

TIKAI IN VITRO DIAGNOSTIKAS NOLŪKIEM. TIKAI EKSPORTAM.

Paredzētais lietojums

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx komplekts ir reaģentu un palīgmateriālu kopums, ko izmanto, lai sagatavotu paraugu bibliotēkas no genoma DNS, kas iegūta no cilvēka šūnām un audiem un izstrādātu *in vitro* diagnostiskās analīzes. Lietotāja nodrošināti zondes paneļi ir nepieciešami, lai sagatavotu bibliotēkas, kuru mērķauditorija ir specifiski interesējošie genoma reģioni. Ģenerētās paraugu bibliotēkas ir paredzētas lietošanai Illumina sekvencēšanas sistēmās. Illumina® DNS Prep with Enrichment Dx ietver programmatūru sekvencēšanas cikla iestatīšanai, uzraudzībai un analīzei.

Procedūras principi

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts ir paredzēts manuālai DNS sekvencēšanas bibliotēku sagatavošanai mērķa apgabaliem genoma DNS, kas iegūtas no cilvēka šūnām un audiem.

Mērķa bagātināšanai ir nepieciešami lietotāja nodrošināti biotilēti oligonukleotīdu paneļi. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts ir saderīgs ar dažādu izmēru paneļiem, ieskaitot mazus paneļus (< 20.000 probes) to large panels (> 200 000 zondes). Ģenerētās bagātinātās bibliotēkas ir paredzētas sekvencēšanai Illumina sekvencēšanas sistēmās.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts procedūra sastāv no tālāk norādītajām darbībām.

- **Genoma DNS atzīmēšana** – izmanto Enrichment BLT Small (eBLTS), lai atzīmētu DNS ievadi. Atzīmēšanas laikā ar vienu darbību gDNS tiek fragmentēta un atzīmēta ar adapteriem. Lai piesātinātu eBLTS atzīmēšanas reakcijā, nepieciešama minimālā DNS ievade 50 ng. Pēc piesātināšanas, eBLTS fragmentē noteiktu DNS molekulu skaitu, lai ģenerētu normalizētas bibliotēkas ar nemainīgu fragmentu lieluma sadalījumu.
- **Tīrīšana pēc atzīmēšanas** – tīra uz eBLTS ar adapteri apzīmēto DNS, lai izmantotu amplificēšanai.
- **Atzīmēto DNS amplificēšana** – amplificē atzīmēto DNS, izmantojot ierobežota cikla PĶR programmu. DNS fragmentu galos tiek pievienoti unikālie duālie (UD) rādītāji, kas nodrošina DNS bibliotēku duālu unikālu svītrkodu un klasteru ģenerēšanu sekvencēšanas laikā.
- **Bibliotēku tīrīšana** – izmanto lodīšu tīrīšanas procedūru, lai attīrītu un atlasītu izmēru amplificētajām DNS bibliotēkām.
- **Bibliotēku apvienošana** – apvieno DNS bibliotēkas ar unikāliem rādītājiem vienā kopā ar līdz pat 12 bibliotēkām. Bibliotēkas var apvienot pēc tilpuma vai pēc svara.
- **Zonžu hibridizēšana** – ietver hibridizācijas reakciju, kuras laikā divkāršās spirāles DNS bibliotēkas tiek denaturētas, un biotilēto DNS zonžu panelis tiek hibridizēts mērķa genoma reģionos.
 - Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts ir saderīgs ar vairākiem paneļiem. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts neietver bagātināšanas paneli. Zonžu paneļus nodrošina lietotājs, un tiem jāatbilst nepieciešamajām specifiskajām. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts reaģenti ir

saderīgi gan ar Illumina, gan ar trešās personas bagātināšanas DNS oligonukleotīdu paneļiem, kas atbilst nepieciešamajām specifikācijām. Informāciju par nepieciešamajām specifikācijām trešo personu paneļiem skatiet [Bagātināšanas zondes paneļa prasības, 11. lpp](#)

- **Hibridizēto zonžu tveršana** – izmanto Streptavidin Magnetic Beads (SMB3), lai tvertu biotinilētās zondes, kas hibridizētas mērķa intereses reģionos.
- **Bagātināto bibliotēku amplificēšana** – izmanto PĶR, lai amplificētu bagātinātās bibliotēkas.
- **Amplificēto, bagātināto bibliotēku tīrīšana** – izmanto lodīšu attīrīšanas procedūru, lai attīrītu bagātinātās bibliotēkas un sagatavotu sekvencēšanai.
- **Sekvēncēšana** – bagātināto bibliotēku sekvencēšana tiek veikta ar MiSeqDx, NextSeq 550Dx vai NovaSeq 6000Dx sekvencēšanas sistēmām. MiSeqDx un NextSeq 550Dx instrumentos tiek izmantots integrēts DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager modulis, lai veiktu sekvencēšanas izpildes iestatīšanu, izpildes uzraudzību un FASTQ ģenerēšanu no noteiktajām bāzēm. NextSeq 550Dx with DRAGEN Server un NovaSeq 6000Dx instrumentiem tiek izmantota DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lietojumprogramma, lai veiktu izpildes iestatīšanu un sekundāro analīzi, izmantojot vairākas pieejamās darbplūsmas.

Procedūras ierobežojumi

- Tikai *in vitro* diagnostikas nolūkiem.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts ir saderīgs ar genoma DNS, kas iegūta no cilvēka šūnām un audiem.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts ir saderīgs ar dubultspirāles gDNS ievadi 50–1000 ng. Veiktspēja netiek garantēta ar ievadēm ārpus šīm robežām.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts neietver reaģentus DNS ekstrakcijai. Analītiskās testēšanas rezultāti, tostarp traucējumu testēšana, kas sniegta [Veiktspējas raksturlielumi, 59. lpp](#), ir iegūti, izmantojot pilnasiņu un FFPE paraugus kā raksturīgu paraugu veidus ar raksturīgiem DNS ekstrakcijas komplektiem. Visiem diagnostikas testiem, kas izstrādāti lietošanai ar Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts reaģentiem, nepieciešama pilna visu veiktspējas aspektu validācija, izmantojot izvēlēto DNS ekstrakcijas komplektu.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts nav ieteicams sliktas kvalitātes FFPE paraugiem ar $\Delta Cq > 5$. Paraugu izmantošana ar $\Delta Cq > 5$ var palielināt bibliotēkas sagatavošanas kļūmes un samazināt analīzes veiktspēju.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts reaģenti ir konfigurēti un testēti attiecībā uz paraugu ievadi, bagātināšanas reakcijām un pavairošanas kārtām, kas norādītas tālāk sniegtajā tabulā.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts	Parauga ievade	Bagātināšanas reakcijas	Bagātināšanas pavairošanas kārtas
16 paraugu komplekts	Zema kvalitāte (FFPE)	16 reakcijas	1 kārtā
96 paraugu komplekts	Augsta kvalitāte (piem., pilnasinis)	8 reakcijas	12 kārtas

- FFPE ievades apstrāde ir pārbaudīta un ir ieteicama tikai 1 kārtas bagātināšanas reakcijām, izmantojot 16 paraugu komplektu.
- Komplektā ar 96 paraugiem ir iespējamās nestandarta pavairošanas kārtas (no 2 kārtām līdz 11 kārtām), bet tām ir šādi ierobežojumi:
 - paraugu apstrāde 2 kārtu līdz 11 kārtu bagātināšanas reakcijās samazina komplekta caurlaidību.
 - Optimāli rezultāti netiek garantēti. Lai iegūtu piemērotu bagātināšanas rezultātu nestandarta bagātināšanas kārtām, var būt nepieciešama papildu optimizācija.
 - Zemu kārtu apvienošanas stratēģijām (no 2 kārtām līdz 8 kārtām), jāizvēlas rādītāju adapteri ar dažādām sekvencēm, lai optimizētu krāsu balansu veiksmīgai sekvencēšanai un datu analīzei. MiSeqDx un NextSeq 550Dx DNA GenerateFASTQ Dx modulis nodrošina krāsu balansa rādītāju kombinācijas izpildes iestatīšanas laikā. Papildinformāciju par apvienošanas stratēģijām skatiet sadaļā [Apvienošanas metodes, 35. lpp.](#)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts spēj nodrošināt bagātinātas bibliotēkas, kuras ir sekvencētas tikai ar MiSeqDx, NextSeq 550Dx un NovaSeq 6000Dx. Citu sekvencēšanas sistēmu izmantošanai nepieciešama pilnīga visu darbības aspektu validācija.
- Bagātināšanas paneļi nav iekļauti šī izstrādājuma komplektācijā. Analītiskās testēšanas rezultāti, kas sniegti sadaļā [Veiktspējas raksturlielumi, 59. lpp.](#), ir iegūti, izmantojot raksturīgus bagātināšanas paneļus, un ir sniegti tikai informatīvos nolūkos. Analītiskās veiktspējas raksturlielumi paredzēti, lai skaidrotu analīzes vispārējās iespējas un nesatur apgalvojumus par noteiktas analīzes spējām vai piemērotību. Visiem diagnostikas testiem, kas izstrādāti lietošanai ar šiem reaģentiem, nepieciešama pilnīga visu veiktspējas aspektu validācija.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts ir saderīgs gan ar Illumina, gan ar trešo personu bagātināšanas paneļiem. Tomēr trešo personu bagātināšanas paneļu veiktspēja, kas neatbilst paneļu prasībām, netiek garantēta. Informāciju par paneļu prasībām skatiet sadaļā [Bagātināšanas zondes paneļa prasības, 11. lpp.](#)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts izmanto 2 stundu hibridizācijas laiku. Ilgāka hibridizācijas laika izmantošana var ietekmēt veiktspējas rādītājus.
- MiSeqDx un NextSeq 550Dx DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager moduļi nodrošina tikai FASTQ failus. Ja izmantojat šos moduļus, jums jāveic sekundārās analīzes validācija.

- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lietojumprogramma ir pieejama NextSeq 550Dx ar DRAGEN Server un NovaSeq 6000Dx. Lietojumprogramma atbalsta vairākas sekundārās analīzes darbplūsmas, tostarp, FASTQ ģenerēšanu, FASTQ un VCF ģenerēšanu dzimumšūnas līniju variantu noteikšanai un FASTQ un VCF ģenerēšanu somatisko variantu noteikšanai. Ja izmantojat lietojumprogrammu VCF ģenerēšanai, sekundārās analīzes validācija nav jāveic. Lietojumprogrammas ierobežojumi ietver šādus:
 - Insercijas > 18 bp un garuma delēcijas > 21 bp nav apstiprinātas.
 - Lieli varianti, tostarp multinukleotīdi varianti (MNV) un lielas insercijas/delēcijas izvades VCF failā var tikt ziņoti kā atsevišķi mazāki varianti.
 - Mazi MNV izvades VCF failā tiek ziņoti kā atsevišķi varianti.
 - Par delēcijām tiek ziņots VCF failā pie iepriekšējās bāzes koordinātas atkarībā no VCF formāta. Tāpēc izvērtējiet blakus esošos variantus, pirms ziņojat, ka atsevišķa bāze ir noteikta kā homozigotiska atsauce.
 - Dzimumšūnas līnijas ierobežojumi.
 - DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx dzimumšūnas līniju FASTQ un VCF ģenerēšanas analīzes darbplūsma ir paredzēta, lai sniegtu kvalitatīvus rezultātus dzimumšūnas līniju variantu noteikšanai (piem., homozigotiska, heterozigotiska, savvaļas tipa).
 - Kopiju skaita variācijas var ietekmēt to, vai variants tiek identificēts kā homozigotisks vai heterozigotisks.
 - Sistēma vienā atrašanās vietā neziņos vairāk par diviem variantiem, pat pastāvot kopiju skaita variācijām.
 - Somatiskie ierobežojumi.
 - DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lietojumprogrammas somātiskās FASTQ un VCF ģenerēšanas analīzes darbplūsma ir paredzēta, lai sniegtu kvalitatīvus rezultātus somātisko variantu noteikšanai (t. i., somātiskā varianta klātbūtne).
 - Somātiskās FASTQ un VCF ģenerēšanas analīzes darbplūsma nespēj noteikt atšķirību starp dzimumšūnas līniju un somatiskajiem variantiem. Darbplūsma ir paredzēta, lai konstatētu variantus dažāda variantu biežuma diapazonā, bet variantu biežumu nevar izmantot, lai noteiktu atšķirību starp dzimumšūnas līniju un somatiskajiem variantiem.
 - Normāli audi paraugā ietekmē variantu konstatēšanu. Ziņotā noteikšanas robeža balstās uz variantu biežumu attiecībā pret kopējo DNS, kas ekstrahēta gan no audzēja, gan no normāliem audiem.
 - Ja vienā lokusā tiek noteikts vairāk nekā viens allēles variants, neviena no allēlēm netiks ziņota kā atbilstošais variants. Tā vietā tiks ziņots par visu alēļu komplektu, bet tas tiks filtrēts, izmantojot vairāku allēļu atzīmi.

Izstrādājuma komponenti

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts sastāv no tālāk norādītajiem komponentiem:

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, kataloga Nr. 20051354 (16 paraugi), vai Nr. 20051352 (96 paraugi);
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, kataloga Nr. 20051355 (16 paraugi), vai Nr. 20051353 (96 paraugi);
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx modulis NextSeq 550Dx, kataloga Nr. 20063024;
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx modulis MiSeqDx, kataloga Nr. 20063022;
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lietojumprogramma NovaSeq 6000Dx, kataloga Nr. 20074609;
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lietojumprogramma NextSeq 550Dx, kataloga Nr. 20074730.

Nodrošinātie reaģenti

Lai pabeigtu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, nepieciešams Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A vai Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Jūs varat veikt norādīto skaitu bibliotēkas sagatavošanas un bagātināšanas reakciju, izmantojot 16 paraugu vai 96 paraugu komplektu.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts	Parauga ievade	Bagātināšanas reakcijas	Bagātināšanas pavairošanas kārtas
16 paraugu komplekts	Zema kvalitāte (FFPE)	16 reakcijas	1 kārtā
96 paraugu komplekts	Augsta kvalitāte (piem., pilnasinis)	8 reakcijas	12 kārtas

Illumina DNS sagatavošana ar Enrichment Dx ar UD rādītāju komplektu A/B

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, jāuzglabā 15 °C–30 °C temperatūrā

Tālāk norādītie reaģenti tiek piegādāti telpas temperatūrā. Nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā, lai nodrošinātu pareizu veiktspēju.

Reaģenta nosaukums	Daudzums mēģenē		Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums	Aktīvās sastāvdaļas
	16 paraugi (Nr. 20050020)	96 paraugi (Nr. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Sarkans	350 µl	Mazgāšanas līdzekļa šķīdums ūdenī.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Zaļš	41 ml	Buferēta ūdens šķīdums, kas satur mazgāšanas līdzekli un sāli.
Cleanup Beads (CB)	1	Nav*	Sarkans	10 ml	Cietās fāzes paramagnētiskas lodītes buferētā ūdens šķīdumā.

* Cleanup Beads 96 paraugiem ir iekļauti Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (Nr. 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 paraugi), uzglabāt temperatūrā no 15 °C līdz 30 °C

96 paraugu komplektiem Cleanup Beads ir iekļautas Illumina Prep Dx Cleanup Beads (kataloga Nr. 20050030). Tālāk norādītais reaģents tiek piegādāts telpas temperatūrā. Nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā, lai nodrošinātu pareizu veiktspēju. 16 paraugu komplektiem Cleanup Beads ir iekļautas Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (kataloga Nr. 20050020).

Reaģenta nosaukums	Daudzums	Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums	Aktīvās sastāvdaļas
Cleanup Beads (CB)	4	Sarkans	10 ml	Cietās fāzes paramagnētiskas lodītes buferētā ūdens šķīdumā.

illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 2, jāuzglabā 2 °C–8 °C temperatūrā

Tālāk norādītie reaģenti tiek nosūtīti atdzesēti. Nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā, lai nodrošinātu pareizu veikspēju. Glabājiet eBLTS uzglabāšanas mēģeni vertikāli, lai lodītes vienmēr būtu iegremdētas buferšķīdumā.

Reaģenta nosaukums	Daudzums mēģenē		Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums		Aktīvās sastāvdaļas
	16 paraugi (Nr. 20050021)	96 paraugi (Nr. 20050026)		16 paraugi	96 paraugi	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Dzeltens	200 µl	290 µl	Streptavidīna magnētiskās lodītes, kas saistītas ar transposomām buferētā ūdens šķīdumā, kas satur glicerīnu, EDTA, ditiotreitolu, sāli un mazgāšanas līdzekli.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Bezkrāsains	1,8 ml	1,8 ml	Buferēts ūdens šķīdums.

illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, jāuzglabā temperatūrā no -25 °C līdz -15 °C.

Tālāk norādītie reaģenti tiek piegādāti sasaldēti. Nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā, lai nodrošinātu pareizu veikspēju.

Reaģenta nosaukums	Daudzums mēģenē		Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums		Aktīvās sastāvdaļas
	16 paraugi (Nr. 20050022)	96 paraugi (Nr. 20050027)		16 paraugi	96 paraugi	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Bezkrāsains	290 µl	290 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur magnija sāli un dimetilformamīdu.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Bezkrāsains	200 µl	610 µl	DNS polimerāze un dNTP buferēta ūdens šķīdumā.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 paraugiem), jāuzglabā 2 °C–8 °C temperatūrā

16 paraugu komplektiem Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloga Nr. 20050023) ir iekļauti šādi reaģenti. 96 paraugu komplektiem reaģenti ir iekļauti Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloga Nr. 20050028).

Tālāk norādītie reaģenti tiek nosūtīti atdzesēti. Nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā, lai nodrošinātu pareizu veikspēju.

Reaģenta nosaukums	Daudzums mēģenē	Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums	Aktīvās sastāvdaļas
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Bezkrāsains	1,2 ml	Streptavidīna magnētiskās lodītes buferētā ūdens šķīdumā, kas satur formamīdu, mazgāšanas līdzekli un sāli.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Bezkrāsains	1,8 ml	Buferēts ūdens šķīdums.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Bezkrāsains	200 µl	Buferēta ūdens šķīdums, kas satur mazgāšanas līdzekli un sāli.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Bezkrāsains	200 µl	Buferēts ūdens šķīdums.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 paraugiem), jāuzglabā 2 °C–8 °C temperatūrā

96 paraugu komplektiem Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloga Nr. 20050028) ir iekļauti šādi reaģenti. 16 paraugu komplektiem reaģenti ir iekļauti IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloga Nr. 20050023).

Tālāk norādītie reaģenti tiek nosūtīti atdzesēti. Nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā, lai nodrošinātu pareizu veikspēju.

