

NAUDOTI 'IN VITRO' DIAGNOSTIKAI  
TIK EKSPORTUI

## Numatytoji paskirtis

„Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ yra reagentų ir eksploatacinių medžiagų rinkinys, naudojamas mėginių bibliotekoms iš genominės DNR, gautos iš žmogaus ląstelių ir audinių, ruošti. Ruošiant bibliotekas, skirtas konkrečioms dominantiems genomų regionams, reikalingi naudotojų tiekiami zondų skydeliai. Sugeneruotos mėginių bibliotekos skirtos naudoti „Illumina“ sekos nustatymo sistemose.

## Procedūros principai

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ skirtas naudoti ruošiant DNR sekos nustatymo bibliotekas, gausintas tiksliniais regionais iš genomo DNR, gautos iš žmogaus ląstelių ir audinių.

Tiksliniam gausinimui atlikti reikalingi naudotojo tiekiami biotinilinti oligonukleotidų skydeliai. „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ suderinamas su įvairiais skydelių dydžiais, kurie apima dydžius nuo smulkių skydelių (< 20,000 zondų) iki didelių skydelių (> 200,000 zondų). Sugeneruotos gausintos bibliotekos skirtos sekai nustatyti „Illumina“ sekos nustatymo sistemose.

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ procedūrą sudaro toliau nurodyti veiksmai.

- **Genomo DNR tagmentacija** – DNR įvesčiai tagmentuoti naudojamos smulkios gausinimo BLT (eBLTS). Per tagmentaciją gDNR atskiru veiksmu yra fragmentuojama ir pažymima adapteriais. eBLTS sudrėkinti tagmentacijos reakcijoje reikalinga minimali 50 ng DNR įvestis. Sudrėkinus, eBLTS fragmentuoja nustatytą skaičių DNR molekulių, kad sugeneruotų normalizuotas nuoseklaus fragmentų dydžio pasiskirstymo bibliotekas.
- **Valymas po tagmentacijos** – išvaloma adapteriu žymėta DNR ant eBLTS, kad ją būtų galima naudoti amplifikuojant.
- **Tagmentuotos DNR amplifikavimas** – amplifikuojama tagmentuota DNR naudojant apriboto ciklo PGR programą. Prie DNR fragmentų pabaigos pridedami unikalūs dvigubi (UD) indeksai, leidžiantys žymėti DNR bibliotekas unikaliais dvigubais brūkšniniais kodais ir generuoti sancaupą atliekant sekos nustatymo procedūrą.
- **Bibliotekų valymas** – taikant granuliu gryninimo procedūrą išgryninamos amplifikuotos DNR bibliotekos ir pasirenkami jų dydžiai.
- **Bibliotekų telkimas** – DNR bibliotekos sujungiamos su unikaliais indeksais į vieną telkinį, kurį sudaro iki 12 bibliotekų. Bibliotekas telkti galite pagal tūrį arba masę.
- **Zondų hibridizacija** – šį veiksmą sudaro hibridizacijos reakcija, per kurią denatūruojamos dviejų gijų DNR bibliotekos ir biotinilintų DNR zondų skydelis hibridizuojamas iki tikslinių genomo regionų.

- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ suderinamas su keliais skydeliais. „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ neapima gausinimo skydelio. Zondų skydelius tiekia naudotojas ir jie turi atitikti reikalingas specifikacijas. „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ reagentai yra suderinami tiek su „Illumina“, tiek su trečiųjų šalių gausinimo DNR oligonukleotidų skydeliais, atitinkančiais reikalingas specifikacijas. Informacijos apie reikalingas trečiųjų šalių skydelių specifikacijas žr. skyriuje [Gausinimo zondo skydelio reikalavimai 11 psl.](#)
- **Hibridizuotų zondų fiksavimas** – naudojant streptavidino magnetines granules (SMB3), užfiksuojami biotilinti zondai, hibridizuoti iki tikslinių dominančių regionų.
- **Gausintų bibliotekų amplifikavimas** – naudojant PGR, amplifikuojamos gausintos bibliotekos.
- **Amplifikuotų gausintų bibliotekų valymas** – taikant granuliu gryninimo procedūrą, išgryninamos gausintos bibliotekos, kad jos būtų paruoštos sekos nustatymui atlikti.
- **Sekos nustatymas** – gausintų bibliotekų sekos nustatymas atliekamas „MiSeqDx“, „NextSeq 550Dx“ arba „NovaSeq 6000Dx“ sekos nustatymo sistemose. Naudojant „MiSeqDx“ ir „NextSeq 550Dx“, integruotas „DNA GenerateFASTQ Dx“ „Local Run Manager“ modulis naudojamas sekos nustatymo vykdymui nustatyti, stebėjimui vykdyti ir pagrindinei analizei atlikti (FASTQ generavimas iš bazių priskyrimų). Naudojant „NovaSeq 6000Dx“, „DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ programa naudojama sąrankai vykdyti ir antrinei analizei su keliomis pasiekiamomis darbo eigomis atlikti.

## Procedūros apribojimai

- Naudoti tik *in vitro* diagnostikai.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ suderinamas su genomo DNR, gauta iš žmogaus ląstelių ir audinių.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ suderinamas su dviejų gijų gDNR 50–1 000 ng įvestimis. Jei įvestys nepatenka į šias ribines vertes, veiksmingumas negarantuojamas.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ neapima DNR išskyrimo reagentų. Analitinio tyrimo rezultatai, įskaitant trukdžių tyrimą, pateikti dalyje [Veikimo charakteristikos 58 psl.](#), gauti ištyrus visos sudėties kraują ir FFPE, kurie buvo naudojami kaip pavyzdiniai mėginių tipai su pavyzdiniais DNR išskyrimo rinkiniais. Visi diagnostiniai tyrimai, sukurti naudoti su „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ reagentais, turi būti visiškai patvirtinti visais veiksmingumo aspektais naudojant pasirinktą DNR išskyrimo rinkinį.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ nerekomenduojama naudoti su prastos kokybės FFPE mėginiais, kurių  $\Delta Cq > 5$ . Naudojant mėginius, kurių  $\Delta Cq > 5$ , gali padidėti bibliotekos paruošimo nesėkmės tikimybė ir sumažėti tyrimo veiksmingumas.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ reagentai buvo sukonfigūruoti ir ištirti pagal toliau pateiktoje lentelėje nurodytą mėginio įvestį, gausinimo reakcijas ir pasiškumą.

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“	Mėginių įvestis	Gausinimo reakcijos	Gausinimo pusiškumas
16 mėginių rinkinys	Prasta kokybė (FFPE)	16 reakcijų	1-pusis
96 mėginių rinkinys	Aukšta kokybė (pvz., visos sudėties kraujas)	8 reakcijos	12-pusis

