimbahnvarianten (Platin-Genom von Coriell) getestet. Exom-Panel 1 (45 Mb) und Exom-Panel 2 (36,8 Mb) wurden als repräsentative Panels verwendet. 24 technische Replikate wurden mit dem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-Assay unter Verwendung von Exom-Panel 1 (45 Mb) in zwei 12-Plex-Anreicherungsreaktionen getestet. 12 technische Replikate wurden mit dem Illumina DNA Prep with Enrichment

Dx-Assay unter Verwendung von Exom-Panel 2 (36,8 Mb) in einer einzigen 12-Plex-Anreicherungsreaktion getestet. Die angereicherten Bibliotheken wurden auf einem NextSeq 550Dx-Sequenziersystem mit dem DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager-Modul sequenziert.

Die folgende Tabelle zeigt die Mittelwerte der sekundären Sequenzierungs- und Varianten-Calling-Leistungsmetriken für die mit jedem Panel getesteten technischen Replikate.

Tabelle 6 Assay-Leistung mit zwei Gesamtexom-Panels

Panel	Eindeutige Read-Anreicherung mit Auffüllung	Einheitlichkeit der Coverage	Median der Fragmentlänge	SNV-Recall <sup>1</sup>	SNV-Genauigkeit <sup>2</sup>	Indel-Recall <sup>1</sup>	Indel-Genauigkeit <sup>2</sup>
Exom-Panel 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Exom-Panel 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

<sup>1</sup> Recall=Positive/(richtig Positive + falsch Negative)

<sup>2</sup> Genauigkeit=richtig Positive/(richtig Positive + falsch Positive)

## Nachweisgrenze

Der Horizon HD799 DNA-Referenzstandard wurde verwendet, um die Nachweisgrenze zu testen. HD799 besteht aus mäßig beeinträchtigter, mit Formalin behandelter DNA mit bekannten SNVs in Allelhäufigkeiten von 1–24,5 %. Es wurde der niedrigste empfohlene DNA-Input (50 ng) verwendet und die Erkennungsrate von SNVs mit  $\geq 5,0$  % Variantenallelhäufigkeit (variant allele frequency, VAF) bewertet. 16 technische Replikate wurden mit dem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-Assay unter Verwendung des FFPE-Workflows getestet, mit einem Pan-Krebs-Anreicherungspanel (1,94 Mb) in 16 (1-Plex) Anreicherungen angereichert und dann auf einem NextSeq 550Dx-Gerät mit dem DNA GenerateFASTQ Dx-Modul sequenziert.

Alle Proben erfüllten die in der nachstehenden Tabelle aufgeführten panelspezifischen Anforderungen an die Probenleistung.

Tabelle 7 Probenleistung für die Nachweisgrenze

Panel	Varietenerkennungsrate der SNVs von $\geq 5,0$ % VAF	Durchschnitt Einheitlichkeit der Coverage
Pan-Krebs-Anreicherungspanel (1,94 Mb, 523 Gene)	100 %	99 %

## Störende Substanzen

Die Einschätzung der Auswirkungen potenzieller Störfaktoren erfolgte für Illumina DNA Prep with Enrichment Dx durch Bewertung der Leistung des Assays unter Einwirkung von Störsubstanzen.

### Interferenzen im Vollblut

Acetaminophen (exogene Verbindung, Arzneimittel), Kreatinin und Triglyceride (endogene Metaboliten) wurden getestet, indem menschliche Vollblutproben vor der DNA-Extraktion damit versetzt wurden. Um die Störungen aufgrund der Blutentnahme (geringe Menge) zu untersuchen, wurde EDTA auch in Vollblutproben versetzt. Um die Interferenz durch die Probenvorbereitung zu bewerten, wurde die aus Vollblut extrahierte DNA zusätzlich mit Ethanol in Molekularqualität versetzt.

Die folgende Tabelle zeigt die Testkonzentrationen pro Störfaktor.

Tabelle 8 Potenziell störende Substanzen und Konzentrationen, die in Vollblut getestet wurden

Testsubstanz	Testkonzentration
Acetaminophen	15,6 mg/dl* Das Dreifache der höchsten Konzentration, die nach einer therapeutischen Dosis eines Arzneimittels zu erwarten ist.
Kreatinin	15 mg/dl* Höchste beobachtete Konzentration in der Population.
Triglyceride	1,5 g/dl* Höchste beobachtete Konzentration in der Population.
EDTA	6 mg/ml Das Dreifache der im Blut erwarteten Konzentration, gesammelt in EDTA-Röhrchen.
Ethanol molekularer Qualität	15 % v/v Im Eluat nach der DNA-Extraktion.