Reaģenta nosaukums	Daudzums mēģenē	Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums	Aktīvās sastāvdaļas
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Bezkrāsains	1,2 ml	Streptavidīna magnētiskās lodītes buferētā ūdens šķīdumā, kas satur formamīdu, mazgāšanas līdzekli un sāli.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Bezkrāsains	1,8 ml	Buferēts ūdens šķīdums.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Bezkrāsains	200 µl	Buferēta ūdens šķīdums, kas satur mazgāšanas līdzekli un sāli.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Bezkrāsains	200 µl	Buferēts ūdens šķīdums.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, jāuzglabā -25 °C--15 °C temperatūrā

Tālāk norādītie reaģenti tiek piegādāti sasaldēti. Nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā, lai nodrošinātu pareizu veikspēju.

Reaģenta nosaukums	Daudzums mēģenē		Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums	Aktīvās sastāvdaļas
	16 paraugi (Nr. 20050024)	96 paraugi (Nr. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Bezkrāsains	580 µl	Mazgāšanas līdzekļa šķīdums ūdenī.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Dzintara krāsa	4,1 ml	Buferēta ūdens šķīdums, kas satur sāļus un mazgāšanas līdzekli.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Bezkrāsains	320 µl	PĶR praimeru (oligonukleotīdu) maisījums.
2 N NaOH (HP3)	1	1	Bezkrāsains	200 µl	2 N nātrija hidroksīda (NaOH) šķīdums.

Reaģenta nosaukums	Daudzums mēģenē		Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums	Aktīvās sastāvdaļas
	16 paraugi (Nr. 20050024)	96 paraugi (Nr. 20050029)			
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Zils	480 µl	Buferēts ūdens šķīdums ar Cot-1 DNS, koncentrēšanas līdzekli un formamīdu
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Bezkrāsains	200 µl	DNS polimerāze un dNTP buferēta ūdens šķīdumā.

illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, uzglabājiet temperatūrā no -25 °C līdz -15 °C

Tālāk norādītie reaģenti tiek piegādāti sasaldēti. Nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā, lai nodrošinātu pareizu veiktspēju. Rādītāju adapteru sekvences skatiet [Pielikums: illumina UD rādītāju adaptera sekvences.](#), 64. lpp.

Sastāvdaļa	Daudzums
illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 rādītāji), Nr. 20050038	1
illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 rādītāji), Nr. 20050039	1

Reaģenti, kas netiek nodrošināti

Nepieciešamie reaģenti, kas netiek nodrošināti

- DNS ekstrakcijas un attīrīšanas reaģenti
- DNS kvantifikācijas reaģenti
- Etanols (200 stiprums, molekulārajai bioloģijai)
- nukleāzi nesaturošs ūdens
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 1 N NaOH šķīdums, molekulārās bioloģijas klase
- Ja izmantojat NextSeq 550Dx sekvencēšanas sistēmu:
 - 200 mM Tris, pH 7,0 (var atšķaidīt no 1 M Tris-HCL, pH 7,0)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) (kataloga Nr. 20028871)

- Ja izmantojat MiSeqDx sekvencēšanas sistēmu:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (kataloga Nr. 20037124)
- Ja izmantojat NovaSeq 6000Dx sekvencēšanas sistēmu:
 - 400 mM Tris, pH 8,0 (var atšķaidīt no 1 M Tris-HCL, pH 8,0)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cikli) (kataloga Nr. 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cikli) (kataloga Nr. 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (kataloga Nr. 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (kataloga Nr. 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (kataloga Nr. 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (kataloga Nr. 20062291)

Bagātināšanas zondes paneļa prasības

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts reaģenti ir saderīgi ar Illumina un trešo personu bagātināšanas DNS oligonukleotīdu paneļiem. Ja tiek izmantotas trešo personu biotilētās DNS zondes (fiksēti vai pielāgoti paneļi), pārliecinieties, ka tās atbilst nepieciešamajām specifikācijām.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts ir optimizēta un apstiprināta, izmantojot šādas trešo personu paneļa specifikācijas. Izmantojot trešo personu paneļus, kas neatbilst specifikācijām, netiek garantēta salīdzināma veikspēja.

- 80 bp vai 120 bp zondes garums
- Starp 500 un 675 000 zondēm
- Vienas vai dubultas virknes DNS
- Kopējā zonžu ievade ≥ 3 pmol bagātināšanai ar pavairojuma kārtām no 1 kārtas līdz 12 kārtām.

Uzglabāšana un izmantošana

- Istabas temperatūra tiek definēta no 15 °C līdz 30 °C.
- Reaģenti ir stabili, ja tiek glabāti atbilstoši norādījumiem līdz derīguma termiņa beigu datumam, kas norādīts uz komplekta etiķetēm. Informāciju par uzglabāšanas temperatūru skatiet sadaļu [Nodrošinātie reaģenti, 5. lpp.](#)
- Sasaldētie reaģenti ir stabili līdz četriem sasaldēšanas un atsaldēšanas cikliem, kas notiek pirms norādītā derīguma termiņa beigām.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts procedūrā ir šādi drošas apstāšanās punkti:
 - Pēc [Atzīmētās DNS amplificēšana, 29. lpp](#) amplificētās bibliotēkas ir stabilas līdz 30 dienām, uzglabājot temperatūrā no -25 °C līdz -15 °C.

- Pēc [Bibliotēku attīrīšana, 32. lpp](#) attīrītās amplificētās bibliotēkas ir stabilas līdz 30 dienām, uzglabājot temperatūrā no -25°C līdz -15°C .
- Pēc [Iepriekš bagātināto bibliotēku apvienošana, 34. lpp](#) apvienotās bibliotēkas ir stabilas līdz 30 dienām, uzglabājot temperatūrā no -25°C līdz -15°C .
- Pēc [Bagātinātas bibliotēkas amplificēšana, 45. lpp](#) bagātinātā, amplificētā bibliotēku plāksne var palikt uz cikliskā sildītāja līdz pat 24 stundām. Alternatīvi plati var glabāt temperatūrā no 2°C līdz 8°C līdz 48 stundām.
- Galīgās attīrītās bagātinātās bibliotēkas ir stabilas līdz 7 dienām, uzglabājot temperatūrā no -25°C līdz -15°C .
- Ja kāds Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts iepakojums vai saturs ir bojāts, sazinieties ar Illumina klientu apkalpošanas dienestu.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) var veidot redzamas nogulsnes vai kristālus. Ja tiek konstatētas nogulsnes, uzsildiet 37°C temperatūrā 10 minūtes un virpiniet, līdz nogulsnes izšķīst.
- Hibrīdizācijas oligo (HYB) un Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) ir iepriekš jāsakarsē līdz tādai pašai temperatūrai kā hibrīdizācijas uzturēšanas temperatūra, kas piemērojama katram parauga veidam un zondes panelim. Vairāk informācijas par rīkošanos ar NHB2 un EEW, skatīt sadaļā [Procedūras piezīmes, 17. lpp](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) un HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) var rasties kristāli un duļķainums. Ja tiek novēroti kristāli un duļķainība, virpiniet vai pipetējiet uz augšu un uz leju, lai sajauktu līdz šķīdums ir dzidrs. Pirms pipetēšanas noteikti uzsildiet NHB2.
- Rīkojoties ar Cleanup Beads (CB), izmantojiet tālāk norādīto labo praksi.
 - Nekad nesasaldējiet lodītes.
 - Tieši pirms lietošanas virpiniet lodītes, līdz tās ir atkārtoti suspendētas un krāsa izskatās viendabīga.
- Rīkojoties ar Enrichment BLT Small (eBLTS), izmantojiet tālāk norādīto labo praksi.
 - Uzglabājiet eBLTS mēģeni vertikāli, lai lodītes vienmēr būtu iegremdētas buferšķīdumā.
 - Rūpīgi samaisiet eBLTS līdz lodītes ir pilnībā atkārtoti suspendētas. Lai izvairītos no lodīšu atkārtotas nosēšanās, pirms pipetēšanas nav ieteicams veikt centrifugēšanu.
 - Ja lodītes ir pielīpušas pie 96 bedrīšu plāksnes sāniem vai virspuses, centrifugējiet ar $280 \times g$ 3 sekundes un pēc tam pipetējiet, lai atkārtoti suspendētu.
- Rīkojoties ar rādītāju adapteru plāksnēm, izmantojiet tālāk norādīto labo praksi.
 - Nepievienojiet paraugus rādītāju adapteru plāksnei.
 - Katra rādītāju plāksnes iedobe ir tikai vienreizējai lietošanai.

Nepieciešamais aprīkojums un materiāli, netiek nodrošināti

Papildus Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts, pārliecinieties, ka jums ir nepieciešamais aprīkojums un materiāli pirms protokola palaišanas.

Aprīkojums

Pirms protokola palaišanas pārliecinieties, ka jums ir nepieciešamais aprīkojums.

Protokols ir ticis optimizēts un validēts, izmantojot vienumus ar uzskaitītajām specifiskajām. Izmantojot aprīkojumu, kas neatbilst specifiskajām, netiek garantēta salīdzināma veikspēja.

Daži vienumi ir nepieciešami tikai konkrētām darbplūsmām. Šie vienumi ir norādīti atsevišķās tabulās.

- Cikliskais sildītājs ar šādām specifiskajām:
 - apsildāms vāks;
 - minimālais temperatūras kontroles diapazons no 10 °C līdz 98 °C;
 - minimālā temperatūras precizitāte $\pm 0,25$ °C;
 - maksimālais reakcijas tilpums 100 μ l;
 - saderīgs 96 bedrīšu PQR plāksnēm ar pilno apmali.
- Mikroparaugu inkubators ar šādām specifiskajām:
 - temperatūras diapazons no +5,0 °C līdz 99,0 °C;
 - saderīgs ar 96 bedrīšu MIDI plāksnēm.
- Mikroparaugu inkubatora ieliktni, kas saderīgi ar 96 bedrīšu MIDI plāksnēm.
- Liela ātruma mikroplāksņu kratītājs ar maisīšanas ātruma diapazonu 200–3000 apgr./min.
- Magnētiskais statīvs, kas saderīgs ar 96 bedrīšu PQR plāksnēm.
- Magnētiskais statīvs, kas saderīgs ar 96 bedrīšu MIDI plāksnēm.
- Fluorometrs, kas saderīgs ar jūsu kvantifikācijas metodi.
- DNS fragmentu analizators.
- Precīzās pipetes:
 - 10 μ l viena kanāla un daudzkanālu pipetes;
 - 20 μ l viena kanāla un daudzkanālu pipetes;
 - 200 μ l viena kanāla un daudzkanālu pipetes;
 - 1000 μ l viena kanāla pipetes.
 - Precīzās pipetes nodrošina pareizu reaģentu un paraugu ievadīšanu. Viena kanāla vai daudzkanālu pipetes var izmantot, ja tās tiek regulāri kalibrētas un ir precīzas 5 % robežās no norādītā tilpuma.

- Mikroplāksnes centrifūga
- Mikrocentrifūga
- Viena no šādām Illumina sekvencēšanas sistēmām:
 - MiSeqDx instruments, kataloga Nr. DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx instruments, kataloga Nr. 20005715 ar papildu Illumina DRAGEN serveri ierīcei NextSeq 550Dx, kataloga Nr. 20086130
 - NovaSeq 6000Dx instruments, kataloga Nr. 20068232
- **[Neobligāts]** Vakuuma koncentrators
- **[FFPE]** reāllaika PĶR noteikšanas sistēma

Materiāli

Pirms protokola palaišanas pārlicinieties, ka jums ir nepieciešamie materiāli.

Daži vienumi ir nepieciešami tikai konkrētām darbplūsmām. Šie vienumi ir norādīti atsevišķās tabulās.

Protokols ir ticis optimizēts un validēts, izmantojot uzskaitītos vienumus. Pielīdzināma veikspēja netiek garantēta, ja tiek izmantoti alternatīvi materiāli.

- Filtrēti pipetes uzgaļi
- Koniskās centrifūgas mēģenes, 15 ml vai 50 ml
- 1,5 ml mikrocentrifūgas mēģenes
- Ribonukleāzi/dezoksiribonuleāzi nesaturoši vienreizlietojami daudzkanālu reaģentu rezervuāri
- Ribonukleāzi/dezoksiribonuleāzi nesaturošas 8 mēģeņu sloksnes un vāciņi
- Seroloģiskās pipetes
- 96 bedrīšu polipropilēna dziļo bedrīšu uzglabāšanas plāksne, 0,8 ml (MIDI plāksne)
- Cietās čaulas 96 bedrīšu PĶR plāksnes ar pilno apmali
- **[FFPE]** āPĶR plāksnes, kas ir saderīgas ar aPĶR instrumentu
- Pašlīpošie noslēgi 96 bedrīšu plāksnēm ar šādām specifikācijām:
 - nolibāms, optiski caurspīdīgs poliesters;
 - piemērotas PĶR plāksnēm ar apmali;
 - izturīga līme, kas spēj izturēt vairākas temperatūras izmaiņas no –40 °C līdz 110 °C;
 - nesatur ribonukleāzi/dezoksiribonuleāzi.
- Plastmasas palīgmateriāli, kas ir saderīgi ar izvēlēto kvantifikācijas metodi
- Fluorometriskais dsDNS kvantifikācijas komplekts, kas saderīgs ar izvēlēto kvantifikācijas sistēmu:
 - lai kvantificētu iepriekš bagātinātas amplificētās bibliotēkas, var izmantot plaša diapazona kvantifikācijas komplektu;

- lai kvantificētu bagātinātās bibliotēkas, kvantifikācijas komplekta diapazons ir atkarīgs no izmantotā zondes paneļa.
- Fragmentu analīzes komplekts bibliotēkas kvalifikācijai ar izvēlēto kvalifikācijas sistēmu:
 - lai kvalificētu iepriekš bagātinātas amplificētās bibliotēkas, var izmantot plaša diapazona kvalifikācijas komplektu.
 - Bagātinātu bibliotēku kvalificēšanai kvalifikācijas komplekta diapazons ir atkarīgs no izmantotā zondes paneļa.
- **[Neobligāts]** Komplekts DNS ekstrakcijai no cilvēka šūnām un audiem. Varat izmantot jebkuru apstiprinātu ekstrakcijas metodi.

Paraugu ņemšana, transportēšana un uzglabāšana



UZMANĪBU!

Ar visiem paraugiem jārīkojas tā, it kā tie būtu iespējami inficēti.

- Šī analīze ir saderīga ar genomu DNS, kas iegūta no cilvēka šūnām un audiem.
- Komerciāli pieejamai attīrītai gDNS pārliecinieties, ka paraugi ir transportēti pareizos apstākļos un uzglabāti saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Ievērojiet labāko gDNS uzglabāšanas un sasaldēšanas ciklu praksi.
- Pilnasiņu ievadei ievērojiet asins savākšanas, transportēšanas un uzglabāšanas prasības, kas piemērojamas izvēlētajai DNS ekstrakcijas metodei. Var izmantot jebkuru apstiprinātu izgūšanas metodi. Pilnasiņu transportēšanai jāatbilst valsts, federālajiem, pavalsts un vietējiem noteikumiem par etioloģisko vielu transportēšanu.
- DNS ekstrakcijai no FFPE audiem var izmantot jebkuru validētu ekstrakcijas metodi. Izpildiet norādījumus un ieteikumus, kuri attiecas uz izvēlēto ekstrakcijas metodi, lai noteiktu praksi.
 - Formalīna fiksācijas un parafīna iegulšanas metodei audiem, lai nodrošinātu vislabāko iegūtās DNS kvalitāti.
 - FFPE paraugu uzglabāšana.
 - Prasības attiecībā uz izejmateriāliem, piemēram, FFPE sekciju skaits un biežums. Lielākā daļa attīrīšanas metožu iesaka izmantot svaigi grieztas sekcijas.

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts reaģentu komplektā ir potenciāli bīstamas ķīmiskās vielas. Ieelpojot, norijot, saskaroties ar ādu un saskaroties ar acīm, iespējams gūt traumas. Valkājiet aizsardzības līdzekļus, tostarp acu aizsargus, cimdsus un laboratorijas uzsvārci, kas atbilst ietekmes riskam. Apejieties ar lietotiem reaģentiem kā ar ķīmiskiem atkritumiem un atbrīvojieties no tiem saskaņā ar piemērojamiem reģionālajiem, valsts un vietējiem likumiem un noteikumiem. Plašāku informāciju par vidi, veselību un drošību skatiet drošības datu lapās (DDL) tīmekļvietnē support.illumina.com/sds.html.

- Nekavējoties ziņojiet par jebkādiem nopietniem negadījumiem saistībā ar produktu uzņēmumam Illumina un to dalībvalstu kompetentajām iestādēm, kurā lietotājs un pacients ir reģistrēti.
- Rīkojieties ar visiem asins paraugiem tā, it kā būtu zināms, ka tie inficēti ar cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV), cilvēka B hepatīta vīrusu (HBV) un citiem ar asinīm pārnēsājamu patogēniem (vispārīgi piesardzības pasākumi).
- Ievērojiet parastos laboratorijas piesardzības pasākumus. Nelietojiet pipeti, izmantojot muti. Neēdiet, nedzeriet un nesmēķējiet noteiktās darba zonās. Rīkojieties ar paraugiem un komplekta reaģentiem, valkājiet vienreizlietojamus cimdus un laboratorijas uzsvārcus. Pēc paraugu un komplekta reaģentu izmantošanas ir rūpīgi jānomazgā rokas.
- Lai novērstu parauga vai reaģenta noārdīšanos, nodrošiniet, ka pirms protokola sākšanas visi nātrija hipohlorīta tvaiki, kas radušies tīrīšanas laikā, ir pilnībā izkļiedēti.
- Paraugu piesārņošana ar citiem PĶR produktiem/aplikatoriem var izraisīt neprecīzus un neuzticamus rezultātus. Lai izvairītos no piesārņojuma, ievērojiet tālāk norādīto labo praksi.
 - Ievērojiet atbilstošu laboratorijas praksi un laboratorijas higiēnu.
 - Izpildiet darbplūsmas darbības tam paredzētās iepriekšējās amplifikācijas vai pēcamplifikācijas zonās.
 - Pirms bibliotēku tīrīšanas iepriekšējās amplifikācijas zonā novietojiet izmantotos reaģentus glabāšanai.
 - Nodaliet reaģentus iepriekšējai amplifikācijai no reaģentiem pēcamplifikācijai.
 - Nodrošiniet, ka iepriekšējās amplifikācijas un pēcamplifikācijas zonās ir nepieciešamais aprīkojums, piemēram, pipetes, pipetes uzgaļi, virpinātājs un centrifūga.
- Izvairieties no šķērspiesārņojuma. Izmantojiet svaigus pipetes uzgaļus starp paraugiem un starp reaģentu ievadīšanu. Izmantojot filtrētos uzgaļus, tiek samazināts amplikona pārnesšanas un paraugu savstarpēja piesārņojuma risks.
 - Pievienojot vai pārnesot paraugus vai reaģentu galvenos maisījumus, mainiet uzgaļus starp katru paraugu.
 - Pievienojot rādītāju adapterus ar daudzkanālu pipeti, mainiet uzgaļus starp katru rindu vai katru kolonnu. Ja izmantojat viena kanāla pipeti, mainiet uzgaļus starp katru paraugu.
 - Noņemiet no darba zonas neizmantotās rādītāju adapteru plāksnes.
- Etanola mazgāšanas darbībām izmantojiet tālāk norādīto labo praksi.
 - Vienmēr sagatavojiet svaigu 80 % etanolu. Etanols var absorbēt ūdeni no gaisa, kas var ietekmēt rezultātus.
 - Pārliedcinieties, ka mazgāšanas darbību laikā no bedrīšu apakšas atbrīvojas no visa etanola. Atlikušais etanols var ietekmēt rezultātus.
 - Lai nodrošinātu pilnīgu iztvaikošanu, ievērojiet norādīto žāvēšanas laiku darbībām magnētiskajā statīvā. Atlikušais etanols var ietekmēt turpmāko reakciju veikspēju.
- Pirms lietošanas vienmēr sagatavojiet galveno maisījumu un neglabājiet apvienotos darba šķīdumus.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts veikspēja netiek garantēta, ja netiek ievērotas lietošanas instrukcijā norādītās procedūras.