- Buvo ištirtas FFPE įvesties apdorojimas, kuris rekomenduojamas išskirtinai 1-pusio gausinimo reakcijoms naudojant 16 mėginių rinkinį.
- Naudojant 96 mėginių rinkinį, galimas nestandartinis pusiškumas (nuo 2-pusio iki 11-pusio), tačiau tokiu atveju taikomi toliau nurodyti apribojimai.
  - Apdorojant mėginius per nuo 2-pusio iki 11-pusio gausinimo reakcijas, sumažėja rinkinio pralaidumas.
  - Optimalūs rezultatai negarantuojami. Norint gauti tinkamą nestandartinio pusiškumo gausinimo kiekį, gali reikėti papildomo optimizavimo.
  - Taikant mažo pusiškumo telkimo strategijas (nuo 2-pusio iki 8-pusio), reikia pasirinkti indekso adapterius su įvairiomis sekomis, kad būtų optimizuotas spalvos balansas sėkmingam sekos nustatymui ir duomenų analizei užtikrinti. „DNA GenerateFASTQ Dx“ modulis, esantis „MiSeqDx“ ir „NextSeq 550Dx“, suteikia galimybių nustatant seriją pasirinkti subalansuotų spalvų indeksų derinius. Daugiau informacijos apie telkimo strategijas žr. skyriuje [Telkimo metodai 33 psl.](#)
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ yra apribotas tik tų gausintų bibliotekų tiekimu, kurių sekos nustatytos naudojant „MiSeqDx“, „NextSeq 550Dx“ ir „NovaSeq 6000Dx“. Naudojant kitas sekos nustatymo sistemas, reikalingas visapusiškas visų veiksmingumo aspektų patvirtinimas.
- Gausinimo skydeliai neįtraukti kaip šio gaminio dalis. Analitinio tyrimo rezultatai, pateikti dalyje [Veikimo charakteristikos 58 psl.](#), buvo gauti naudojant pavyzdinius gausinimo skydelius ir yra pateikiami tik informaciniais tikslais. Analitinės veikimo charakteristikos iliustruoja bendrąsias tyrimo galimybes ir neapibrėžia tyrimo galimybių ar tinkamumo, remiantis konkrečiais teiginiais. Reikia patikrinti visus visų su šiais reagentais naudoti sukurtų diagnostinių tyrimų veiksmingumo aspektus.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ suderinamas ir su „Illumina“, ir su trečiųjų šalių gausinimo skydeliais. Tačiau veiksmingumas naudojant trečiųjų šalių gausinimo skydelius, neatitinkančius skydelių reikalavimų, negarantuojamas. Informacijos apie skydelių reikalavimus žr. skyriuje [Gausinimo zondo skydelio reikalavimai 11 psl.](#)
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ hibridizacijos trukmė yra 2 valandos. Ilgesnės hibridizacijos trukmės taikymas gali turėti poveikį veiksmingumo metrikai.
- „DNA GenerateFASTQ Dx“ „Local Run Manager“ moduliai, skirti „MiSeqDx“ ir „NextSeq 550Dx“, tiekia tik FASTQ failus. Jei naudojate šiuos modulius, turite atlikti antrinės analizės patvirtinimą.

- „DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ programa pasiekama naudojant „NovaSeq 6000Dx“. Programa palaiko kelias antrinės analizės darbo eigas, įskaitant FASTQ generavimą, FASTQ ir VCF generavimą genocitų linijos variantui aptikti bei FASTQ ir VCF generavimą somatiniam variantui aptikti. Jei naudojate VCF generavimo programą, jums nereikia atlikti antrinės analizės patvirtinimo.
- Informacijos apie „DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ programos apribojimus, kai ji naudojama su „NovaSeq 6000Dx“, žr. „NovaSeq 6000Dx“ prietaiso pakuotės lapelyje (dokumento Nr. 200025276).

## Gaminio komponentai

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ sudaro toliau nurodyti komponentai.

- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A“, katalogo Nr. 20051354 (16 mėginių) arba Nr. 20051352 (96 mėginiai)
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B“, katalogo Nr. 20051355 (16 mėginių) arba Nr. 20051353 (96 mėginiai)
- „Local Run Manager“ „DNA GenerateFASTQ Dx“ modulis, skirtas „NextSeq 550Dx“, katalogo Nr. 20063024
- „Local Run Manager“ „DNA GenerateFASTQ Dx“ modulis, skirtas „MiSeqDx“, katalogo Nr. 20063022
- „DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ programa, skirta „NovaSeq 6000Dx“, katalogo Nr. 20074609

## Pateikti reagentai

Norint užbaigti „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimą, reikalingas „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A“ arba „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B“. Naudojami 16 mėginių arba 96 mėginių rinkinys, galite atlikti toliau nurodytą bibliotekos paruošimo ir gausinimo reakcijų kiekį.