\* Gemäß CLSI EP37-ED1:2018

Pro Störsubstanz wurden 12 technische Replikate mit dem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Assay getestet, mit Exom-Panel 1 (45 Mb) in einer einzelnen Anreicherung (12-Plex) angereichert und dann auf einem NextSeq 550Dx-Gerät mit dem DNA GenerateFASTQ Dx-Modul sequenziert.

Bei der getesteten Substanz erfüllten alle 12 Proben die Anforderungen an die Probenleistung, und es wurde keine Beeinträchtigung der Assay-Leistung festgestellt.

### Interferenzen in FFPE-Gewebe

Zwei kolorektale FFPE-Proben wurden in Anwesenheit und Abwesenheit von Hämoglobin in einer Menge von 0,1 mg pro 10 µm FFPE-Schnitt getestet, um ein Worst-Case-Szenario von 50 % Kontamination der FFPE-Gewebeproben mit Blut mit hohem Hämoglobingehalt darzustellen. Die Proben wurden mit dem Illumina DNA

Prep with Enrichment Dx Assay unter Verwendung des Pan-Krebs-Anreicherungspanels 1 (1,94 Mb) als repräsentatives Panel in Single-Plex-Anreicherungen getestet. Die angereicherten Bibliotheken wurden dann auf einem NextSeq 550Dx-Gerät mit dem DNA GenerateFASTQ Dx-Modul sequenziert. Alle Proben erfüllten die Anforderungen an die Probenleistung, und es wurde nachgewiesen, dass Hämoglobin die Leistung des Assays nicht beeinträchtigt.

Zur Bewertung von Interferenzen, die sich aus der Probenvorbereitung ergeben, wurde die aus einer FFPE-Gewebeprobe von Blasenkrebs extrahierte DNA mit zwei körperfremden Verbindungen versetzt. Die getesteten körperfremden Substanzen sind Extraktionslösungen, die häufig während der DNA-Extraktion verwendet werden. Sie sind unter Angabe der Testmengen in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Die Lösungen der Testsubstanzen sind in säulenbasierten DNA-Isolierungskits im Handel erhältlich.

Tabelle 9 Potenziell störende körperfremde Substanzen und Konzentrationen, die in FFPE getestet wurden

Testsubstanz	Testkonzentration (µl / 30 µl Eluat)
Deparaffinierungslösung	113 x 10 <sup>-6</sup>
Waschpuffer AW2	0,417

Pro Störsubstanz wurden acht technische Replikate mit dem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Assay getestet, mit einem Pan-Krebs-Anreicherungspanel (1,94 Mb) in 1-Plex-Anreicherungen angereichert und dann auf einem NextSeq 550Dx-Gerät mit dem DNA GenerateFASTQ Dx-Modul sequenziert.

Bei beiden getesteten Substanzen erfüllten alle acht Proben die Anforderungen an die Probenleistung, und es wurde keine Beeinträchtigung der Assay-Leistung festgestellt.

## Kreuzkontamination

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (weiblich, 10 Proben), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (männlich, 12 Proben) und Negativkontrollen (NTC, 2 Proben) wurden mit dem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-Assay in einem Schachbrett-Plattenlayout getestet. Für alle Proben wurde die höchste empfohlene gDNA-Zugabe (1000 ng) als strengste Bedingung für die Bewertung der Probenkreuzkontaminierung verwendet. Die Tests wurden zweimal von zwei verschiedenen Mitarbeitern durchgeführt. Exom-Panel 1 (45 Mb) wurde in 12-Plex-Anreicherungsreaktionen verwendet. Die angereicherten Bibliotheken wurden auf einem NextSeq 550Dx mit dem DNA GenerateFASTQ Dx sequenziert. Die Bewertung erfolgte durch die Beurteilung der Coverage des für männliche Proben spezifischen Y-Chromosoms in den weiblichen Proben durch Vergleich mit den Hintergrundwerten einer vollständigen Platte mit weiblichen Proben sowie der Indexdarstellung der NTC-Proben.