- Nelietojiet nevienu komplekta sastāvdaļu pēc norādītā derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz komplekta marķējuma.
- Nemainiet komplektu komponentus no dažādiem Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplektiem. Komplekti ir norādīti uz komplekta etiķetes.

Procedūras piezīmes

DNS ievades ieteikumi

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts Protokols ir savietojams ar augstas kvalitātes divkāršas virknes genoma DNS (gDNS) ievadēm ar 50–1000 ng.

Pārliecinieties, ka sākotnējais gDNS paraugs nesatur > 1 mM EDTA un organiskus piesārņotājus, piemēram, fenolu un etanolu. Šīs vielas var traucēt atzīmēšanas reakcijai un izraisīt analīzes neveiksmi.

gDNS ievade \geq 50 ng

Ja gDNS ievade ir 50–1000 ng, sākotnējo gDNS paraugu nav nepieciešams kvantificēt un normalizēt.

gDNS ievade < 50 ng

DNS ievades 10–50 ng var izmantot ar tālāk norādītajiem pielāgojumiem.

- Ja tiek izmantota 10–49 ng gDNS ievade, ir ieteicams kvantificēt sākotnējo gDNS paraugu, lai noteiktu nepieciešamo PĶR ciklu skaitu pēc atzīmēšanas. Lai kvantificētu divkāršas virknes gDNS ievadi, izmantojiet fluorometrisku metodi. Izvairieties no metodēm, kas mēra kopējo nukleīnskābi, piemēram, NanoDrop vai citām UV absorbcijas metodēm.
- Šis protokols neveic iepriekš bagātinātu bibliotēku rezultātu normalizāciju no 10–49 ng gDNS un tāpēc ir nepieciešama bibliotēku kvantifikācija un normalizācija pirms un pēc bagātināšanas.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts ir aprakstīts un pārbaudīts DNS ievadēm 50–1000 ng. Līdzvērtīgu produkta veiktspēju gDNS ievadēm < 50 ng nevar garantēt.

Ieteikumi par asins ievadi

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts ir saderīgs ar gDNS, kas izgūta no perifērajām pilnasinīm. Var izmantot jebkuru apstiprinātu izgūšanas metodi. Izgūstot gDNS no pilnasinīm, sākotnējā kvantifikācija ievadītajai DNS nav nepieciešama, un Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts sniedz normalizētas iepriekš bagātinātas bibliotēkas rezultātus.

Tālāk minētie faktori var nelabvēlīgi ietekmēt DNS daudzumu, kas iegūts no pilnasiņu paraugiem un tādējādi bibliotēkas normalizēšanu:

- asins parauga vecums;
- uzglabāšanas apstākļi;

- pamatslimības, kas ietekmē leikocītu skaitu.

FFPE audu paraugu ievades ieteikumi

Izmantojiet tālāk norādītos FFPE DNS kvalitātes kritērijus, lai noteiktu atbilstošu ievadi veiksmīgai bibliotēkas sagatavošanai.

- FFPE paraugiem ar ΔCq vērtību ≤ 5 ieteicamā DNS ievade ir 50–1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nav ieteicama sliktas kvalitātes FFPE paraugiem ar $\Delta Cq > 5$. Paraugu izmantošana ar $\Delta Cq > 5$ ir iespējama, bet tā var palielināt bibliotēkas sagatavošanas kļūmes vai samazināt analīzes veikspēju.

FFPE ekstrakcija

Izmantojiet nukleīnskābju izolēšanas metodi, kas nodrošina augstus atkopšanas rezultātus, samazina parauga patēriņu un saglabā parauga integritāti. Jūs varat izmantot jebkuru apstiprinātu metodi DNS ekstrakcijai no FFPE paraugiem. Izgūstot gDNS no FFPE audiem, nepieciešama sākotnējā kvantifikācija ievadītajai DNS, un Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts nesniedz normalizētas iepriekš bagātinātas bibliotēkas rezultātus.

FFPE DNS kvalifikācija

Pirms lietošanas no FFPE audiem izgūtajai gDNS jābūt kvalificētai. Lai iegūtu optimālu veikspēju, novērtējiet DNS parauga kvalitāti, izmantojot apstiprinātu ekstrakcijas metodi no FFPE paraugiem izgūtai DNS. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts protokols ir saderīgs ar FFPE DNS paraugiem ar ΔCq vērtību ≤ 5 . Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts nav ieteicams sliktas kvalitātes FFPE paraugiem ar $\Delta Cq > 5$. Paraugu izmantošana ar $\Delta Cq > 5$ ir iespējama, bet tā var palielināt bibliotēkas sagatavošanas kļūmes vai samazināt analīzes veikspēju.

[Neobligāti] FFPE atsauces paraugi

Protokola izpildes laikā kā pozitīvu kontroli izmantojiet tādus raksturīgus atsauces materiālus kā Horizon HD799 (DNS). Kā atsauces paraugus var izmantot arī piemērotus FFPE materiālus no šūnu līnijas atvasinātiem ksenotransplantātiem. Lai kvantificētu atsauces materiālus pirms to lietošanas, izmantojiet fluorometrisku metodi.

PIEZĪME Pozitīvās kontroles atsauces parauga vai kontroles bez veidnes apstrāde patērē reaģentus un samazina kopējo nezināmo paraugu skaitu, ko var apstrādāt.

Paraugu ievades ieteikumi

Tālāk tabulā ir apkopoti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts paraugu ievades ieteikumi.

Tabula 1 Paraugu ievades ieteikumi

Parauga ievades veids	Parauga ievades tilpums	Nepieciešamā ievades DNS kvantifikācija	Nepieciešamā DNS ievades kvalitāte	Normalizētas iepriekš bagātinātas bibliotēkas rezultāts
gDNS	10–49 ng	Jā	260/280 attiecība 1,8–2,0	Nē
gDNS	50–1000 ng	Nē	260/280 attiecība 1,8–2,0	Jā
gDNS no asinīm	50–1000 ng	Nē	260/280 attiecība 1,8–2,0	Jā
gDNS no FFPE	50–1000 ng	Jā	ΔCq vērtība ≤ 5	Nē

eBLTS PĶR programmai ieteiktie PĶR cikli ir pielāgoti, ņemot vērā parauga ievades koncentrāciju un kvalitāti. Plašāku informāciju skatiet sadaļā [Atzīmētās DNS amplificēšana, 29. lpp.](#)

Padomi un metodes

Izvairīšanās no šķērspiesārņojuma

- Pievienojot vai pārvietojot paraugus, mainiet uzgaļus starp *katru paraugu*.
- Pievienojot rādītāju adapterus ar daudzkanālu pipeti, mainiet uzgaļus starp *katru rindu* vai *katru kolonnu*. Ja izmantojat viena kanāla pipeti, mainiet uzgaļus starp katru paraugu.

Plāksnes noslēgšana

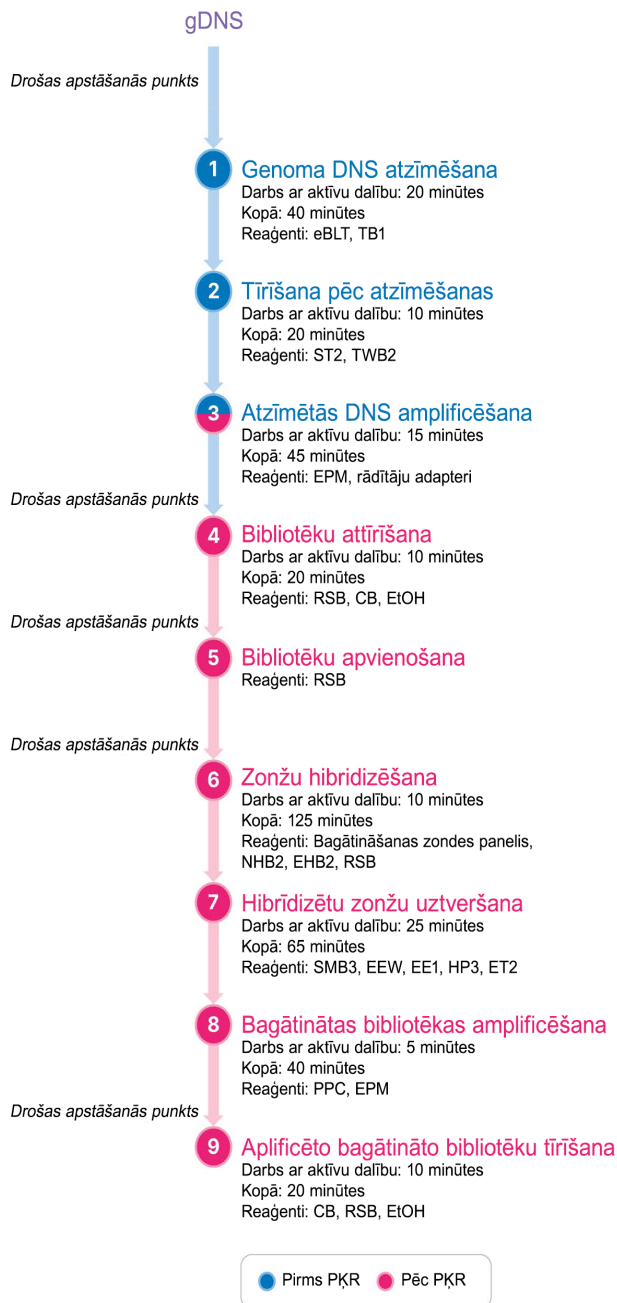
- Vienmēr noslēdziet 96 bedrīšu plāksni ar jaunu pašlīmējošo plēvi, izmantojot gumijas rullīti, lai nosegtu plāksni, pirms turpmākajām protokola darbībām.
 - Kratīšanas darbības
 - Inkubācijas darbības Ja plāksne nav pareizi noslēgta, tas var izraisīt iztvaikošanu inkubācijas laikā.
 - Centrifugēšanas darbības
 - Hibridizācijas darbības
- Pārliecinieties, ka malas un bedrītes ir pilnībā noslēgtas, lai samazinātu šķērspiesārņojuma un iztvaikošanas risku.
 - Ja uz blīvējuma vai plāksnes bedrīšu malām ir novērojams šķidrums vai kondensāts, pirms blīvējuma noņemšanas pēc nepieciešamības centrifugējiet.
- Nolieciet plāksni uz līdzenas virsmas, pirms lēnām noņemat blīvējumu.

Rīkošanās ar Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Glabājiet eBLTS uzglabāšanas mēģeni ledusskapī vertikāli, lai lodītes vienmēr būtu iegremdētas buferšķīdumā.
- Uzreiz pirms lietošanas rūpīgi virpiniet eBLTS uzglabāšanas mēģeni, līdz lodītes ir atkārtoti suspendētas. Lai izvairītos no lodīšu atkārtotas nosēšanās, nav ieteicams veikt centrifugēšanu pirms pipetēšanas.
- Ja lodītes ir pielīpušas pie 96 bedrīšu plāksnes sāniem vai virspuses, centrifugējiet ar $280 \times g$ 3 sekundes un pēc tam pipetējiet, lai atkārtoti suspendētu.
- Mazgājot eBLTS:
 - Plāksnei izmantojiet piemērotu magnētisko statīvu.
 - Turiet plāksni uz magnētiskā statīva, līdz norādījumi liek to noņemt.
 - Ja lodītes ir aspirētas pipetes uzgaļos, iepildiet tās atpakaļ plāksnē uz magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).

illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts darbplūsuma

illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts darbplūsmu ilustrē tālāk redzamā shēma. Starp darbībām ir atzīmēti drošas apstāšanās punkti. Laika aplēses pamatojas uz 12 paraugu apstrādi ar 12 kārtu bagātināšanu.



Lietošanas instrukcija

Šajā nodaļā aprakstīts Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts protokols.

- Pārskatiet plānoto pilno sekvencēšanas darbplūsmu no parauga līdz analīzei, lai nodrošinātu produktu un eksperimenta parametru saderību.
- Pirms turpināt, pārbaudiet komplekta saturu un pārliecinieties, ka Jums ir nepieciešamās sastāvdaļas, aprīkojums un materiāli.
 - Trešo personu biotiniļētajām zondēm jāatbilst noteiktām prasībām. Skatiet [Bagātināšanas zondes paneļa prasības, 11. lpp](#), lai nodrošinātu, ka trešās personas zondes atbilst prasībām.
- Ievērojiet protokolu norādītajā secībā, izmantojot norādītos tilpumus un inkubācijas parametrus.
- Ja protokolā nav norādīts drošas apstāšanās punkts, nekavējoties pārejiet pie nākamās darbības.
- Radot galveno maisījumu, nodrošinātajos apjomos tiek iekļauts papildu daudzums.
- Pārliecinieties, ka izmantojat plāksnes veidam atbilstošu magnētisko statīvu.

Sagatavošana apvienošanai

Šī darbība ir nepieciešama, lai nodrošinātu veiksmīgu bagātināto bibliotēku sekvencēšanu. Bibliotēku apvienošanu var veikt pirms bagātināšanas un pirms sekvencēšanas.

Pirms bagātināšanas – atsevišķas indeksētās, amplificētās bibliotēkas tiek apvienotas bagātināšanai ar izvēlēto zondes paneli. Šādi tiek izveidots bagātinātu bibliotēku vairāku kārtu apvienojums. FFPE paraugu ievadei apstrāde ir pārbaudīta un ir ieteicama tikai 1 kārtas bagātināšanas reakcijām. Augstas kvalitātes gDNS ir pārbaudīta 12 kārtu bagātināšana, bet ir iespējama bagātināšana ar no 2 līdz 11 kārtām.

Pirms sekvencēšanas – 1 kārtas bagātinātās bibliotēkas un/vai vairāku kārtu bagātinātās bibliotēkas tiek apvienotas pirms sekvencēšanas. Bagātināto bibliotēku skaits, ko var sekvencēt, ir atkarīgs no katra parauga mērķa lasīšanas dziļuma jūsu sekvencēšanas sistēmā.

Unikālā duālā indeksācija

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts izmanto unikālos duālos rādītājus.

- Duāli indeksētās bibliotēkas pievieno 1. rādītāja (i7) un 2. rādītāja (i5) secības, lai radītu bibliotēkas ar unikālām atzīmēm.
- UD rādītājiem ir atšķirīgas, nesaistītas rādītāja secības i7 un i5 rādītāju lasījumam. Rādītāji ir 10 bāzes gari.

Atlasot rādītāju adapterus ar dažādām secībām apvienotām bibliotēkām, tiek optimizēts krāsu balanss, lai nodrošinātu sekmīgu sekvencēšanu un datu analīzi. Vairākkārt bagātināti apvienojumi ar ≥ 10 bagātināšanas kārtām pēc sava rakstura nodrošina vienmērīgu krāsu balansu, tāpēc varat izmantot jebkuru rādītāju adapteru kombināciju. Sekvencēšanas cikla laikā DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Modulis piedāvā sabalansētu krāsu rādītāju kombināciju iespējas un paziņo, ja izvēlētajā rādītāju kombinācijās nav pietiekamas atšķirīgas.

Informāciju par Illumina UD rādītāju adapteru secībām un plāksnes izkārtojumiem skatiet [Pielikums: Illumina UD rādītāju adaptera sekvences.](#), 64. lpp

Atbalstītie bagātināšanas kārtu lielumi

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts reaģenti ir konfigurēti un testēti ar 1 kārtas un 12 kārtu bagātināšanu. Lai gan ir iespējamas citas bagātināšanas kārtu iespējas, dažiem kārtu skaitiem ir nepieciešama papildu iepriekš bagātinātas bibliotēkas sagatavošana un bagātināšanas zondes paneļa reaģenti.

Lai iegūtu piemērotu bagātināšanas rezultātu nestandarta bagātināšanas kārtām, var būt nepieciešama papildu optimizācija. Optimāli rezultāti netiek garantēti.

- **Bagātināšanas kārtas** – iepriekš bagātināto bibliotēku (1–12) skaits, kas apvienotas vienā bagātināšanas reakcijā hibridizācijai ar bagātināšanas zondes paneļiem. Piemēram, apvienojot 12 iepriekš bagātinātas bibliotēkas, tiek veidots 12 kārtu bagātināšanas apvienojums.
- **Bagātināšanas reakcija** – unikālo bagātināšanas reakciju sagatavju skaits neatkarīgi no iepriekš bagātināto bibliotēku skaita, kas apvienotas katrā reakcijā. Piemēram, viena bagātināšanas reakcija var sagatavot 1 kārtas vai 12 kārtu bagātināšanas apvienojumu.

Lai aprēķinātu bibliotēku pēc bagātināšanas kopējo skaitu, reiziniet bagātināšanas kārtas lielumu katrā reakcijā ar bagātināšanas reakciju skaitu. Piemēram, viena bagātināšanas reakcija ar 12 kārtu bagātināšanas apvienojumu rada 12 bibliotēkas pēc bagātināšanas.

Apvienojot iepriekš bagātinātas bibliotēkas, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts reaģenti atbalsta tālāk norādītās bagātināšanas reakcijas un kārtas.

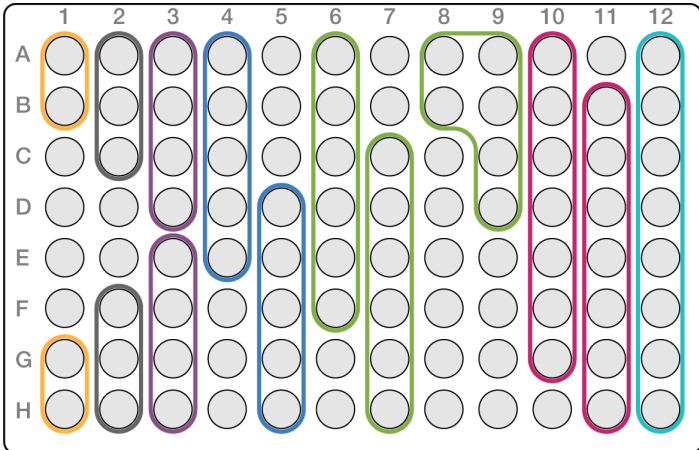
Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts reaģenti	Bagātināšanas reakcijas	Bagātināšanas pavairošanas kārtas
16 paraugu komplekts	16 reakcijas	1 kārtas
96 paraugu komplekts	8 reakcijas	12 kārtas

Divkārtīgas līdz Astonkārtīgas apvienošanas stratēģijas

Tālāk tabulā ir parādīti rādītāju adapteri (bedrītes), ko var kombinēt 2–8 kārtu apvienojumā, savukārt ar krāsu kodētā attēlā ir redzama katra kombinācija.