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“	Mėginio įvestis	Gausinimo reakcijos	Gausinimo pusiškumas
16 mėginių rinkinys	Prasta kokybė (FFPE)	16 reakcijų	1-pusis
96 mėginių rinkinys	Aukšta kokybė (pvz., visos sudėties kraujas)	8 reakcijos	12-pusis

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

### „Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1“, laikyti nuo 15 °C iki 30 °C temperatūroje

Toliau nurodyti reagentai siunčiami kambario temperatūros. Nedelsdami perkelkite reagentus į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad užtikrintumėte tinkamą veikimą.

Reagento pavadinimas	Kiekis mėgintuvėlyje		Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
	16 mėginių (Nr. 20050020)	96 mėginiai (Nr. 20050025)			
„Stop Tagment Buffer 2“ (2 tagmentacijos sustabdymo buferinis tirpalas) (ST2)	1	4	Raudona	350 µl	Ploviklio tirpalas vandenyje.
„Tagment Wash Buffer 2“ (2 tagmentacijos plovimo buferinis tirpalas) (TWB2)	1	1	Žalia	41 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra ploviklio ir druskų.
„Cleanup Beads“ (valymo granulės) (CB)	1	Netaikoma*	Raudona	10 ml	Kietafazės paramagnetinės granulės buferiniame vandeniniame tirpale.

\* 96 mėginių valymo granulės įtrauktos į „Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples“ rinkinį (Nr. 20050030).

### „Illumina Prep Dx“ valymo granulės (96 mėginiai), laikyti nuo 15 °C iki 30 °C temperatūroje

Naudojant 96 mėginių rinkinius, valymo granulės yra įtrauktos į „Illumina Prep Dx Cleanup Beads“ (katalogo Nr. 20050030). Toliau nurodytas reagentas siunčiamas kambario temperatūros. Nedelsdami perkelkite reagentus į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad užtikrintumėte tinkamą veikimą. Naudojant 16 mėginių rinkinius, valymo granulės yra įtrauktos į „Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1“ (katalogo Nr. 20050020).

Reagento pavadinimas	Kiekis	Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
„Cleanup Beads“ (valymo granulės) (CB)	4	Raudona	10 ml	Kietafazės paramagnetinės granulės buferiniame vandeniniame tirpale.

### „Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2“, laikyti nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje

Toliau nurodyti reagentai siunčiami šaldytuve. Nedelsdami perkelkite reagentus į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad užtikrintumėte tinkamą veikimą. eBLTS atsargų mėgintuvėlių laikykite vertikaliai, kad granulės visada būtų pamerktos buferiniame tirpale.

Reagento pavadinimas	Kiekis mėgintuvėlyje		Dangtelio spalva	Užpildymo tūris		Veikliosios medžiagos
	16 mėginių (Nr. 20050021)	96 mėginiai (Nr. 20050026)		16 mėginių	96 mėginiai	
„Enrichment BLT Small“ (smulkios gausinimo BLT) (eBLTS)	1	4	Geltona	200 µl	290 µl	Streptavidino magnetinės granulės, sujungtos su transposomomis buferiniame vandeniniame tirpale, kuriame yra glicerolio, EDTA, ditiotreitolio, druskų ir ploviklio.
„Resuspension Buffer“ (resuspensijos buferinis tirpalas) (RSB)	1	4	Skaidri	1,8 ml	1,8 ml	Buferinis vandeninis tirpalas.

## „Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3“, laikyti nuo –25 °C iki –15 °C temperatūroje

Toliau nurodyti reagentai siunčiami užšaldyti. Nedelsdami perkelkite reagentus į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad užtikrintumėte tinkamą veikimą.

Reagento pavadinimas	Kiekis mėgintuvėlyje		Dangtelio spalva	Užpildymo tūris		Veikliosios medžiagos
	16 mėginių (Nr. 20050022)	96 mėginiai (Nr. 20050027)		16 mėginių	96 mėginiai	
„Tagmentation Buffer 1“ (1 tagmentacijos buferinis tirpalas) (TB1)	1	4	Skaidri	290 µl	290 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra magnio druskų ir dimetilformamido.
„Enhanced PCR Mix“ (sustiprintas PGR mišinys) (EPM)	2	4	Skaidri	200 µl	610 µl	DNR polimerazė ir dNTP buferiniame vandeniame tirpale.