Tabelle 10 Kreuzkontaminationsergebnisse

Weibliche Proben mit männlicher Y-Chromosom-Coverage in < 3x Baseline-Rauschen	Indexdarstellung in NTC
100 %	< 0,0005 %



## Leistung der DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application

Die Leistungsmerkmale der DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NovaSeq 6000Dx sind in der *Packungsbeilage des NovaSeq 6000Dx-Geräts (Dok.-Nr. 200025276)* angegeben.

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx auf NextSeq 550Dx bietet die gleichen sekundären Analyse-Workflows wie die Anwendung auf dem NovaSeq 6000Dx, einschließlich der folgenden drei Workflows: FASTQ-Generierung, FASTQ- und VCF-Generierung für die Keimbahnvarianten-Erkennung und FASTQ- und VCF-Generierung zur Erkennung somatischer Varianten.

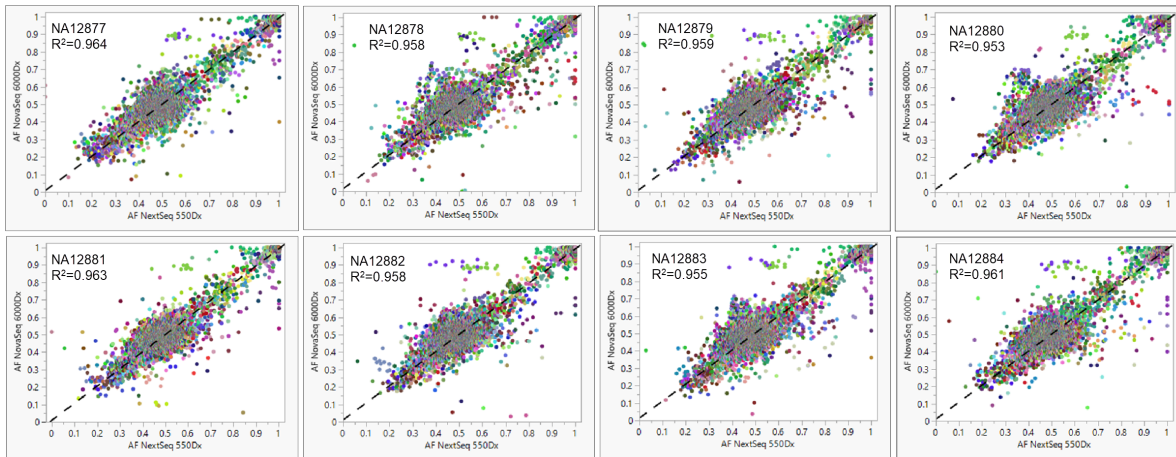
Es wurde eine vergleichbare sekundäre Analyseleistung erzielt, wenn dieselbe Bibliotheksvorbereitung auf beiden Plattformen sequenziert wurde. Die Variantenerkennungsrate ([Tabelle 11](#)) und die Übereinstimmung der Häufigkeit ([Abbildung 1](#)) für Coriell Cell Line gDNA-Proben wurden mit einem repräsentativen Assay durch Abfrage einer Vielzahl von Genen bewertet, die 1.970.505 Basen (9.232 Ziele) über alle 23 menschlichen Chromosomen abdecken. Acht Platinum Genome DNA-Proben wurden getestet, sieben in Replikaten von sechs (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) und eine (NA12881) in Replikaten von fünf (siehe [Abbildung 1](#)). Bibliotheken wurden mit jeweils drei Läufen auf den Geräten NovaSeq 6000Dx und NextSeq 550Dx sequenziert und das Varianten-Calling erfolgte unter Verwendung der FASTQ- und VCF-Generierung für den Analyse-Workflow der DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application zur Keimbahnvarianten-Erkennung.

Basierend auf der sehr ähnlichen Anwendungsleistung auf den Geräten NovaSeq 6000Dx und NextSeq 550Dx gelten die in der *Packungsbeilage des NovaSeq 6000Dx-Geräts (Dokumenten-Nr. 200025276)* aufgeführten Leistungsmerkmale im Zusammenhang mit der Sekundäranalyse ebenfalls für Die Anwendung DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on the NextSeq 550Dx.