Apvienojiet jebkuru kārtu daudzumu, kas ≥ 2 no kolonnas augšas vai apakšas. Neveidojiet apvienojumus rindas ietvaros

Kārtu daudzums	Kombinācijas	Krāsa attēlā
2	Pirmās divas vai pēdējās divas bedrītes kolonnā: <ul style="list-style-type: none"> • A un B • G un H Rindas C–F netiek izmantotas.	Oranža
3	Pirmās trīs vai pēdējās trīs bedrītes kolonnā: <ul style="list-style-type: none"> • A–C • F–H Rindas D un E netiek izmantotas.	Pelēka
4	Pirmās četras vai pēdējās četras bedrītes kolonnā: <ul style="list-style-type: none"> • A–D • E–H 	Violeta
5	Pirmās piecas vai pēdējās piecas bedrītes kolonnā: <ul style="list-style-type: none"> • A–E • D–H 	Zils
6	[1. iespēja] Pirmās sešas vai pēdējās sešas bedrītes kolonnā: <ul style="list-style-type: none"> • A–F • C–H [2. iespēja] Pirmās divas bedrītes (A un B) vai pēdējās divas bedrītes (G un H) vienā kolonnā un četras bedrītes blakus esošajā kolonnā.	Zaļš
7	Pirmās septiņas vai pēdējās septiņas bedrītes kolonnā: <ul style="list-style-type: none"> • A–G • B–H 	Rozā
8	Visa kolonna.	Zilganzaļa

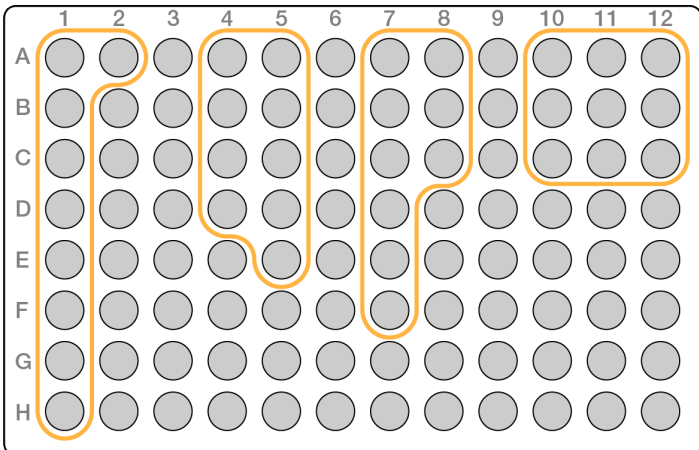


Deviņu kārtu apvienošanas stratēģijas

Izmantojiet rādītāju adapterus no jebkuras iedobes, kas optimizē krāsu balansu sekvenčēšanas ciklā, piemēram:

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

Tālāk attēlā ir parādīti visi četri piemēri.



Genoma DNS atzīmēšana

Šajā darbībā tiek izmantotas Enrichment BLT Small (eBLTS), lai atzīmētu DNS, kas ir process, kurš fragmentē un atzīmē DNS ar adapteru secībām.

Paļigmateriāli

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (dzeltens vāciņš)

- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- nukleāzi nesaturošs ūdens
- 96 bedrīšu PQR plāksne
- Pašlīpošais noslēgs
- 1,7 ml mikrocentrifūgas mēģenes
- 8 mēģeņu sloksne
- Pipetes uzgaļi
 - 200 µl daudzkanālu pipetes



UZMANĪBU!

Šajā reaģentu komplektā ir potenciāli bīstamas ķīmiskās vielas. Ielpojot, norijot, saskaroties ar ādu un saskaroties ar acīm, iespējams gūt traumas. Valkājiet aizsardzības līdzekļus, tostarp acu aizsargus, cimdus un laboratorijas uzsvārci, kas atbilst ietekmes riskam. Apejieties ar lietotiem reaģentiem kā ar ķīmiskiem atkritumiem un atbrīvojieties no tiem saskaņā ar piemērojamiem reģionālajiem, valsts un vietējiem likumiem un noteikumiem. Plašāku informāciju par vidi, veselību un drošību skatiet drošības datu lapās (DDL) tīmekļvietnē support.illumina.com/sds.html.

Par reaģentiem

- eBLTS jāuzglabā temperatūrā no 2 °C līdz 8 °C. Nelietojiet eBLTS, ja tās ir uzglabātas temperatūrā, kas zemāka par 2 °C.
- Necentrifugējiet eBLTS.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus palīgmateriālus.

Vienums	Glabāšana	Norādījumi
eBLTS (dzeltens vāciņš)	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai. Tieši pirms lietošanas samaisiet. Necentrifugējiet pirms pipetēšanas.
TB1	No -25 °C līdz -15 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai. Virpiniet, lai samaisītu.

2. Samaisiet vai pipetējiet DNS un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
3. Saglabājiet tālāk norādīto TAG programmu cikliskajā sildītājā:
 - Izvēlieties iepriekšējās uzsildīšanas vāka iespēju un iestatiet uz 100 °C
 - Iestatiet reakcijas tilpumu uz 50 µl
 - 55 °C uz 5 minūtēm

- Turēt 10 °C temperatūrā

Procedūra

1. Katrai 96 bedrīšu PĶR plates bedrītei pievienojiet 2–30 µl DNS, lai kopējais ievades daudzums būtu 50–1000 ng.
Ja DNS tilpums ir < 30 µl, DNS paraugiem pievienojiet nukleāzi nesaturošu ūdeni, lai kopējais tilpums būtu 30 µl.
2. Rūpīgi virpiniet, eBLTS līdz lodītes ir pilnībā atkārtoti suspendētas.
3. Apvienojiet mēģenē norādītos tilpumus, lai sagatavotu Atzīmēšanas galveno maisījumu. Sareiziniet katru tilpumu ar apstrādājamo paraugu skaitu.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Tilpumā ir iekļauts reaģenta papildu daudzums.
4. Rūpīgi pipetējiet atzīmēšanas galveno maisījumu, lai to samaisītu.
5. Sadaliet atzīmēšanas galvenā maisījuma tilpumu vienādi 8 mēģeņu sloksnē.
6. Izmantojot 200 µl daudzkanālu pipeti, pārnesiet 20 µl atzīmēšanas galveno maisījumu uz katru PĶR plāksnes bedrīti, kurā ir paraugs. Izmantojiet jaunus uzgaļus katrai paraugu slejai vai rindai.
7. Izmetiet 8 mēģeņu sloksni pēc atzīmēšanas galvenā maisījuma ievadīšanas.
8. Izmantojot 200 µl daudzkanālu pipeti, kas iestatīta uz 40 µl, pipetējiet katru paraugu 10 reizes, lai samaisītu. Izmantojiet jaunus uzgaļus katrai paraugu kolonnai.
Kā alternatīva – noslēdziet PĶR plāksni un kratiet ar 1600 apgr./min 1 minūti.
9. Novietojiet plāksni un tad uzlieciet uz iepriekš ieprogrammēta cikliskā sildītāja un palaidiet TAG programmu.
10. Pagaidiet, līdz TAG programma ir sasniegusi 10 °C uzturēšanas temperatūru, un pēc tam nekavējoties noņemiet plāksni.
11. Ļaujiet 96 bedrīšu PĶR plāksnei nostāvēties telpas temperatūrā 2 minūtes un pēc tam veiciet nākamo darbību.

Tīrīšana pēc atzīmēšanas

Šajā darbībā tiek mazgāta ar adapteri apzīmētā DNS eBLTS pirms PĶR amplifikācijas.

Palīgmateriāli

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96 bedrīšu PĶR plāksnes magnētiskais statīvs
- Pašlīpošais noslēgums
- 8 mēģeņu sloksne

- Pipetes uzgaļi
 - 20 µl daudzkanālu pipetes
 - 200 µl daudzkanālu pipetes
- Sagatavošana vēlākai procedūrai:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Rādītāju adaptera plāksne

Par reaģentiem

- Pārliecinieties, ka izmantojat plāksni atbilstošu magnētisko statīvu. Izmantojot MIDI plāksnes magnētisko statīvu PQR plāksnei, var traucēt TWB2 piesaisti lodītēm.
- Lēnām pipetējiet TWB2, lai samazinātu putošanu, lai izvairītos no nepareiza tilpuma aspirācijas un nepilnīgas samaisīšanas.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus palīgmateriālus.

Vienums	Glabāšana	Norādījumi
EPM	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet uz ledus 1 stundu. Apvērsiet, lai samaisītu, pēc tam īsu brīdi centrifugējiet.
ST2	No 15 °C līdz 30 °C	Ja tiek konstatētas nogulsnes, uzsildiet 37 °C temperatūrā 10 minūtes un virpiniet, līdz nogulsnes ir izšķīdinātas. Izmantojiet telpas temperatūrā.
TWB2	No 15 °C līdz 30 °C	Izmantojiet telpas temperatūrā.
Rādītāju adaptera plāksne	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet 30 minūtes telpas temperatūrā.

Procedūra

1. Pievienojiet 10 µl ST2 katrai atzīmēšanas reakcijai. Ja izmantojat daudzkanālu pipeti, pipetējiet ST2 8 mēģeņu sloksnē un pēc tam pārnesiet atbilstošos tilpumus uz PQR plāksni. Izmantojiet jaunus uzgaļus katrai paraugu slejai vai rindai.
2. Izmantojot 200 µl pipeti, kas iestatīta uz 50 µl, lēnām pipetējiet katru bedrīti 10 reizes, lai atkārtoti suspendētu lodītes.
Kā alternatīva – noslēdziet plāksni un kratiet ar 1600 apgr./min 1 minūti. Atkārtojiet pēc nepieciešamības.
3. Noslēdziet plāksni un centrifugējiet ar 280 × g 10 sekundes.
4. Inkubējiet telpas temperatūrā 5 minūtes.

5. Novietojiet uz PĶR plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (3 minūtes).
6. [≤ 48 paraugi] Mazgājiet trīs reizes kā norādīts tālāk.
 - a. Izmantojot 200 µl daudzkanālu pipeti, kas iestatīta uz 60 µl, noņemiet un izmetiet virsslāni, neaizskarot lodīšu kapsulu.
 - b. Noņemiet no magnētiskā statīva.
 - c. Uzreiz pēc tam lēnām pievienojiet 100 µl TWB2 tieši uz lodītēm.
 - d. Lēnām pipetējiet, līdz lodītes ir pilnībā atkārtoti suspendētas. Kā alternatīva – noslēdziet plāksni un kratiet ar 1600 apgr./min 1 minūti.
 - e. Ja rodas šļakatas, centrifugējiet ar 280 × g 10 sekundes.
 - f. Novietojiet uz PĶR plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (3 minūtes). Atstājiet plāksni uz magnētiskā statīva un TWB2 bedrītēs, lai novērstu pārmērīgu izžūšanu, veicot trešo mazgāšanu. Pēc PĶR galvenā maisījuma sagatavošanas noņemiet un izmetiet virsslāni.
 - g. Izmantojot 200 µl daudzkanālu pipeti, kas iestatīta uz 100 µl, noņemiet un izmetiet virsslāni.
 - h. Atkārtojiet darbības c–f divas reizes, kopā veicot trīs mazgāšanas.
7. [> 48 paraugi] Mazgājiet trīs reizes kā norādīts tālāk.
 - a. Veiciet darbības b un c ar 1 kolonnas vai 2 kolonnu soli, līdz visas kolonnas ir apstrādātas, lai novērstu pārmērīgu izžūšanu.
 - b. Izmantojot 200 µl daudzkanālu pipeti, kas iestatīta uz 60 µl, noņemiet un izmetiet virsslāni.
 - c. Noņemiet no magnētiskā statīva.
 - d. Uzreiz pēc tam lēnām ievadiet 100 µl TWB2 tieši uz lodītēm.
 - e. Lēnām pipetējiet, līdz lodītes ir pilnībā atkārtoti suspendētas. Kā alternatīva – noslēdziet plāksni un kratiet ar 1600 apgr./min 1 minūti.
 - f. Ja rodas šļakatas, centrifugējiet ar 280 × g 10 sekundes.
 - g. Novietojiet uz PĶR plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (3 minūtes). Atstājiet plāksni uz magnētiskā statīva un TWB2 bedrītēs, lai novērstu pārmērīgu izžūšanu, veicot trešo mazgāšanu. Pēc PĶR galvenā maisījuma sagatavošanas noņemiet un izmetiet virsslāni.
 - h. Izmantojot 200 µl daudzkanālu pipeti, kas iestatīta uz 100 µl, noņemiet un izmetiet virsslāni.
 - i. Noņemiet no magnētiskā statīva un lēnām pievienojiet 100 µl TWB2 tieši uz lodītēm.
 - j. Atkārtojiet darbības h un i ar 1 vai 2 kolonnu soli, līdz visas kolonnas ir apstrādātas.
 - k. Atkārtojiet darbības e–h divas reizes, kopā veicot trīs mazgāšanas.
8. Turiet uz magnētiskā statīva, līdz 4 darbībai sadaļā *Procedūra Atzīmētās DNS amplificēšana*. TWB2 paliek bedrītēs, lai novērstu lodīšu pārmērīgu izžūšanu.

Atzīmētās DNS amplificēšana

Ar šo darbību tiek amplificēta atzīmētā DNS, izmantojot ierobežota cikla PĶR programmu. PĶR darbība pievieno 1. rādītāja (i7) adapterus, 2. rādītāja (i5) adapterus un sekvences, kas nepieciešamas sekvenču kopas veidošanai.

PaĻġmateriāli

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Rādītāju adaptera plāksne
- 96 bedrīšu PĶR plāksne
- nukleāzi nesaturošs ūdens
- Pašlīpošais noslēgs
- 1,5 ml mikrocentrifūgas mēģenes
- Pipetes uzgaļi
 - 20 µl daudzkanālu pipetes
 - 200 µl daudzkanālu pipetes

Par reaģentiem

- Rādītāju adaptera plāksnes
 - Bedrīte var ietvert > 10 µl rādītāju adapteru.
 - Nepievienojiet paraugus rādītāju adapteru plāksnei.
 - Katra rādītāju plāksnes iedobe ir tikai vienreizējai lietošanai.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus paĻġmateriālus.

Vienums	Glabāšana	Norādījumi
EPM	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet 4 °C temperatūrā vai uz ledus 1 stundu. Apvērsiet, lai samaisītu, pēc tam īsu brīdi centrifugējiet.
Rādītāju adaptera plāksne	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet 30 minūtes telpas temperatūrā.

2. Saglabājiet tālāk norādīto eBLTS PĶR programmu cikliskajā sildītājā, izmantojot atbilstošo PĶR ciklu skaitu, kas norādīts tālāk tabulā.

- Izvēlieties iepriekšējās uzsildīšanas vāka iespēju un iestatiet uz 100 °C
- Iestatiet reakcijas tilpumu uz 50 µl
- 72 °C uz 3 minūtēm
- 98 °C uz 3 minūtēm
- X cikli ar:
 - 98 °C uz 20 sekundēm
 - 60 °C uz 30 sekundēm
 - 72 °C uz 1 minūti
- 72 °C uz 3 minūtēm
- Turēt 10 °C temperatūrā

Kopējais darbības laiks ir ~38 minūtes 9 cikliem un ~46 minūtes 12 cikliem.

Parauga ievades veids	PĶR ciklu skaits (X)
10–49 ng gDNS	12
50–1000 ng gDNS	9
50–1000 ng no FFPE izgūta gDNS	12
gDNS, kas izgūta no asinīm	9

Procedūra

1. Apvienojiet tālāk norādīto, lai sagatavotu PĶR galveno maisījumu. Sareiziniet katru tilpumu ar apstrādājamo paraugu skaitu.
 - EPM (23 µl)
 - Nukleāzi nesaturošs ūdens (23 µl)
 Tilpumā ir iekļauts reaģenta papildu daudzums.
2. Ar pipeti ievadiet PĶR galveno maisījumu 10 reizes, lai sajauktu, pēc tam nedaudz centrifugējiet.
3. Ar plāksni uz magnētiskā statīva izmantojiet 200 µl daudzkanālu pipeti, lai noņemtu un izmestu TWB2. Putas, kuras paliek uz berdīšu sienām, nerada negatīvu ietekmi uz bibliotēku.
4. Izņemiet no magnētiskā statīva.
5. Nekavējoties pievienojiet 40 µl PĶR galvenā maisījuma tieši uz lodītēm katrā bedrītē.
6. Nekavējoties pipetējiet, lai samaisītu, līdz lodītes atkal ir pilnībā suspendētas. Kā alternatīva — noslēdziet plāksni un kratiet ar 1600 apgr./min 1 minūti.

7. Noslēdziet paraugu plāksni un centrifugējiet ar 280 × g 10 sekundes.
8. Centrifugējiet rādītāju adapteru plāksni ar 1000 × g 1 minūti.
9. Sagatavojiet rādītāju adaptera plāksni.
 - [< 96 paraugi] Caurduriet rādītāju adaptera plāksnes folijas blīvējumu ar jaunu pipetes galu katrai bedrītei tikai apstrādājamo paraugu skaitam.
 - [96 paraugi] Novietojiet jaunu PQR plāksni ar daļējo apmali virs rādītāju adaptera plāksnes un spiediet uz leju, lai caurdurtu folijas blīvējumu. Izmetiet PQR plāksni, kas izmantota folijas blīvējuma caurduršanai.
10. Izmantojot jaunu pipetes uzgali, pievienojiet katrā bedrītē 10 µl iepriekš savienotus rādītāju adapterus.
11. Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 40 µl, pipetējiet 10 reizes, lai samaisītu. Kā alternatīva — noslēdziet plāksni un kratiet ar 1600 apgr./min 1 minūti.
12. Noslēdziet plāksni un centrifugējiet ar 280 × g 10 sekundes.
13. Novietojiet uz cikliskā sildītāja un palaidiet eBLTS PQR programmu.

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, uzglabājiet -25--15 °C temperatūrā ne ilgāk kā 30 dienas.

Bibliotēku attīrīšana

Šajā darbībā tiek izmantota divpusējo lodīšu attīrīšanas procedūra, lai attīrītu amplificētās bibliotēkas.

Palīgmateriāli

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Svaigi pagatavots 80 % etanols (EtOH)
- 96 bedrīšu 0,8 ml polipropilēna dziļo bedrīšu uzglabāšanas plāksne (MIDI plāksne)
- 96 bedrīšu PQR plāksne
- MIDI plāksnes magnētiskais statīvs
- PQR plāksnes magnētiskais statīvs
- 1,5 ml mikrocentrifūgas mēģenes
- nukleāzi nesaturošs ūdens

Par reaģentiem

- Cleanup Beads
 - Pirms katras lietošanas reizes samaisiet.
 - Samaisiet bieži, lai nodrošinātu, ka lodītes ir vienmērīgi izkliedētas.
 - Aspirējiet un dozējiet šķīdumu lēnām šķīduma viskozitātes dēļ.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus palīgmateriālus.