## „Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1“ (16 mėginių), laikyti nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje

Naudojant 16 mėginių rinkinius, toliau nurodyti reagentai yra įtraukti į „Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1“ (katalogo Nr. 20050023). Naudojant 96 mėginių rinkinius, reagentai yra įtraukti į „Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1“ (katalogo Nr. 20050028).

Toliau nurodyti reagentai siunčiami šaldytuve. Nedelsdami perkelkite reagentus į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad užtikrintumėte tinkamą veikimą.

Reagento pavadinimas	Kiekis mėgintuvėlyje	Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
„Streptavidin Magnetic Beads“ (streptavidino magnetinės granulės) (SMB3)	4	Skaidri	1,2 ml	Streptavidino magnetinės granulės buferiniame vandeniame tirpale, kuriame yra formamido, ploviklio ir druskų.

Reagento pavadinimas	Kiekis mėgintuvėlyje	Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
„Resuspension Buffer“ (resuspensijos buferinis tirpalas) (RSB)	1	Skaidri	1,8 ml	Buferinis vandeninis tirpalas.
„Enrichment Hyb Buffer 2“ (2 gausinimo hibridizavimo buferinis tirpalas) (EHB2)	1	Skaidri	200 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra ploviklio ir druskų.
„Elute Target Buffer 2“ (2 eliuavimo tikslinis buferinis tirpalas) (ET2)	1	Skaidri	200 µl	Buferinis vandeninis tirpalas.

### „Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1“ (96 mėginiai), laikyti nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje

Naudojant 96 mėginių rinkinius, toliau nurodyti reagentai yra įtraukti į „Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1“ (katalogo Nr. 20050028). Naudojant 16 mėginių rinkinius, reagentai yra įtraukti į „IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1“ (katalogo Nr. 20050023).

Toliau nurodyti reagentai siunčiami šaldytuve. Nedelsdami perkeltkite reagentus į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad užtikrintumėte tinkamą veikimą.

Reagento pavadinimas	Kiekis mėgintuvėlyje	Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
„Streptavidin Magnetic Beads“ (streptavidino magnetinės granulės) (SMB3)	2	Skaidri	1,2 ml	Streptavidino magnetinės granulės buferiniame vandeniame tirpale, kuriame yra formamido, ploviklio ir druskų.
„Resuspension Buffer“ (resuspensijos buferinis tirpalas) (RSB)	4	Skaidri	1,8 ml	Buferinis vandeninis tirpalas.
„Enrichment Hyb Buffer 2“ (2 gausinimo hibridizavimo buferinis tirpalas) (EHB2)	1	Skaidri	200 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra ploviklio ir druskų.
„Elute Target Buffer 2“ (2 eliuavimo tikslinis buferinis tirpalas) (ET2)	1	Skaidri	200 µl	Buferinis vandeninis tirpalas.



**„Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2“, laikyti nuo –25 °C iki –15 °C temperatūroje**

Toliau nurodyti reagentai siunčiami užšaldyti. Nedelsdami perkelkite reagentus į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad užtikrintumėte tinkamą veikimą.