Tabelle 11 Application Performance – Erkennungsrate von Varianten für SNVs, Insertionen und Deletionen

Panel	Variantenerkennungsrate auf NovaSeq 6000Dx	Variantenerkennungsrate auf NextSeq 550Dx
Pan-Genom-Panel (1,97 MB, 9.232 Ziele, 23 Chr.)	99,9 %	99,9 %

Abbildung 1 Variantenhäufigkeitsvergleich von Läufen auf NovaSeq 6000Dx und NextSeq 550Dx mit Analyse anhand der DRAGEN for IDPE Dx Application



## Anhang: Illumina UD Indizes-Adaptersequenzen

Diese eindeutigen dualen (UD) Indexadapter sind in der Platte angeordnet, um die empfohlene Paarungsstrategie durchzusetzen. Die Indexadapter sind 10 Basen lang, statt der üblichen acht Basen.

### Index 1 (i7) Adapter

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [ i7 ] GTCTCGTGGGCTCGG

### Index 2 (i5) Adapter

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [ i5 ] TCGTCGGCAGCGTC

Die folgende Sequenz wird für das Trimmen der Read 1- und Read 2-Adapter verwendet.

CTGTCTCTTATACATCT

## Platte A/Set 1 Indexadapter

Bezeichnung des Index	i7 Basen in Adapter	i5 Basen in Adapter
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA

Bezeichnung des Index	i7 Basen in Adapter	i5 Basen in Adapter
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG

Bezeichnung des Index	i7 Basen in Adapter	i5 Basen in Adapter
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC

Bezeichnung des Index	i7 Basen in Adapter	i5 Basen in Adapter
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGCACTAATG	TGACTACATA
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGGT	CTCATAGCGA
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	GGTGGAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

## Platte B/Set 2 Indexadapter

Bezeichnung des Index	i7 Basen in Adapter	i5 Basen in Adapter
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Bezeichnung des Index	i7 Basen in Adapter	i5 Basen in Adapter
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCCTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCTTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA

Bezeichnung des Index	i7 Basen in Adapter	i5 Basen in Adapter
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGTAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCTGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC



Bezeichnung des Index	i7 Basen in Adapter	i5 Basen in Adapter
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCOA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

## Revision History (Versionsverlauf)

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 200038118 Version 00	Juli 2023	<p>Erste Version. Vorheriges Dokument 200019584 durch dieses ersetzt. Änderungen in diesem Dokument gegenüber Dokument 200019584 Version 2:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhalt zur Unterstützung der Sequenzierung auf dem NextSeq 550Dx-Gerät mit DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application für NextSeq 550Dx hinzugefügt.</li> <li>• Liste der nicht bereitgestellten Reagenzien klarer gestaltet.</li> <li>• Informationen zur Meldung von Vorfällen zu „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“ hinzugefügt.</li> <li>• Erwartungen an die Anreicherungsbibliotheken verdeutlicht.</li> <li>• Anweisung zur Herstellung von 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 ergänzt.</li> <li>• Tippfehler im Schritt der Sequenzierungsvorbereitung berichtigt.</li> </ul> <p>Vorangegangene Änderungen an Dokument 200019584:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhalt zur Unterstützung der Sequenzierung auf dem NovaSeq 6000Dx-Gerät ergänzt.</li> <li>• Namen von Sequenzierungssystemen und Katalognummern hinzugefügt.</li> <li>• Informationen zur eindeutigen doppelten Indizierung für einfach indizierte Bibliotheken entfernt.</li> </ul>

## Patente und Marken

Dieses Dokument und sein Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. sowie deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit der Verwendung des hier beschriebenen Produkts/der hier beschriebenen Produkte und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Dokument und sein Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina zu keinem anderen Zweck verwendet oder verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichem Recht bzw. ähnlichen Rechten an Dritte.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Verwendung des Produkts/der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTE ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN UND JEGLICHE FÜR DAS PRODUKT/DIE PRODUKTE GELTENDE GEWÄHRLEISTUNG ERLISCHT.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

© 2023 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktinformationen



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
92122 San Diego, Kalifornien, USA  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



### Australischer Sponsor

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

## Produktkennzeichnungen

Die vollständige Referenz der Symbole, die auf der Produktverpackung und -beschriftung verwendet werden, finden Sie im Symbolschlüssel unter „support.illumina.com“ auf der Registerkarte „Documentation“ (Dokumentation) für Ihr Kit.