Vienums	Glabāšana	Norādījumi
CB	Telpas temperatūra	Virpiniet un apvērsiet, lai maisītu līdz šķidrums ir viendabīgs.
RSB	No 2 °C līdz 8 °C	Atkausējiet 30 minūtes telpas temperatūrā. Virpiniet, lai samaisītu.

Procedūra

1. Kratiet 96 bedrīšu PĶR plāksni ar 1800 apgr./min 1 minūti, un pēc tam īsu brīdi centrifugējiet.
2. Novietojiet uz PĶR plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (1 minūti).
3. Virpiniet CB 3 reizes 10 sekundes un tad vairākas reizes apvērsiet, lai atkārtoti iegūtu suspensiju.
4. Augstas kvalitātes gDNS gadījumā rīkojieties šādi.
 - a. Katrā jaunās MIDI plāksnes bedrītē pievienojiet 77 µl nukleāzi nesaturošu ūdeni.
 - b. Pievienojiet 88 µl CB katrā MIDI plāksnes bedrītē.
 - c. Pārnēsiet 45 µl virsslāņa no katras PĶR plāksnes bedrītes uz atbilstošo MIDI plāksnes bedrīti.
 - d. Izmetiet PĶR plāksni.
 - e. Pipetējiet katru bedrīti 10 reizes, lai samaisītu. Kā alternatīva – noslēdziet plāksni un kratiet ar 1800 apgr./min 1 minūti.
 - f. Noslēdziet plāksni un inkubējiet telpas temperatūrā 5 minūtes.
 - g. Pārbaudiet, vai nav gaisa burbuļu. Ja tādi novēroti, centrifugējiet uz leju.
 - h. Novietojiet uz MIDI plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (5 minūtes).
 - i. Inkubācijas laikā rūpīgi virpiniet CB, pēc tam pievienojiet 20 µl katrā bedrītē *jaunā* MIDI plāksnē.
 - j. Pārnēsiet 200 µl virsslāņa no pirmās MIDI plāksnes bedrītes uz atbilstošo jaunās MIDI plāksnes bedrīti (kas satur 20 µl CB).
 - k. Izmetiet pirmo MIDI plāksni.
 - l. Pipetējiet katru jaunās MIDI plāksnes bedrīti 10 reizes, lai samaisītu. Kā alternatīva – noslēdziet plāksni un kratiet ar 1800 apgr./min 1 minūti.
5. Ar izgūto FFPE rīkojieties kā norādīts tālāk.
 - a. Pievienojiet 81 µl CB katrā bedrītē jaunā MIDI plāksnē.
 - b. Pārnēsiet 45 µl virsslāņa no katras PĶR plāksnes bedrītes uz atbilstošo MIDI plāksnes bedrīti.
 - c. Izmetiet PĶR plāksni.
 - d. Pipetējiet katru bedrīti 10 reizes, lai samaisītu. Kā alternatīva – noslēdziet plāksni un kratiet ar 1800 apgr./min 1 minūti.
6. Inkubējiet telpas temperatūrā 5 minūtes.
7. Pārbaudiet, vai nav gaisa burbuļu. Ja tādi novēroti, centrifugējiet uz leju.

8. Novietojiet uz MIDI plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (5 minūtes).
9. Neaizskarot lodītes, noņemiet un izmetiet virsslāni.
10. Mazgājiet lodītes, kā aprakstīts tālāk.
 - a. Uz magnētiskā statīva esošajai plāksnei pievienojiet 200 µl svaiga 80 % EtOH bez maisīšanas.
 - b. Inkubējiet 30 sekundes.
 - c. Neaizskarot lodītes, noņemiet un izmetiet virsslāni.
11. Mazgājiet lodītes **otrrreiz**.
12. Žāvējiet ar gaisu uz magnētiskā statīva 5 minūtes.
13. Žāvējot gaisā, izmantojiet 20 µl pipeti, lai noņemtu un izmestu atlikušo EtOH.
14. Noņemiet no magnētiskā statīva.
15. Pievienojiet lodītēm 17 µl RSB.
16. Noslēdziet plāksni un kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
17. Inkubējiet telpas temperatūrā 2 minūtes.
18. Pārbaudiet, vai nav gaisa burbuļu. Ja tādi novēroti, centrifugējiet uz leju.
19. Novietojiet plāksni uz MIDI plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).
20. Pārnēsiet 15 µl virsslāņa uz jaunu, 96 bedrīšu PQR plāksni.

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, noslēdziet plāksni un uzglabājiet -25 °C--15 °C temperatūrā ne ilgāk kā 30 dienas.

Iepriekš bagātināto bibliotēku apvienošana

Šajā darbībā tiek apvienotas DNS bibliotēkas ar unikāliem rādītājiem vienā kopā ar līdz pat 12 bibliotēkām.

Apvienošanas metodes

Apvienot var pēc tilpuma vai pēc svara. Izmantojiet nākamo tabulu, lai noteiktu savai ievadei atbilstošu metodi.

Tabula 2 Ieteicamās apvienošanas metodes

Parauga ievade	Apvienošanas metode
10–49 ng gDNS	Svars
50–1000 ng gDNS	Tilpums
No FFPE izgūta gDNS	Svars
gDNS, kas izgūta no asinīm	Tilpums

- Bagātināšanai ar vienu kārtu nav nepieciešama bagātinātu bibliotēku apvienošana. Tomēr var būt nepieciešama RSB pievienošana.
- Pēc iepriekš bagātinātas bibliotēkas kvantifikācijas visus paraugu ievades veidus var apvienot pēc svara, lai sasniegtu optimālu rādītāju balansu.
- Iepriekš bagātinātu bibliotēku rezultāti, kas iegūti atsevišķos eksperimentālos sagatavošanas darbos, var atšķirties. Tādēļ, lai sasniegtu optimālu rādītāju līdzsvaru, ieteicams veikt apvienošanu pēc svara.
- Lietojiet 1 kārtas bagātināšanu tālāk norādītajās situācijās.
 - 10–49 ng gDNS
 - 50–1000 ng no FFPE izgūtai gDNS
 - Mazs mazo allēļu noteikšanas biežums somatisko variantu noteikšanai.

Apvienošana pēc masas

Šajās situācijās kvantificējiet savas bibliotēkas, lai izmantotu DNS masu katras bibliotēkas bagātināšanai, kas norādīta [Iepriekš bagātinātu bibliotēku ar vienādu koncentrāciju apvienošana, 36. lpp.](#)

- 10–49 ng gDNS parauga ievade
- No FFPE izgūta 50–1000 ng gDNS parauga ievade
- Mazs mazo allēļu biežuma noteikšanas ātrums somatisko variantu nosaukšanai
- No asinīm izgūta gDNS optimālam rādītāju līdzsvaram

Iepriekš bagātināto bibliotēku kvalificēšana

1. Apstrādājiet 1 µl iepriekš bagātinātu bibliotēku, izmantojot vēlamo fluorescences kvantifikācijas metodi, kurā tiek izmantota dsDNA interkalējoša krāsviela.
 - 50–1000 ng augstas kvalitātes gDNS gaidāmais iepriekš bagātinātās bibliotēkas rezultāts ir ≥ 500 ng.
 - 50–1000 ng gDNA, kas izgūta no FFPE, atkarībā no sākotnējā parauga kvalitātes sagaidāmi 500–6000 ng iepriekš bagātinātās bibliotēkas rezultāts.

PIEZĪME Kvantifikācijas metodes ar dažādiem aizstājējiem, kvalificējiet kvantifikācijas metodi šai darbplūsmai. Koncentrācijas rezultāti var atšķirties atkarībā no izmantotās metodes.

Iepriekš bagātinātu bibliotēku ar vienādu koncentrāciju apvienošana

Izmantojiet tālāk norādīto tabulu, lai noteiktu bagātināšanai nepieciešamo DNS masu katrā bibliotēkā atbilstoši parauga veidam un bagātināšanas pavairošanas kārtām. Izmantojot mazāku iepriekš bagātinātu bibliotēku apjomu, optimālu bagātināšanas un analīzes rezultātu nevar garantēt.

Kopējā DNS masa bagātināšanas reakcijā nedrīkst pārsniegt 6000 ng.

Parauga ievade	Bagātināšanas pavairošanas kārtas	DNS masa bibliotēkā (ng)	Kopējā DNS bibliotēku masa (ng)
Augstas kvalitātes gDNS	12	250–500	3000–6000
No FFPE izgūta gDNS	1	200	200

1. Reģistrējiet bibliotēku rādītājus, ko plānojat apvienot šajā darbībā.
2. Pamatojoties uz katras bibliotēkas koncentrāciju, aprēķiniet tilpumu, kas jāpievieno bagātināšanas reakcijai, lai iegūtu nepieciešamo DNS masu.
 - Augstas kvalitātes gDNS: aprēķiniet nepieciešamo bibliotēkas tilpumu 250–500 ng ievadei.
 - No FFPE izgūta gDNS: aprēķiniet nepieciešamo bibliotēkas tilpumu 200 ng ievadei.
3. Pievienojiet katrai bibliotēkai aprēķināto tilpumu vienā un tajā pašā PĶR plates bedrītē.
4. Ja izmantojat augstas kvalitātes gDNS, veiciet vienu no tālāk norādītajām darbībām, ņemot vērā iepriekš bagātināto bibliotēku apvienojuma kopējo tilpumu.
 - Ja iepriekš bagātinātās bibliotēkas tilpums = 30 µl, turpiniet ar [Zonžu hibridizēšana, 38. lpp.](#)
 - Ja iepriekš bagātinātās bibliotēkas tilpums ir < 30 µl, pievienojiet RSB, lai sasniegtu 30 µl kopējo tilpumu.
 - Ja iepriekš bagātinātās bibliotēkas tilpums ir > 30 µl, izmantojiet lodīšu bāzes metodi vai vakuuma koncentratoru, lai koncentrētu apvienoto paraugu. Pievienojiet RSB koncentrētajam apvienotajam paraugam, lai sasniegtu 30 µl kopējo tilpumu.
5. Ja izmantojat no FFPE izgūtu gDNS, veiciet vienu no tālāk norādītajām darbībām, ņemot vērā iepriekš bagātināto bibliotēku apvienojuma kopējo tilpumu.

- Ja iepriekš bagātinātās bibliotēkas tilpums = 7,5 µl, turpiniet ar [Zonžu hibridizēšana, 38. lpp.](#)
- Ja iepriekš bagātinātās bibliotēkas tilpums ir < 7,5 µl, pievienojiet RSB, lai sasniegtu 7,5 µl kopējo tilpumu.

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, noslēdziet plāksni un uzglabājiet -25 °C – -15 °C temperatūrā ne ilgāk kā 30 dienas.

Apkopot pēc tilpuma

Ja ievade ir 50–1000 ng gDNS, atsevišķu šajā eksperimentā radīto bibliotēku kvantificēšana un normalizēšana nav nepieciešama.

Lai sasniegtu optimālu veiktspēju, apvienojiet tikai iepriekš bagātinātu bibliotēku paraugus, ko sagatavojis tas pats lietotājs, izmantojot vienu reaģentu partiju un rādītāju adaptera plāksni.

1. Reģistrējiet bibliotēku rādītājus, ko plānojat apvienot šajā darbībā.
2. Apvienojiet tālāk norādīto iepriekš bagātināto bibliotēku un RSB tilpumus bagātināšanas kārtu daudzumam vienā jaunās PQR plāksnes bedrītē.
Iegūtais tilpums ir 30 µl.

Bagātināšanas kārtu daudzums *	Katras iepriekš bagātinātās bibliotēkas tilpums (µl)	RSB tilpums (µl)
1 kārta	14	16
2 kārtas	14	2
3 kārtas	10	0
4 kārtas	7,5	0
5 kārtas	6	0
6 kārtas	5	0
7 kārtas	4,2	0,6
8 kārtas	3,7	0,4
9 kārtas	3,3	0,3
10 kārtas	3	0
11 kārtas	2,7	0,3
12 kārtas	2,5	0

* Informācija par nestandarta pavairošanas kārtām (no 2 kārtām līdz 11 kārtām) atrodama sadaļā [Procedūras ierobežojumi, 2. lpp.](#)

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, noslēdziet plāksni un uzglabājiet -25 °C – -15 °C temperatūrā ne ilgāk kā 30 dienas.

[Neobligāti] Iepriekš bagātināto bibliotēku kvalificēšana

Apvienojot pēc tilpuma, lai kvantificētu iepriekš bagātinātās bibliotēkas, izmantojiet fluorometrisku metodi, kurā tiek izmantota dsDNS interkalējoša krāsviela. Lai kvalificētu iepriekš bagātinātās bibliotēkas, izmantojiet DNS fragmentu analizatoru ar atbilstošu fragmentu analīzes komplektu.

Bibliotēkas kvalificēšanai izmantojiet kopā 1 µl. Iepriekš bagātinātās bibliotēkas ir pietiekami koncentrētas, lai varētu veikt nelielu atšķaidīšanu kvantificēšanai vai fragmentu analīzei.

Zonžu hibridizēšana

Šī darbība saista mērķa DNS apgabalus ar uztveršanas zondēm.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts reaģenti ir saderīgi gan ar Illumina, gan ar trešo personu bagātināšanas DNS oligonukleotīdu paneļiem. Informāciju par nepieciešamajām specifiskajām trešo personu paneļiem skatiet [Bagātināšanas zondes paneļa prasības, 11. lpp.](#)

Palīgmateriāli

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB buferis 2 + IDT NXT blokatori (zils vāciņš))
- Bagātināšanas zondes panelis
- 96 bedrīšu PQR plāksne
- Pašlīpošais noslēgs
- Sagatavošana vēlākai procedūrai:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (dzintara krāsas vāciņš)

Par reaģentiem

- Uzglabāšanas laikā NHB2 nogulsņējas un atdalās.
- Bagātināšanas zondes panelis attiecas uz izvēlēto bagātināšanas oligonukleotīdu paneli no Illumina piegādātāja.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus palīgmateriālus.

Vienums	Glabāšana	Norādījumi
EHB2	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai. Virpiniet, lai samaisītu. Ja tiek novēroti kristāli un duļķainība, atkārtojiet virpināšanu vai pipetējiet uz augšu un uz leju, lai sajauktu līdz šķīdums ir dzidrs.
Bagātināšanas zondes panelis	-25 °C līdz -15 °C (Illumina)	Gan Illumina, gan trešo personu paneļiem sasildiet līdz telpas temperatūrai. Virpiniet, lai samaisītu.
NHB2 (zils vāciņš)	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet telpas temperatūrā. Kad sasniegta telpas temperatūra, uzsildiet mikroparaugu inkubatorā līdz tādai pašai temperatūrai kā izmantojamā zonde 5 minūtes. Virpiniet katru no tām ar maksimālo ātrumu 3 reizes 10 sekundes, lai atkārtoti suspendētu. Centrifugējiet īsu brīdi. Pipetējiet uz augšu un uz leju no mēģenes apakšas. Ja tiek novēroti kristāli un duļķainība, atkārtojiet virpināšanu vai pipetējiet uz augšu un uz leju, lai sajauktu līdz šķīdums ir dzidrs. Lietojiet, kamēr ir silts, lai izvairītos no atkārtotas nogulšņu veidošanās.
SMB3*	No 2 °C līdz 8 °C	Ja pārejat uz nākamo procedūru uzreiz pēc 90 minūšu aizturēšanas HYB programmā, ļaujiet sasniegt telpas temperatūru vismaz 2 stundas pirms HYB programmas palaišanas.
EEW* (dzintara krāsas mēģene)	No -25 °C līdz -15 °C	Ja pārejat uz nākamo procedūru uzreiz pēc 90 minūšu aizturēšanas HYB programmā, ļaujiet sasniegt telpas temperatūru vismaz 2 stundas pirms HYB programmas palaišanas. Pēc telpas temperatūras sasniegšanas, iepriekš uzsildiet mikroparauga inkubatorā līdz piemērojamai hibridizācijas un uztveršanas temperatūrai 30 minūtes pirms HYB programmas beigām.

* Ja pirms nākamās procedūras darbība tiek pārtraukta, atlieciet šī reaģenta sagatavošanu, līdz sāksiet veikt šo procedūru.

2. Saglabājiet tālāk norādīto HYB programmu cikliskajā sildītājā, izmantojot atbilstošu ciklu skaitu [Tabula 3](#).

- Izvēlieties iepriekšējās uzsildīšanas vāka iespēju un iestatiet uz 100 °C
- Reakcijas tilpuma iestatīšana
 - **[Augstas kvalitātes gDNS]** 100 µl
 - **[No FFPE izgūta gDNS]** 25 µl
- 98 °C uz 5 minūtēm
- X cikli, katrs 1 minūti, sākot ar 98 °C pirmajam ciklam, pēc tam samazinot par 2 °C katram ciklam
- Turiet 90 minūtes atbilstošajā temperatūrā:
 - **[No FFPE izgūta gDNS]** 58 °C
 - **[80 mer zondes paneļi]** 58 °C
 - **[Somatisko variantu noteikšana]** 58 °C
 - **[Visiem pārējiem]** 62 °C

Kopējais darbības laiks ir ~ 115 minūtes.

Tabula 3 Ciklu skaits katram paraugam vai panelim

Parauga un paneļa veids	Ciklu skaits (X)
No FFPE izgūta gDNS (neatkarīgi no paneļa veida)	20
80 mer zondes paneļi (neatkarīgi no parauga veida)	20
Somatisko variantu noteikšana	20
Visi pārējie paraugi un paneļi	18

Procedūra

1. **[Augstas kvalitātes gDNS]** Pievienojiet tālāk norādītos reaģentus *norādītajā secībā* katrai apvienotajai bibliotēkai PQR plāksnē.
Neveidojiet galveno maisījumu. NHB2 un EHB2 galvenā maisījuma izveidošana negatīvi ietekmē bagātināšanas veikspēju.
 - NHB2 (zils vāciņš) (50 µl)
 - Bagātināšanas zondes panelis (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. **[Augstas kvalitātes gDNS]** Izmanojot pipeti, kas iestatīta uz 90 µl, pipetējiet katru bedrīti 10 reizes, lai sajauktu.
3. **[No FFPE izgūta gDNS]** Pievienojiet tālāk norādītos reaģentus *norādītajā secībā* katrai apvienotajai bibliotēkai PQR plāksnē.
Neveidojiet galveno maisījumu. NHB2 un EHB2 galvenā maisījuma izveidošana negatīvi ietekmē bagātināšanas veikspēju.