Reagento pavadinimas	Kiekis mėgintuvėlyje		Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
	16 mėginių (Nr. 20050024)	96 mėginiai (Nr. 20050029)			
„Enrichment Elution Buffer 1“ (1 gausinimo eliuavimo buferinis tirpalas) (EE1)	1	1	Skaidri	580 µl	Ploviklio tirpalas vandenyje.
„Enhanced Enrichment Wash Buffer“ (sustiprintas gausinimo plovimo buferinis tirpalas) (EEW)	4	4	Gelsva	4,1 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų ir ploviklio.
„PCR Primer Cocktail“ (PGR pradinis mišinys) (PPC)	1	1	Skaidri	320 µl	PGR pradmenų (oligonukleotidų) mišinys.
2N NaOH (HP3)	1	1	Skaidri	200 µl	2N natrio hidroksido (NaOH) tirpalas.
„HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers“ (2 hibridizacijos buferinis tirpalas + IDT NXT blokatoriai) (NHB2)	2	1	Mėlyna	480 µl	Buferinis vandeninis tirpalas su Cot-1 DNR, išstūmimo medžiaga ir formamidu.
„Enhanced PCR Mix“ (sustiprintas PGR mišinys) (EPM)	2	1	Skaidri	200 µl	DNR polimerazė ir dNTP buferiniame vandeniame tirpale.

## „Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B“, laikyti nuo –25 °C iki –15 °C temperatūroje

Toliau nurodyti reagentai siunčiami užšaldyti. Nedelsdami perkelkite reagentus į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad užtikrintumėte tinkamą veikimą. Informacijos apie indekso adapterio sekas žr. [Priedas: „Illumina“ UD indekso adapterio sekos 62 psl.](#)

Komponentas	Kiekis
„Illumina Unique Dual Index Dx Set A“ (96 indeksai), Nr. 20050038	1
„Illumina Unique Dual Index Dx Set B“ (96 indeksai), Nr. 20050039	1

## Reagentai (nepateikti)

### Reikalingi reagentai (nepateikti)

- DNR išskyrimo ir gryninimo reagentai
- DNR kiekybinio nustatymo reagentai
- Etanolis (200 stiprumo vienetų, pritaikytas molekulinės biologijos reikmėms)
- Vanduo be nukleazės
- 1M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- 1N NaOH tirpalas, pritaikytas molekulinės biologijos reikmėms
- Jei naudojama „NextSeq 550Dx“ sekos nustatymo sistema:
  - „NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles)“ (katalogo Nr. 20028871)
- Jei naudojama „MiSeqDx“ sekos nustatymo sistema:
  - „MiSeqDx Reagent Kit v3“ (katalogo Nr. 20037124)
- Jei naudojama „NovaSeq 6000Dx“ sekos nustatymo sistema:
  - „NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles)“ (katalogo Nr. 20046931)
  - „NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles)“ (katalogo Nr. 20046933)
  - „NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge“ (katalogo Nr. 20062292)
  - „NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge“ (katalogo Nr. 20062293)
  - „NovaSeq 6000Dx Library Tube“ (katalogo Nr. 20062290)
  - „NovaSeq 6000Dx Library Tube“, 24 vnt. pakuotėje (katalogo Nr. 20062291)

## Gausinimo zondo skydelio reikalavimai

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ reagentai suderinami tiek su „Illumina“, tiek su trečiųjų šalių gausinimo DNR oligonukleotidų skydeliais. Jei naudojate trečiosios šalies biotinilintus DNR zondus (nekintamus arba pasirinktinius skydelius), įsitikinkite, kad jie atitinka reikalingas specifikacijas.

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ optimizuotas ir patvirtintas naudojant toliau nurodytas trečiųjų šalių skydelių specifikacijas. Naudojant specifikacijų neatitinkančius trečiųjų šalių skydelius, panašus veikimas negarantuojamas.

- 80 bp arba 120 bp zondo ilgis
- Nuo 500 iki 675 000 zondų
- Vienos arba dviejų gijų DNR
- Bendroji zondo įvestis  $\geq 3$  pmol, kai gausinimo pusiškumas yra nuo 1-pusio iki 12-pusio

## Laikymas ir naudojimas

- Kambario temperatūra apibrėžiama kaip 15–30 °C temperatūra.
- Reagentai išlieka stabilūs, jei jie laikomi nurodytomis sąlygomis, iki ant rinkinių etikečių nurodytos galiojimo pabaigos datos. Informacijos apie laikymo temperatūrą žr. skyriuje [Pateikti reagentai 4 psl.](#)
- Užšaldyti reagentai išlieka stabilūs daugiausia keturis užšaldymo–atšildymo ciklus iki nurodytos galiojimo pabaigos datos.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ procedūra apima toliau nurodytus saugaus sustojimo taškus.
  - Atlikus veiksmą [Tagmentuotos DNR amplifikavimas 29 psl.](#), amplifikuotos bibliotekos išlieka stabilios ne ilgiau nei 30 dienų, jas laikant nuo –25 °C iki –15 °C temperatūroje.
  - Atlikus veiksmą [Bibliotekų valymas 31 psl.](#), išvalytos amplifikuotos bibliotekos išlieka stabilios ne ilgiau nei 30 dienų, jas laikant nuo –25 °C iki –15 °C temperatūroje.
  - Atlikus veiksmą [Iš anksto gausintų bibliotekų telkimas 33 psl.](#), sutelktos bibliotekos išlieka stabilios ne ilgiau nei 30 dienų, jas laikant nuo –25 °C iki –15 °C temperatūroje.
  - Atlikus veiksmą [Gausintos bibliotekos amplifikavimas 45 psl.](#), gausintų, amplifikuotų bibliotekų plokštelė gali likti termocikleryje ne ilgiau nei 24 valandas. Arba plokštelę galima laikyti nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje ne ilgiau nei 48 valandas.
  - Galutinai išvalytos gausintos bibliotekos išlieka stabilios ne ilgiau nei 7 dienas, jas laikant nuo –25 °C iki –15 °C temperatūroje.
- Jei „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ pakuotė ar turinys yra pažeisti ar sugadinti, kreipkitės į „Illumina“ klientų aptarnavimo skyrių.
- 2 tagmentacijos sustabdymo buferinis tirpalas (ST2) gali suformuoti matomų nuosėdų arba kristalų. Jei pastebite nuosėdų, šildykite 37 °C temperatūroje 10 minučių ir tada išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, kol nuosėdos ištirps.

- Hibridizacijos oligonukleotidus (HYB) ir sustiprintą gausinimo plovimo buferinį tirpalą (EEW) reikia pašildyti iki tokios pat temperatūros, kaip ir hibridizacijos laikymo temperatūra, taikoma mėginio tipui ir zondo skydeliui. Daugiau informacijos apie NHB2 ir EEW naudojimą ieškokite skyriuje [Procedūros pastabos 16 psl.](#)
- 2 gausinimo hibridizacijos buferinis tirpalas (EHB2) ir hibridizacijos buferinis tirpalas +IDT NXT blokatoriai (NHB2) gali suformuoti kristalų ir drumzlių. Pastebėję kristalų ir drumzlių, išmaišykite sūkuriniu maišytuvu arba pipetuodami aukštyn ir žemyn sumaišykite, kol tirpalas taps skaidrus. Prieš pipetavimą būtinai pašildykite NHB2.
- Naudodami valymo granules (CB), taikykite toliau nurodytas gerąsias praktikas.
  - Niekada neužšaldykite granulių.
  - Prieš naudodami išmaišykite granules sūkuriniu maišytuvu, kol jos bus resuspenduotos ir bus gauta vienalytė spalva.
- Naudodami smulkias gausinimo BLT (eBLTS), taikykite toliau nurodytas gerąsias praktikas.
  - eBLTS mėgintuvėlį laikykite vertikaliai, kad granulės visada būtų pamerktos buferiniame tirpale.
  - Kruopščiai išmaišykite eBLTS sūkuriniu maišytuvu, kol granulės bus resuspenduotos. Kad nepakistų granulių vieta, nerekomenduojama centrifuguoti prieš pipetavimą.
  - Jei granulės prilipo prie 96 šulinėlių plokštelės šono ar viršaus, 3 sekundes centrifuguokite 280 × g ir tada pipetuokite, kad resuspenduotumėte.
- Naudodami indekso adapterių plokšteles, taikykite toliau nurodytas gerąsias praktikas.
  - Nedėkite mėginių į indekso adapterio plokštelę.
  - Kiekvienas indekso plokštelės šulinėlis yra skirtas naudoti tik vieną kartą.