- NHB2 (zils vāciņš) (12,5 µl)
 - Bagātināšanas zondes panelis (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[No FFPE izgūta gDNS]** Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 20 µl, pipetējiet katru bedrīti 10 reizes, lai sajauktu.
 5. Noslēdziet plāksni un centrifugējiet ar 280 × g 10 sekundes.
 6. Novietojiet parauga plāksni uz iepriekš ieprogrammēta cikliskā sildītāja un palaidiet HYB programmu.
 7. Nekavējoties pārejiet pie nākamās procedūras, kad HYB programmas temperatūras uzturēšanas laiks ir beidzies.



UZMANĪBU!

Ja hibridizācijas reakcijas temperatūra nokrīt zem telpas temperatūras, rodas nogulsnes.

Hibrīdizētu zonžu uztveršana

Šī darbība izmanto Streptavidin Magnetic Beads (SMB3), lai uztvertu zondes, kas hibridizētas mērķa interesējošajiem reģioniem.

Palīgmateriāli

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (dzintara krāsas vāciņš)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2 N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5 ml mikrocentrifūgas mēģene
- 96 berdīšu MIDI plāksne
- 96 berdīšu PQR plāksne
- Pašlīpošais noslēgs
- MIDI plāksnes magnētiskais statīvs
- Sagatavošana vēlākai procedūrai:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Par reaģentiem

- EEW

- Nodrošiniet, ka EEW pirms uzsildīšanas mikroparauga inkubatorā ir atkausēts telpas temperatūrā vismaz 2 stundas.
 - Nodrošiniet, ka pirms HYB programmas beigām EEW ir karsēts mikroparauga inkubatorā 30 minūtes.
 - Atstājiet EEW mikroparaugu inkubatorā, ja to nelietojat. EEW jāuzglabā karsts visa protokola laikā.
 - Var būt duļķains pēc telpas temperatūras sasniegšanas.
 - Var būt dzeltenā krāsā.
- SMB3
 - SMB3 pirms lietošanas jābūt telpas temperatūrā.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus palīgmateriālus.

Vienums	Glabāšana	Norādījumi
SMB3	No 2 °C līdz 8 °C	Ļaujiet nostāvēt 2 stundas, lai sasniegtu telpas temperatūru. Apvērsiet un virpiniet, līdz atkal iegūta pilnīga suspensija.
EEW (dzintara krāsas mēģene)	No -25 °C līdz -15 °C	Pēc 2 stundu inkubācijas telpas temperatūrā, iepriekš uzsildiet mikroparauga inkubatorā līdz piemērojamai hibridizācijas un uztveršanas temperatūrai 30 minūtes pirms HYB programmas beigām.
EE1	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet telpas temperatūrā un tad virpiniet.
HP3	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet telpas temperatūrā un tad virpiniet.
ET2	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai. Virpiniet, lai samaisītu.
EPM	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet uz ledus vienu stundu. Apvērsiet, lai samaisītu, pēc tam nedaudz centrifugējiet. Nolieciet malā uz ledus.
PPC	No – 25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet uz ledus vienu stundu. Virpiniet, lai samaisītu, pēc tam nedaudz centrifugējiet. Nolieciet malā uz ledus.

2. Uzsildiet vienu mikroparauga inkubatoru ar MIDI siltumbloka ieliktni, lai inkubētu parauga plāksni vienā no šādām temperatūrām. Lai uzsildītu EEW, var izmantot otru papildu mikroinkubatoru. Novietojiet EEW uz MIDI siltumbloka ieliktni.
- [FFPE] 58 °C
 - [80 mer katram zondes panelim] 58 °C
 - [Somatisko variantu noteikšana] 58 °C
 - [Visiem pārējiem] 62 °C

Procedūra

Uztveršana

1. Pievienojiet SMB3 jaunas MIDI plāksnes atbilstošajai bedrītei, kā norādīts tālāk.
 - **[Augstas kvalitātes gDNS]** Pievienojiet 250 µl SMB3.
 - **[gDNS iegūts no FFPE]** Pievienojiet 62,5 µl SMB3.
2. Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 100 µl augstas kvalitātes gDNS vai uz 25 µl FFPE, pārnesiet katru apvienoto bibliotēku no 96 berdīšu PĶR plāksnes uz atbilstošo bedrīti uz jaunās MIDI plāksnes.
3. Noslēdziet plāksni un kratiet ar 1200 apgr./min 4 minūtes.
4. Ja rodas šļakatas, īslaicīgi centrifugējiet plāksni.
5. Novietojiet apvienoto bibliotēku plāksni uz MIDI siltumbloka ieliktņa mikroparaugu inkubatorā, zem EEW mēģenes, aizveriet vāku, tad inkubējiet 15 minūtes atbilstošajā temperatūrā:
 - **[FFPE]** 58 °C
 - **[80 mer zondes panelis]** 58 °C
 - **[Somatisko variantu noteikšana]** 58 °C
 - **[Visiem pārējiem]** 62 °C
6. Noņemiet apvienoto bibliotēku plāksni un centrifugējiet ar 280 × g 30 sekundes.
7. Nekavējoties novietojiet uz MIDI plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).
8. **[Augstas kvalitātes gDNS]** Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras bedrītes, neaizskarot lodīšu kapsulu.
9. **[gDNS, kas izgūta no FFPE]** Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 90 µl, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras bedrītes, neaizskarot lodīšu kapsulu.
10. Noņemiet un izmetiet visu atlikušo virsslāni.

Mazgāšana

1. Noņemiet no magnētiskā statīva.
2. **[Augstas kvalitātes gDNS]** Ātri izņemiet EEW no mikroparaugu inkubatora un pievienojiet 200 µl katrā bedrītē.
3. **[No FFPE izgūta gDNS]** Ātri izņemiet EEW no mikroparaugu inkubatora un pievienojiet 50 µl katrā bedrītē.
4. Atgrieziet neizmantoto EEW mikroparaugu inkubatorā un uzturiet siltu.
5. Noslēdziet un kratiet to ar 1800 apgr./min 4 minūtes.
6. Novietojiet parauga plāksni uz MIDI siltumbloka ieliktņa mikroparaugu inkubatorā, zem EEW caurules, aizveriet vāku un tad inkubējiet 5 minūtes atbilstošajā temperatūrā:
 - **[FFPE]** 58 °C

- [80 mer zondes paneļi] 58 °C
 - [Somatisko variantu noteikšana] 58 °C
 - [Visi pārējie paneļi] 62 °C
7. Nekavējoties novietojiet uz MIDI plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).
 8. Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 200 µl augstas kvalitātes gDNS vai 50 µl FFPE, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras bedrītes.
 9. Atkārtojiet 1.–8. darbību divas reizes, lai kopā veiktu trīs mazgāšanas reizes.

Pārneses mazgāšana

1. Noņemiet no magnētiskā statīva.
2. **[Augstas kvalitātes gDNS]** Ātri izņemiet EEW no mikroparaugu inkubatora un pievienojiet 200 µl katrā bedrītē.
3. **[No FFPE izgūta gDNS]** Ātri izņemiet EEW no mikroparaugu inkubatora un pievienojiet 50 µl katrā bedrītē.
4. Noslēdziet un kratiet to ar 1800 apgr./min 4 minūtes. Ja rodas šļakatas, samaziniet ātrumu līdz 1600 apgr./min.
5. Pārsiet atkārtoti suspendēto lodīšu šķīdumu uz jaunu MIDI plāksni.
Kāda parauga daļa var palikt bedrītēs.



UZMANĪBU!

Reaģenta pārnese samazina atlikušo reaģentu uzkrāšanos, kas var kavēt tālāku PQR.

6. Novietojiet parauga plāksni uz MIDI siltumbloka ieliktna mikroparaugu inkubatorā, aizveriet vāku un pēc tam inkubējiet 5 minūtes atbilstošajā temperatūrā.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer zondes paneļi] 58 °C
 - [Somatisko variantu noteikšana] 58 °C
 - [Visiem pārējiem] 62 °C
7. Nekavējoties novietojiet uz MIDI plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).
8. Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 200 µl augstas kvalitātes gDNS vai uz 50 µl FFPE, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras bedrītes.
9. Centrifugējiet plāksni ar 280 × g 30 sekundes.
10. Novietojiet uz MIDI plāksnes magnētiskā statīva uz 10 sekundēm.
11. Izmantojiet 20 µl pipeti, lai noņemtu un izmestu atlikušo šķīdumu no katras bedrītes.
12. Nekavējoties pārejiet pie [Eluēšana, 45. lpp](#), lai novērstu lodīšu pārlieku izžūšanu un bibliotēkas rezultātu zudumu.

Eluēšana

1. Lai sagatavotu eluēšanas galveno maisījumu apvienojiet tālāk norādītos tilpumus. Sareiziniet katru tilpumu ar apstrādājamo apvienoto bibliotēku skaitu.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Tilpumā ir iekļauts reaģenta papildu daudzums.
2. Samaisiet, pēc tam īsu brīdi centrifugējiet.
3. Noņemiet MIDI plāksni no magnētiskā statīva.
4. Pievienojiet 23 µl eluēšanas galvenā maisījuma katrā bedrītē.
5. Noslēdziet plāksni un kratiet to ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
6. Inkubējiet plāksni telpas temperatūrā 2 minūtes.
7. Centrifugējiet ar 280 × g 30 sekundes.
8. Novietojiet uz MIDI plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).
9. Pārnesiet 21 µl virsslāņa no MIDI plāksnes uz atbilstošo bedrīti jaunā 96 bedrīšu PQR plāksnē.
10. Izmetiet MIDI plāksni.
11. Pievienojiet 4 µl ET2 katrā bedrītē, kas satur 21 µl virsslāņa.
12. Iestatiet pipeti uz 20 µl un lēnām pipetējiet katru bedrīti 10 reizes, lai sajauktu.
13. Noslēdziet plāksni un pēc tam centrifugējiet ar 280 × g 10 sekundes.
14. Inkubējiet plāksni telpas temperatūrā 1 minūti.

Bagātinātas bibliotēkas amplificēšana

Šajā darbībā tiek izmantota PQR, lai amplificētu bagātināto bibliotēku.

Palīgmateriāli

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Pašlīpošais noslēgs

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus palīgmateriālus.

Vienums	Glabāšana	Norādījumi
EPM	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet 4 °C temperatūrā vai uz ledus vienu stundu. Apvērsiet, lai samaisītu, pēc tam nedaudz centrifugējiet. Nolieciet malā uz ledus.
PPC	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet 4 °C temperatūrā uz ledus vienu stundu. Virpiniet, lai samaisītu, pēc tam nedaudz centrifugējiet. Nolieciet malā uz ledus.

2. Saglabājiet tālāk norādīto AMP programmu cikliskajā sildītājā, izmantojot atbilstošo PĶR ciklu skaitu, kas norādīts tālāk tabulā.

- Izvēlieties iepriekšējās uzsildīšanas vāka iespēju un iestatiet uz 100 °C
- Iestatiet reakcijas tilpumu uz 50 µl
- 98 °C uz 45 sekundēm
- (X) cikli:
 - 98 °C uz 30 sekundēm
 - 60 °C uz 30 sekundēm
 - 72 °C uz 30 sekundēm
- 72 °C uz 5 minūtēm
- Turēt 10 °C temperatūrā

Kopējais darbības laiks ir ~ 35 minūtes.

Parauga un paneļa veids	(X) Cikli
FPPE	14
illumina Eksoma panelis (CEX) augstas kvalitātes gDNS	10
illumina Eksoma panelis (CEX) FFPE	12
Visi pārējie paraugi un paneļi	12 ¹²³⁴

¹ Maziem trešo personu paneļiem var pielāgot līdz 15 cikliem, veicot tālāku optimizēšanu. Izmantojot FFPE, ciklu skaitu var pielāgot līdz 17.

² Trešo personu paneļiem, kuriem ir tikai 500 zondes, var pielāgot līdz 17 cikliem. Izmantojot FFPE, ciklu skaitu var pielāgot līdz 19.

³ FFPE paraugiem var pielāgot līdz 14 cikliem.

⁴ PĶR ciklu skaita palielināšana FFPE paraugiem var palielināt dublikātu skaitu un samazināt fragmentu izmērus.

Procedūra

1. Pievienojiet 5 µl PPC katrai bedrītei.

2. Pievienojiet 20 µl EPM katrai bedrītei.
3. Noslēdziet plāksni un kratiet ar 1200 apgr./min 1 minūti.
4. Centrifugējiet plāksni ar 280 × g 10 sekundes.
5. Novietojiet uz iepriekš ieprogrammēta cikliskā sildītāja un palaidiet AMP programmu.

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, uzglabājiet 2–8 °C temperatūrā ne ilgāk kā divas dienas. Atstājiet uz cikliskā sildītāja līdz pat 24 stundām.

Aplificēto bagātināto bibliotēku tīrīšana

Šajā darbībā tik izmantots Cleanup Beads, lai attīrītu bagātināto bibliotēku un likvidētu nevēlamos produktus.

Palīgmateriāli

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Svaigi pagatavots 80 % etanols (EtOH)
- Pašlīpošie noslēgi
- 96 berdīšu MIDI plāksne
- 96 bedrīšu PĶR plāksne
- MIDI plāksnes magnētiskais statīvs

Par reaģentiem

- Cleanup Beads
 - Pirms katras lietošanas reizes samaisiet.
 - Samaisiet bieži, lai nodrošinātu, ka lodītes ir vienmērīgi izkliedētas.
 - Aspirējiet un dozējiet šķīdumu lēnām šķīduma viskozitātes dēļ.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus palīgmateriālus.

Vienums	Glabāšana	Norādījumi
CB	Telpas temperatūra	Virpiniet un apvērsiet, lai maisītu līdz šķīduma krāsa ir viendabīga.
RSB	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai. Virpiniet, lai samaisītu.

2. Sagatavojiet svaigu 80 % EtOH no absolūtā etanola.

Procedūra

1. Centrifugējiet PĶR plāksni ar 280 × g 10 sekundes.
2. Virpiniet CB 3 reizes 10 sekundes un pēc tam apvērsiet.
3. Pievienojiet 40,5 µl CB katrā bedrītē jaunā **MIDI** plāksnē.
4. Pārnesiet 45 µl no katras PĶR plāksnes bedrītes uz atbilstošo MIDI plāksnes bedrīti.
5. Noslēdziet plāksni un kratiet ar 1800 apgr./min 1 minūti.
6. Inkubējiet MIDI plāksni telpas temperatūrā 5 minūtes.
7. Centrifugējiet ar 280 × g 10 sekundes.
8. Novietojiet uz MIDI plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (5 minūtes).
9. Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 95 µl, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras bedrītes.
10. Mazgājiet divas reizes, kā norādīts tālāk.
 - a. Uz magnētiskā statīva esošajai plāksnei pievienojiet 200 µl svaiga 80 % EtOH bez maisīšanas.
 - b. Inkubējiet 30 sekundes.
 - c. Neaizskarot lodītes, noņemiet un izmetiet virsslāni.
11. Žāvējiet ar gaisu uz magnētiskā statīva 5 minūtes.
12. Žāvējot gaisā, izmantojiet 20 µl pipeti, lai noņemtu un izmestu atlikušo EtOH no katras bedrītes.
13. Noņemiet no magnētiskā statīva un pievienojiet 32 µl RSB katrai bedrītei.
14. Noslēdziet plāksni un kratiet ar 1800 apgr./min 1 minūti.
15. Inkubējiet plāksni telpas temperatūrā 5 minūtes.
16. Centrifugējiet ar 280 × g 10 sekundes.
17. Novietojiet uz MIDI plāksnes magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).
18. Pārnesiet 30 µl virsslāņano 96 bedrīšu MIDI plāksnes uz jaunas PĶR plāksnes atbilstošo bedrīti.
19. Izmetiet MIDI plāksni.

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, noslēdziet plāksni un uzglabājiet -25 °C – -15 °C temperatūrā ne ilgāk kā 7 dienas.

Bagātināto bibliotēku pārbaude

Lai kvantificētu dubultās virknes gDNS ievadi, izmantojiet fluorescences metodi, kurā tiek izmantota interkalējoša krāsviela. Izvairieties no metodēm, kas mēra kopējo nukleīnskābi, piemēram, NanoDrop vai citām UV absorbcijas metodēm.

1. Apstrādājiet 1 µl bagātināto bibliotēku, izmantojot kvantifikācijas metodi.

PIEZĪME Kopējā zondes molaritāte proporcionāli ietekmē bibliotēkas rezultātus pēc bagātināšanas.

Sagaidāms vidējais ieliktņa izmērs 125–235 bp un bibliotēkas fragmentu sadalījums ar izmēru diapazonu no ~200 bp līdz ~1000 bp.

Bibliotēku atšķaidīšana līdz sākuma koncentrācijai

Šī darbība atšķaida bibliotēkas līdz sekvencēšanas sistēmas sākuma koncentrācijai, un tā ir pirmā darbība sērijveida atšķaidīšanā. Pēc atšķaidīšanas līdz sākuma koncentrācijai bibliotēkas ir gatavas denaturēšanai un atšķaidīšanai līdz gala ievietošanas koncentrācijai.

Sekvencēšanai, neatkarīgi no izmantotās bagātināšanas zondes paneļa, Illumina ieteicams izveidot pāra tipa apstrādi ar 151 ciklu katram nolasījumam (2 × 151) un 10 cikliem katram rādītāju nolasījumam. Ja vēlaties mazāk lasījumu, kas pārklājas, vai mazāku aptvērumu, varat samaināt sekvencēšanu līdz 2 × 126 vai 2 × 101.

- Aprēķiniet bibliotēkas vai bibliotēku apvienojuma molaritātes vērtību, izmantojot tālāk norādīto formulu.
 - Bibliotēkām, kas ir kvalificētas DNS fragmentu analizatoram, izmantojiet bibliotēkai iegūto vidējo izmēru.
 - Visām citām kvalifikācijas metodēm izmantojiet 350 bp kā vidējo bibliotēkas izmēru.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{vidējais bibliotēkas izmērs (bp)}} = \text{Molaritāte (nM)}$$

Piemēram, ja bibliotēkas koncentrācija ir 20 ng/μl un vidējais izmērs ir 350 bp, iegūtā molaritātes vērtība ir 86,58 nM.

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

- Izmantojot molaritātes vērtību, aprēķiniet RSB bibliotēku tilpumu un bibliotēku skaitu, kas nepieciešams, lai tās atšķaidītu līdz Jūsu sistēmas sākuma koncentrācijai.

Sekvencēšanas sistēma	Minimālais nepieciešamais bibliotēkas tilpums (μl)	Sākuma koncentrācija (nM)	Gala ievietošanas koncentrācija (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) vai 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM ir sākuma koncentrācija gala ievietošanas koncentrācijai 350 pM. Ja nepieciešams, pielāgojiet gala ievietošanas koncentrāciju, izmantojot tālāk sniegto tabulu.

Gala ievietošanas koncentrācija (pM)	Bibliotēku apvienojuma koncentrācija (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50

Gala ievietošanas koncentrācija (pM)	Bibliotēku apvienojuma koncentrācija (nM)
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

- Bibliotēku atšķaidīšana, izmantojot RSB.
 - Bibliotēkas, kas tiek kvantificētas kā multipleksētu bibliotēku apvienojums** — atšķaidiet apvienojumu līdz Jūsu sistēmas sākuma koncentrācijai.
 - Bibliotēkas, kas tiek kvantificētas individuāli** — atšķaidiet katru bibliotēku līdz Jūsu sistēmas sākuma koncentrācijai. Pievienojiet mēģenē 10 µl katras atšķaidītās bibliotēkas, lai izveidotu daudzkārtīgi pavairotu bibliotēku apvienojumu.
- Lai atšķaidītu līdz gala ievietošanas koncentrācijai, izpildiet Jūsu sistēmas norādījumus par denaturēšanu un atšķaidīšanu.
 - Informāciju NextSeq 550Dx sistēmai skatiet [NextSeq 550Dx sekvencēšanas sagatavošana, 51. lpp.](#)
 - Informāciju MiSeqDx sistēmai skatiet [MiSeqDx sekvencēšanas sagatavošana, 53. lpp.](#)
 - Informāciju NovaSeq 6000Dx sistēmai skatiet [NovaSeq 6000Dx sekvencēšanas sagatavošana, 54. lpp.](#)

Gala ievietošanas koncentrācijas ir sākumpunkts un vispārīga norāde. Optimizējiet koncentrācijas Jūsu darbplūsmā un kvantifikācijas metodei turpmākajos sekvencēšanas ciklos vai ar plūsmas elementu titrēšanu.

NextSeq 550Dx sekvencēšanas sagatavošana

Skatiet tālāk sniegtos norādījumus bibliotēku denaturēšanai un atšķaidīšanai sekvencēšanai NextSeq 550Dx sekvencēšanas sistēmā.

Palīgmateriāli

- HT1 (Hibridizācijas buferis)
- 1 N NaOH
- 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

Sagatavošana

Sagatavojiet *svaigu* 0,2 N NaOH šķīdumu, lai denaturētu bibliotēkas sekvencēšanai. Lai novērstu nelielas pipetēšanas kļūdas, kas varētu ietekmēt beigu NaOH koncentrāciju, tiek sagatavots papildu tilpums.



UZMANĪBU!

Denaturācijas procesam ir svarīgs svaigi atšķaidīts 0,2N NaOH. Nepareiza denaturācija var samazināt produktivitāti.

1. Sagatavojiet šādus palīgmateriālus.

Vienums	Glabāšana	Norādījumi
HT1	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet telpas temperatūrā. Glabājiet 2–8 °C temperatūrā līdz esat gatavi atšķaidīt denaturētās bibliotēkas.

2. Lai sagatavotu svaigu NaOH šķīdumu, mikrocentrifūgas mēģenē apvienojiet šādus tilpumus:
 - laboratorijas klases ūdens (800 µl);
 - 1 N NaOH (200 µl)
 Iegūst 1 ml 0,2 N NaOH.
3. Apgrieziet mēģeni vairākas reizes, lai samaisītu.
4. Lai sagatavotu 200 mM Tris-HCl, ar pH 7,0 apvienojiet mikrocentrifūgas mēģenē šādus tilpumus:
 - laboratorijas klases ūdens (800 µl)
 - 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)
 Rezultāts ir 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

PIEZĪME Turiet mēģeni ar uzliktu vāciņu. Izmantojiet svaigi atšķaidīto šķīdumu **12 stundu** laikā.

Bibliotēku denaturācija

1. Apvienojiet mikrocentrifūgas mēģenē šādus bibliotēkas un svaigi atšķaidīta 0,2 N NaOH, tilpumus.
 - 10 µl bibliotēka
 - 10 µl 0,2 N NaOH
2. Īsu brīdi maisiet un pēc tam 1 minūti centrifugējiet ar spēku 280 × g.
3. Inkubējiet telpas temperatūrā 5 minūtes.
4. Pievienojiet 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Denaturētu bibliotēku atšķaidīšana līdz 20 pM

1. Pievienojiet mēģenē ar denaturētām bibliotēkām 970 µl iepriekš atdzesēta HT1. Rezultāts ir 20 pM denaturēta bibliotēka.
2. Īsu brīdi maisiet un pēc tam 1 minūti centrifugējiet ar spēku 280 × g.
3. Uzlieciet 20 pM bibliotēkas uz ledus, līdz esat gatavs veikt galīgo atšķaidīšanu.

Bibliotēku atšķaidīšana līdz ievietošanas koncentrācijai

- Lai denaturētu 20 pM bibliotēkas šķīdumu atšķaidītu līdz 1,2 pM, pievienojiet šādus tilpumus.
 - Denaturēts bibliotēkas šķīdums (78 µl)
 - Iepriekš atdzesēts HT1 (1222 µl)
 Kopējais tilpums ir 1,3 ml ar koncentrāciju 1,2 pM.
- Apvērsiet, lai sajauktu, un pēc tam centrifugējiet ar impulsu.
- Turpiniet ar sekvencēšanu. Norādījumus skatiet *NextSeq 550Dx Instrumenta atsauces rokasgrāmatā (dokuments Nr. 1000000009513)* un *Vietējās izpildes pārvaldnieka DNS ģenerēšanas FASTQ Dx darbplūsmas rokasgrāmatā instrumentam NextSeq 550Dx (dokuments Nr. 200015671)* vai *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on NextSeq 550Dx lietojumprogrammas lietotāja rokasgrāmatā (dokuments Nr. 200025238)*.

MiSeqDx sekvencēšanas sagatavošana

Lai veiktu sekvencēšanu MiSeqDx sekvencēšanas sistēmā, izmantojiet tālāk sniegtos norādījumus bibliotēku denaturēšanai un atšķaidīšanai.

Palīgmateriāli

- HT1 (Hibridizācijas buferis)
- 1 N NaOH

Sagatavošana

Sagatavojiet *svaigu* 0,2 N NaOH šķīdumu, lai denaturētu bibliotēkas sekvencēšanai. Lai novērstu nelielas pipetēšanas kļūdas, kas varētu ietekmēt beigu NaOH koncentrāciju, tiek sagatavots papildu tilpums.



UZMANĪBU!

Denaturācijas procesam ir svarīgs *svaigi* atšķaidīts 0,2N NaOH. Nepareiza denaturācija var samazināt produktivitāti.

- Sagatavojiet šādus palīgmateriālus.

Vienums	Glabāšana	Norādījumi
HT1	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet telpas temperatūrā. Glabājiet 2–8 °C temperatūrā līdz esat gatavi atšķaidīt denaturētās bibliotēkas.

- Lai sagatavotu *svaigu* NaOH šķīdumu, mikrocentrifūgas mēģenē apvienojiet šādus tilpumus:
 - laboratorijas klases ūdens (800 µl);
 - 1 N NaOH (200 µl)
 Iegūst 1 ml 0,2 N NaOH.

PIEZĪME Turiet mēģeni ar uzliktu vāciņu. Izmantojiet svaigi atšķaidīto šķīdumu **12 stundu** laikā.

4 nM bibliotēkas denaturēšana

1. Mikrocentrifūgas mēģenē sajauciet turpmāk norādītās sastāvdaļas.
 - 4 nM bibliotēka (5 µl)
 - 0,2 N NaOH (5 µl)
2. Īsu brīdi maisiet un pēc tam 1 minūti centrifugējiet ar spēku 280 × g.
3. Inkubējiet telpas temperatūrā 5 minūtes.
4. Pievienojiet mēģenē, kas satur denaturētu bibliotēku, 990 µl iepriekš atdzesēta HT1. Iegūst 1 ml 20 pM denaturētas bibliotēkas.

Denaturētu 20 pM bibliotēku atšķaidīšana

1. Atšķaidiet līdz vēlamajai koncentrācijai, izmantojot tālāk norādītos tilpumus.

Koncentrācija	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM bibliotēka	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
iepriekš atdzesēts HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Apvēršiet, lai sajauktu, un pēc tam centrifugējiet ar impulsu.
3. Turpiniet ar sekvencēšanu. Norādījumus skatiet *MiSeqDx instrumenta atsaucēs rokasgrāmata programmatūrai MOS v4 (dokumenta Nr. 1000000157953)* un *Vietējās izpildes pārvaldnieka DNS ģenerēšanas FASTQ Dx darbplūsmas rokasgrāmata instrumentam MiSeqDx (dokuments Nr. 200015661)*.

NovaSeq 6000Dx sekvencēšanas sagatavošana

Lai veiktu sekvencēšanu NovaSeq 6000Dx sekvencēšanas sistēmā, izmantojiet tālāk sniegtos norādījumus bibliotēku denaturēšanai un atšķaidīšanai.

Palīgmateriāli

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

Sagatavošana

Sagatavojiet *svaigu* 0,2 N NaOH šķīdumu, lai denaturētu bibliotēkas sekvencēšanai. Lai novērstu nelielas pipetēšanas kļūdas, kas varētu ietekmēt beigu NaOH koncentrāciju, tiek sagatavots papildu tilpums.



UZMANĪBU!

Denaturācijas procesam ir svarīgs *svaigi* atšķaidīts 0,2N NaOH. Nepareiza denaturācija var samazināt produktivitāti.

- Lai atšķaidītu 1 N NaOH līdz 0,2 N NaOH, apvienojiet mikrocentrifūgas mēģenē šādus tilpumus:

Tabula 4 S2 režīms

Reaģents	Apjoms vienam plūsmas elementam (µl)	Apjoms diviem plūsmas elementiem (µl)
Laboratorijas tīrības pakāpes ūdens	40	80
Krājuma 1N NaOH	10	20

Šie tilpumi nodrošina 50 µl 0,2 N NaOH vienam plūsmas elementam vai 100 µl 0,2 N NaOH diviem plūsmas elementiem.

Tabula 5 S4 režīms

Reaģents	Apjoms vienam plūsmas elementam (µl)	Apjoms diviem plūsmas elementiem (µl)
Laboratorijas tīrības pakāpes ūdens	80	160
Krājuma 1N NaOH	20	40

Šie tilpumi nodrošina 100 µl 0,2 N NaOH vienam plūsmas elementam vai 200 µl 0,2 N NaOH diviem plūsmas elementiem.

- Vairākas reizes apvērsiet, lai samaisītu, vai rūpīgi virpiniet.
- Lai sagatavotu 400 mM Tris-HCl, ar pH 8,0 apvienojiet mikrocentrifūgas mēģenē šādus tilpumus:
 - laboratorijas klases ūdens (600 µl)
 - 1 M Tris-HCl, pH 8,0 (400 µl)
 Iegūst 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0

PIEZĪME Turiet mēģeni ar uzliktu vāciņu. Izmantojiet *svaigi* atšķaidīto šķīdumu **12 stundu** laikā.

Normalizētu bibliotēku apvienojuma izveidošana

Ievietošanas koncentrācija var mainīties atkarībā no bibliotēkas sagatavošanas, kvantifikācijas un normalizācijas metodēm.

Izmantojiet tālāk sniegtos norādījumus, lai normalizētu bibliotēkas līdz atbilstošajai koncentrācijai un pēc tam veidotu apvienojumu. Vienā plūsmas elementā sekvencētās bibliotēkas jāapvieno vienā normalizētā apvienojumā.

PIEZĪME Maksimālais paraugu skaits, ko var apstrādāt vienā joslā ar Illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplekts, ir 192. Šis ierobežojums ir saistīts ar kopējo UD rādītāju skaitu A un B komplektā.

Bibliotēku normalizēšana apvienošanai

- Nosakiet nepieciešamo apvienoto bibliotēku koncentrāciju, pamatojoties uz vēlamo beigu ievietošanas koncentrāciju.
 - Beigu ievietošanas koncentrācijai 350 pM nepieciešamā apvienoto bibliotēku koncentrācija ir 1,75 nM.
 - Lai noteiktu apvienoto bibliotēku koncentrāciju citai beigu ievietošanas koncentrācijai, skatiet [Bibliotēku atšķaidīšana līdz sākuma koncentrācijai, 50. lpp.](#)
- Normalizējiet bibliotēkas līdz vēlamajai apvienotās bibliotēkas koncentrācijai, izmantojot 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.

Lai saņemtu palīdzību bibliotēku atšķaidīšanai līdz atbilstošai koncentrācijai, skatiet [Apvienošanas kalkulators](#) Illumina tīmekļa vietnē.

Ieteicamā ievietošanas koncentrācija

Optimālā DNS ievietošanas koncentrācija ir atkarīga no bibliotēkas veida un ieliktna izmēra. Bibliotēkām > 450 bp var būt nepieciešama augstāka ievietošanas koncentrācija.

Normalizētu bibliotēku apvienošana un izvēles PhiX kontroles pievienošana

- Apvienojiet katras normalizētās bibliotēkas atbilstošo tilpumu jaunā mikrocentrifūgas mēģenē, lai iegūtu vienu no šādiem gala tilpumiem:

Režīms	Galīgais tilpums (µl)
S2	150
S4	310

- [Izvēles]** Pievienojiet 1 % nedenaturēta PhiX, kā norādīts tālāk.
 - Atšķaidiet 10 nM PhiX līdz 2,5 nM, izmantojot 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
 - Pievienojiet atbilstoša tilpuma nedenaturēta 2,5 nM PhiX mēģenē ar apvienotajām nedenaturētajām bibliotēkām.

Režīms	Nedenaturēts 2,5 nM PhiX (µl)	Nedenaturētu bibliotēku apvienojums (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Pievienojot PhiX, 1 % ir ieteicamais daudzums labi līdzsvarotām bibliotēkām. Bibliotēkām ar zemu daudzveidību var būt nepieciešams vairāk. Lai izmantotu PhiX kontroli bibliotēkās ar zemu daudzveidību, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.

Denaturētu bibliotēku apvienošana un izvēles PhiX kontrole

1. Pievienojiet 0,2N NaOH nedenaturētu bibliotēku apvienojuma un izvēles PhiX mēģenei kā aprakstīts tālāk.

Plūsmas elements	0,2N NaOH	Nedenaturētu bibliotēku apvienojums (µl)	legūtais tilpums
S2	37	150	187 µl vai 187,9 µl ar PhiX
S4	77	310	387 µl vai 388,9 µl ar PhiX

2. Uzlieciet vāciņu un īsu brīdi virpiniet.
3. Centrifugējiet 280 × g līdz vienai minūtei.
4. Inkubējiet istabas temperatūrā 8 minūtes, lai to denaturētu.
5. Pievienojiet 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 kā norādīts tālāk, lai to neitralizētu.

Režīms	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	legūtais tilpums
S2	38	225 µl vai 225,9 µl ar PhiX
S4	78	465 µl vai 466,9 µl ar PhiX

6. Uzlieciet vāciņu un īsu brīdi virpiniet.
7. Centrifugējiet 280 × g līdz vienai minūtei.
8. Pārnesiet visu denaturētās bibliotēkas un PhiX tilpumu uz NovaSeq 6000Dx bibliotēkas mēģeni.
9. Turpiniet ar sekvencēšanu. Norādījumus skatīt *NovaSeq 6000Dx instrumenta produkta dokumentā* (dokuments Nr. 200010105) un *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx for NovaSeq 6000Dx* (dokuments Nr. 200014776)

Problēmu novēršana

Izmantojiet tālāk norādīto tabulu, lai novērstu problēmas darbplūsmā. Ja sekvencēšanas izpilde vai bibliotēkas sagatavošana paraugam neizdodas divas reizes, var būt nepieciešama papildu problēmu novēršana. Sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.

Novērojums	Iespējamais cēlonis	Ieteicamā darbība
Sekvencēšanas izpilde neiztur izpildes kvalitātes kontroles specifikācijas	Lietotāja vai laboratorijas aprīkojuma kļūda analīzes darbplūsmā	<p>Kvalificējiet bagātinātās bibliotēkas, lai nodrošinātu atbilstošu bibliotēku rezultātu un fragmentu izmēru sadalījumu.</p> <p>Atkārtojiet bibliotēkas sagatavošanu no kādas no tālāk minētajām darbībām atkarībā no tā, kur radās aizdomas par lietošanas vai aprīkojuma kļūdu. Ja nav zināms vai ir radušās citas kļūdas, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu, lai veiktu procedūras traucējummeklēšanu.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Veiciet bibliotēku atkārtotu sekvencēšanu. Skatiet NextSeq 550Dx sekvencēšanas sagatavošana, 51. lpp., MiSeqDx sekvencēšanas sagatavošana, 53. lpp. vai NovaSeq 6000Dx sekvencēšanas sagatavošana, 54. lpp. • Veiciet bibliotēkas atkārtotu bagātināšanu. Skatiet sadaļu Zonžu hibridizēšana, 38. lpp. • Sāciet bibliotēkas sagatavošanu no darbplūsmas sākuma. Skatiet Lietošanas instrukcija, 22. lpp.
	Instrumenta problēma	Sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.
Kļūda ar FASTQ ģenerēšanu vai vispārīga sekvencēšanas sistēmas kļūda (piemēram, tīkla kļūda, kļūda ar reaģentu ielādēšanu/izlādēšanu utt.)	Programmatūras vai instrumenta problēma	<p>Skatiet moduļa vai lietojumprogrammas rokasgrāmatu, lai saņemtu palīdzību analīzes veikšanā, vai skatiet NextSeq 550Dx instrumenta atsauces rokasgrāmata (dokumenta Nr. 100000009513), MiSeqDx instrumenta atsauces rokasgrāmata programmatūrai MOS v4 (dokumenta Nr. 100000157953) vai NovaSeq 6000Dx instrumenta produkta dokumentu (dokuments Nr. 200010105).</p> <p>Lai saņemtu papildu palīdzību, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.</p>

Novērojums	Iespējamais cēlonis	Ieteicamā darbība
DNS bibliotēka nenodrošina pietiekamus rezultātus sekvencēšanas ielādei	Neatbilst parauga ievades prasībām	Nodrošiniet atbilstošu paraugu ievadi un atkārtojiet bibliotēkas sagatavošanu. Skatiet Paraugu ievades ieteikumi, 18. lpp.
	Izmantošanas vai aprīkojuma kļūda analīzes darbplūsmā	Atkārtojiet bibliotēkas sagatavošanu no kādas no tālāk minētajām darbībām atkarībā no tā, kur radās aizdomas par lietošanas vai aprīkojuma kļūdu. Ja nav zināms vai ir radušās citas kļūdas, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu, lai veiktu procedūras traucējummeklēšanu. <ul style="list-style-type: none"> • Veiciet bibliotēku atkārtotu sekvencēšanu. Skatiet NextSeq 550Dx sekvencēšanas sagatavošana, 51. lpp., MiSeqDx sekvencēšanas sagatavošana, 53. lpp vai NovaSeq 6000Dx sekvencēšanas sagatavošana, 54. lpp. • Veiciet bibliotēku atkārtotu bagātināšanu. Skatiet sadaļu Zonžu hibridizēšana, 38. lpp. • Sāciet bibliotēkas sagatavošanu no darbplūsmas sākuma. Skatiet Lietošanas instrukcija, 22. lpp.
	Nav izpildītas prasības bagātināšanas zondes panelim	Nodrošiniet atbilstošu bagātināšanas zondes paneli un atkārtojiet bibliotēkas sagatavošanu. Skatiet Bagātināšanas zondes paneļa prasības, 11. lpp.

Veiktspējas raksturlielumi

Veiktspēja ar pilna eksoma paneļiem

Eksoma paneļa veiktspēja tika pārbaudīta, izmantojot zemāko (50 ng) un augstāko (1000 ng) ieteicamo Coriell Cell Line gDNA NA12878 ievadi, ar zināmu patiesu dzimumšūnas līniju variantu noteikšanas komplektu (Coriell platīna genoms). Kā reprezentatīvie paneļi tika izmantoti eksoma panelis 1 (45 Mb) un eksoma panelis 2 (36,8 Mb). 24 tehniskie replikāti, tika testēti ar Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi, izmantojot eksoma paneli 1 (45 Mb) divās 12 kārtīgās bagātināšanas reakcijās. 12 tehniskie replikāti tika testēti ar Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi, izmantojot eksoma paneli 2 (36,8 Mb) vienā 12-kārtīgā bagātināšanas reakcijā. Bagātinātās bibliotēkas tika sekvencētas ar NextSeq 550Dx sekvencēšanas sistēmu, izmantojot DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager moduli.

Nākamajā tabulā ir attēlotas vidējās sekundārās sekvencēšanas un variantu noteikšanas veiktspējas metrikas vērtības tehniskajiem replikātiem, kas testēti ar katru paneli.

Tabula 6 Analīzes veikspēja ar diviem pilna eksoma paneļiem

Panelis	Balstīta unikāla nolasiņuma bagātināšana	Pārklājuma viendabīgums	Fragmentu garuma mediāna	SNV atsaukums ¹	SNV precizitāte ²	Inserciju + delēciju noteikšana ¹	Inserciju + delēciju noteikšanas precizitāte ²
Eksoma panelis 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Eksoma panelis 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹ANoteikšana = pozitīvās/(patiesi pozitīvās + viltus negatīvās)

²Precizitāte = patiesi pozitīvās/(patiesi pozitīvās + viltus pozitīvās)

Noteikšanas robeža

Lai pārbaudītu noteikšanas robežu, tika izmantots atsauces standarts Horizon HD799 DNA. HD799 sastāv no mēreni bojātas, ar formālu apstrādātas DNS ar zināmu SNV, allēļu biežumā, kas ir diapazonā 1–24,5 %. Tika izmantota viszemākā ieteicamā DNS ievade (50 ng) un novērtēts SNV noteikšanas biežums ar $\geq 5,0$ % varianta allēles biežumu (VAF). 16 tehniskie replikāti tika testēti, izmantojot Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi, izmantojot FFPE darbplūsmu, kas bagātināta ar dažādu vēžu bagātināšanas paneli (1,94 Mb) 16 (1 kārtīgos) bagātināšanas gadījumos, un pēc tam sekvencēti NextSeq 550Dx instrumentā ar DNA GenerateFASTQ Dx moduli.

Visiem paraugi atbilda panelim specifiskām parauga veikspējas prasībām kā parādīts nākamajā tabulā.

Tabula 7 Parauga veikspēja noteikšanas robežai

Panelis	SNV variantu noteikšanas biežums $\geq 5,0$ % VAF	Vidējais Pārklājuma viendabīgums
Dažādu vēžu bagātināšanas panelis (1,94 Mb, 523 gēni)	100 %	99 %

Traucējošās vielas

Iespējamo traucējošo vielu ietekme tika novērtēta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, novērtējot analīzes veikspēju traucējošo vielu klātbūtnē.

Traucējumi pilnasinīs

Acetaminofēns (eksogēns savienojums, zāles), kreatinīns un triglicerīdi (endogēni metabolīti) tika testēti, pievienojot tos cilvēka asins paraugos pirms DNS ekstrakcijas. Lai novērtētu traucējumus, kas rodas asins paņemšanas laikā (īsa parauga paņemšana), pilnasiņu paraugiem tika pievienota arī EDTA. Turklāt, lai novērtētu traucējumus, kas rodas paraugu sagatavošanas rezultātā, DNS, kas izgūta no pilnasinīm, tika pievienots molekulārās klases etanols.

Nākamajā tabulā ir redzamas testa koncentrācijas katrai traucējošajai vielai.

Tabula 8 Iespējami traucējošās vielas un koncentrācijas, kas testētas pilnasinīs

Testa viela	Testa koncentrācija
Acetaminofēns	15,6 mg/dL* Trīs reizes augstāka koncentrācija, nekā sagaidāma pēc zāļu terapeitiskās devas lietošanas.
Kreatinīns	15 mg/dL* Augstākā novērotā koncentrācija populācijā.
Triglicerīdi	1,5 g/dL* Augstākā novērotā koncentrācija populācijā.
EDTA	6 mg/ml Trīs reizes lielāka koncentrācija par sagaidāmo asinīs, kas paņemtas EDTA mēģenēs.
Molekulārās klases etanols	15 % tilpuma attiecība eluātā pēc DNS ekstrakcijas.

* Saskaņā ar CLSI EP37-ED1:2018

Katrai traucējošajai vielai ar illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi tika testēti 12 tehniskie replikāti, kas bagātināti ar eksoma paneli 1 (45 Mb) vienā (12-kārtīgā) bagātināšanā un pēc tam sekvencēti NextSeq 550Dx instrumentā ar DNA GenerateFASTQ Dx moduli.

Testētajām vielām visi 12 paraugi atbilda parauga veiktspējas prasībām, un netika novēroti traucējumi analīzes veiktspējai.

Traucējumi FFPE audos

Tika pārbaudīti divi kolorektālie FFPE paraugi hemoglobīna klātbūtnē un bez tā, ar 0,1 mg uz 10 µm FFPE sekcijā, lai attēlotu sliktāko scenāriju 50 % FFPE audu paraugu piesārņojumam ar asinīm ar augstu hemoglobīna līmeni. Paraugi tika testēti, izmantojot illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi, izmantojot dažādu vēžu bagātināšanas paneli 1 (1,94 Mb) kā raksturīgo paneli vienas kārtas bagātināšanai. Bagātinātās bibliotēkas pēc tam tika sekvencētas ar NextSeq 550Dx instrumentu ar DNA GenerateFASTQ Dx moduli. Visi paraugi atbilda parauga veiktspējas prasībām, un tika pierādīts, ka hemoglobīns nerada traucējumus analīzes veiktspējai.

Lai novērtētu traucējumus, kas rodas parauga sagatavošanas rezultātā, divi eksogēni savienojumi tika pievienoti DNS, kas izgūta no urīnpūšļa vēža FFPE audu parauga. Testētās eksogēnās vielas ir ekstrakcijas šķīdumi, ko parasti izmanto DNS ekstrakcijas procesā, un kas ir uzskaitīti kopā ar pārbaudītiem daudzumiem nākamajā tabulā.

Testa vielas šķīdumi ir komerciāli pieejami uz kolonnām bāzētos DNS izolēšanas komplektos.

Tabula 9 Potenciāli traucējošās eksogēnās vielas un koncentrācijas, kas testētas FFPE

Testa viela	Testa koncentrācija (µl / 30 µl eluātā)
Parafīna noņemšanas šķīdums	113 x 10 ⁻⁶
Mazgāšanas buferis AW2	0,417

Katrai traucējošajai vielai ar Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi tika testēti astoņi tehniskie replikāti, kas bagātināti ar dažādu vēžu bagātināšanas paneli (1,94 Mb) vienas kārtas bagātināšanā un pēc tam sekvecēti NextSeq 550Dx instrumentā ar DNA GenerateFASTQ Dx moduli.

Abām testētajām vielām visi astoņi paraugi atbilda parauga veikspējas prasībām, un netika novēroti traucējumi analīzes veikspējai.

Šķērspiesārņojums

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (sievīšķie, 10 paraugi), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (vīrišķie, 12 paraugi) un kontroles bez veidnes (NTC, 2 paraugi) tika testētas Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzē šaha galdiņa plāksnes izkārtojumā. Visos paraugos kā visstingrākais šķērspiesārņojuma novērtēšanas nosacījums tika izmantots visaugstākā ieteiktā gDNS ievade (1000 ng). Testēšanu divreiz veica divi atsevišķi operatori. Eksoma panelis 1 (45 Mb) tika izmantots 12-kārtīgās bagātināšanas reakcijās. Bagātinātās bibliotēkas tika sekvecētas ar NextSeq 550Dx, izmantojot DNA GenerateFASTQ Dx. Novērtējums tika veikts, novērtējot vīrieša specifiskās Y hromosomas klātbūtni sieviešu paraugos, salīdzinot ar pilnas plāksnes sieviešu paraugu fona līmeni, kā arī NTC paraugu rādījuma reprezentāciju.

Tabula 10 Šķērspiesārņojuma rezultāti

Sievišķie paraugi ar vīrišķo Y hromosomu klātbūtni < 3x bāzlinijas traucējumi	Rādītāju reprezentācija NTC
100 %	< 0,0005 %

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lietojumprogramma veikspēja

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lietojumprogrammas NovaSeq 6000Dx veikspējas rādītāji ir norādīti *NovaSeq 6000Dx instrumenta lietošanas pamācībā (dokuments Nr. 200025276)*.

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lietojumprogramma NextSeq 550Dx nodrošina tādas pašas sekundārās analīzes darbplūsmas kā lietojumprogramma NovaSeq 6000Dx, tostarp trīs tālāk norādītās darbplūsmas. FASTQ ģenerēšanu, FASTQ un VCF ģenerēšanu dzimumšūnas līniju variantu noteikšanai un FASTQ un VCF ģenerēšanu somatisko variantu noteikšanai.

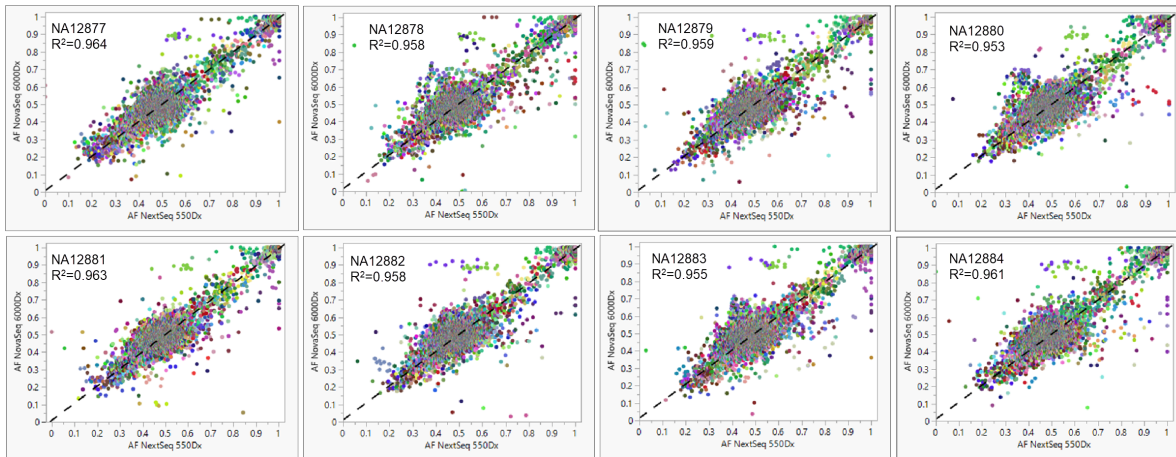
Salīdzināmā sekundārās analīzes veikspēja tika iegūta, izmantojot to pašu bibliotēku maisījumu, kas tika sekvencēta abās platformās. Varianta noteikšanas biežums ([Tabula 11](#)) un biežuma sakrāšana ([Attēls 1](#)) Coriell Cell Line gDNS paraugiem tika novērtēta, izmantojot reprezentatīvu analīzi, kas izstrādāta, lai pārbaudītu gēnu variācijas, kas aptver 1 970 505 bāzes (9232 mērķi) visās 23 cilvēka hromosomās. Tika pārbaudīti astoņi platīna genoma DNS paraugi, septiņi (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) replicēti sešas reizes un viens (NA12881) replicēts piecas reizes (skatiet [Attēls 1](#)). Bibliotēkas tika sekvencētas ar trīs izpildēm katra ar NovaSeq 6000Dx un NextSeq 550Dx instrumentiem un variantu noteikšana tika veikta, izmantojot DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lietojumprogrammas dzimumšūnas līniju variantu noteikšanas analīzes darbplūsmu.

Pamatojoties uz spēcīgu korelāciju starp lietojumprogrammas veikspēju NovaSeq 6000Dx un NextSeq 550Dx instrumentos, veikspējas rādītāji, kas saistīti ar sekundāro analīzi, kas sniegta *NovaSeq 6000Dx instrumenta lietošanas pamācībā (dokuments Nr. 200025276)*, tiek noteikti kā piemērojami arī DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lietojumprogrammā NextSeq 550Dx.

Tabula 11 Lietojumprogrammas veikspēja – variantu noteikšanas biežums SNV, ievietošanas un dzēšanas

Panelis	Variantu noteikšanas rādītājs NovaSeq 6000Dx	Variantu noteikšanas rādītājs NextSeq 550Dx
Pan-genoma panelis (1,97 Mb, 9232 mērķi, 23 hromosomas)	99,9 %	99,9 %

Attēls 1 Variantu biežuma salīdzinājums NovaSeq 6000Dx un NextSeq 550Dx izpildēm ar DRAGEN for IDPE Dx lietojumprogrammas analīzi



Pielikums: Illumina UD rādītāju adaptera sekvences.

Šie unikālie divkārtšie (UD) rādītāju adapteri ir izvietoti plāksnē, lai ieviestu ieteikto savienošanas pāri stratēģiju. Rādītāju adapteru garums ir 10 bāzes, nevis parastās astoņas bāzes.

Rādītāja 1 (i7) adapteri

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Rādītāja 2 (i5) adapteri

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Tālāk norādītā secība tiek izmantota 1. lasīšanai un 2. lasīšanas adaptera apgriešanai.

CTGTCTCTTATACACATCT

Plāksnes A/Komplekta 1 rādītāja adapteri

Rādītāja nosaukums	i7 bāzes adapteri	i5 bāzes adapteri
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT

Rādītāja nosaukums	i7 bāzes adapterī	i5 bāzes adapterī
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA

Rādītāja nosaukums	i7 bāzes adapterī	i5 bāzes adapterī
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
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	ACAGTTCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA

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

Plāksnes B/Komplekta 2 rādītāja adapteri

Rādītāja nosaukums	i7 bāzes adapterī	i5 bāzes adapterī
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	CGTGTGAGA	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	GGCCTGTCCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Rādītāja nosaukums	i7 bāzes adapterī	i5 bāzes adapterī
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
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	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA

Rādītāja nosaukums	i7 bāzes adapterī	i5 bāzes adapterī
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	TGTTTCGATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC

Rādītāja nosaukums	i7 bāzes adapterī	i5 bāzes adapterī
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Pārskatījumu vēsture

Dokuments	Datums	Izmaiņu apraksts
Dokuments Nr. 200038118 v00	2023. gada jūlijs	<p>Sākotnējais laidieni.</p> <p>Iepriekšējais dokuments Nr. 200019584 ir aizstāts ar šo dokumentu.</p> <p>Izmaiņas no dokumenta Nr. 200019584 v2 šajā jaunajā dokumentā:</p> <ul style="list-style-type: none"> Pievienots saturs, lai atbalstītu sekvenčēšanu NextSeq 550Dx instrumentā, izmantojot DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lietojumprogrammu instrumentam NextSeq 550Dx. Precizēts nenodrošināto reaģentu saraksts. Sadaļā Brīdinājumi un piesardzības pasākumi pievienota informācija par ziņošanu par negadījumiem. Skaidrots sagaidāmais bagātināšanas bibliotēkās. Pievienota norāde 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 sagatavošanai. Noņemta Sekvenčēšanas sagatavošanas darbības tipogrāfiskā kļūda. <p>Izmaiņas, kuras iepriekš veiktas dokumentā Nr. 200019584:</p> <ul style="list-style-type: none"> Pievienots saturs, lai atbalstītu sekvenčēšanu NovaSeq 6000Dx instrumentā. Pievienoti sekvenčēšanas sistēmu nosaukumi un kataloga numuri. Noņemta unikālās duālās indeksēšanas informācija vienreiz indeksētām bibliotēkām.

Patenti un preču zīmes

Īpašumtiesības uz šo dokumentu un tā saturu pieder uzņēmumam Illumina, Inc. un tā saistītajiem uzņēmumiem ("Illumina"), un klients to drīkst izmantot tikai līgumā noteiktajā veidā saistībā ar šajā dokumentā aprakstīto izstrādājumu lietošanu, un nekādiem citiem nolūkiem. Šo dokumentu un tā saturu nedrīkst izmantot vai izplatīt nekādiem citiem nolūkiem un/vai citādi publiskot, atklāt vai reproducēt jebkādā veidā bez iepriekšējas rakstiskas Illumina piekrišanas. Ar šo dokumentu Illumina nenodod nekādas licences, ko paredz tā patents, preču zīmes, autortiesības vai anglosakšu tiesības, nedz arī līdzīgas jebkuras trešās personas tiesības.

Šajā dokumentā sniegtie norādījumi ir stingri un precīzi jāievēro kvalificētiem un atbilstoši apmācītiem darbiniekiem, lai nodrošinātu šeit aprakstītā(-o) produkta(-u) pareizu un drošu lietošanu. Pirms šī izstrādājuma(-u) lietošanas ir pilnībā jāizlasa un jāizprot viss šī dokumenta saturs.

PILNĪBĀ NEIZLASOT UN PRECĪZI NEIEVĒROJOT VISUS ŠAJĀ DOKUMENTĀ IEKĻAUTOS NORĀDĪJUMUS, VAR RASTIES PRODUKTA(-U) BOJĀJUMI, PERSONU MIESAS BOJĀJUMI, TOSTARP LIETOTĀJU UN CITU PERSONU, UN CITA ĪPAŠUMA BOJĀJUMI, TURKLĀT TIKS ANULĒTAS VISAS PRODUKTAM(-IEM) PIEMĒROJAMĀS GARANTIJAS.

ILLUMINA NEUZŅEMAS NEKĀDU ATBILDĪBU, KAS IZRIET NO NEPAREIZAS ŠAJĀ DOKUMENTĀ APRAKSTĪTO PRODUKTU (TOSTARP TĀ DAĻU VAI PROGRAMMATŪRAS) LIETOŠANAS.

© 2023 Illumina, Inc. Visas tiesības aizsargātas.

Visas preču zīmes ir Illumina, Inc. vai to attiecīgo īpašnieku īpašums. Konkrēta informācija par preču zīmēm pieejama vietnē www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformācija



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122, ASV
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (ārpus Ziemeļamerikas)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Sponsors Austrālijā

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

Produktu marķēšana

Pilnīgu atsauci uz simboliem, kas parādās uz produkta iepakojuma un marķējuma, savam komplektam skatiet simbolu atslēgā vietnes support.illumina.com cilnē *Dokumentācija*.