## Reikalinga įranga ir medžiagos (nepateikta)

Prieš pradėdami vykdyti protokolą, įsitikinkite, kad be „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ turite kitą reikalingą įrangą ir medžiagas.

### Įranga

Prieš pradėdami vykdyti protokolą įsitikinkite, kad turite reikalingą įrangą.

Protokolas optimizuotas ir patvirtintas naudojant išvardytų specifikacijų elementus. Naudojant specifikacijų neatitinkančią įrangą, panašus veikimas negarantuojamas.

Kai kurie elementai reikalingi tik konkrečioms darbo eigoms vykdyti. Šie elementai nurodyti atskirose lentelėse.

- Toliau nurodytų specifikacijų termocikleris.
  - Šildomas dangtis
  - Minimalus temperatūros valdymo diapazonas: nuo 10 °C iki 98 °C
  - Minimalus temperatūros tikslumas: ±0,25 °C
  - Maksimalus reakcijos tūris: 100 µl

- Suderinamas su viso pločio 96 šulinėlių PGR plokštelėmis
- Toliau nurodytų specifikacijų mikromėginių inkubatorius.
  - Aplinkos temperatūros diapazonas: nuo +5,0 °C iki 99,0 °C
  - Suderinamas su 96 šulinėlių MIDI plokštelėmis
- Mikromėginių inkubatoriaus įdėklai, suderinami su 96 šulinėlių MIDI plokštelėmis
- Didelio greičio mikroplokštelių maišytuvas, kurio maišymo greičio intervalas yra 200–3 000 sūk./min.
- Magnetinis stovas, suderinamas su 96 šulinėlių PGR plokštelėmis
- Magnetinis stovas, suderinamas su 96 šulinėlių MIDI plokštelėmis
- Fluorometras, suderinamas su jūsų kiekybinio nustatymo metodu
- DNR fragmentų analizatorius
- Tikslios pipetės:
  - 10 µl vieno kanalo ir kelių kanalų pipetės
  - 20 µl vieno kanalo ir kelių kanalų pipetės
  - 200 µl vieno kanalo ir kelių kanalų pipetės
  - 1 000 µl vieno kanalo pipetės
  - Tikslios pipetės užtikrina tikslų reagentų ir mėginių tiekimą. Vieno kanalo arba kelių kanalų pipetės gali būti naudojamos, jei jos reguliariai kalibruojamos ir yra tikslios esant 5 % nurodyto tūrio.
- Mikroplokštelių centrifuga
- Mikrocentrifuga
- Viena iš toliau nurodytų „Illumina“ sekos nustatymo sistemų.
  - „MiSeqDx“ prietaisas, katalogo Nr. DX-410-1001
  - „NextSeq 550Dx“ prietaisas, katalogo Nr. 20005715
  - „NovaSeq 6000Dx“ prietaisas, katalogo Nr. 20068232
- [Pasirinktinai] Vakuomo koncentratorius
- [FFPE] PGR aptikimo realiuoju laiku sistema

## Medžiagos

Prieš pradėdami vykdyti protokolą įsitikinkite, kad turite reikalingas medžiagas.

Kai kurie elementai reikalingi tik konkrečioms darbo eigoms vykdyti. Šie elementai nurodyti atskirose lentelėse.

Protokolas optimizuotas ir patvirtintas naudojant išvardytus elementus. Naudojant alternatyvias medžiagas, panašus veikimas negarantuojamas.

- Pipetės antgaliai su filtrais
- Kūginiai centrifugavimo mėgintuvėliai, 15 ml arba 50 ml
- 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai

- Kelių kanalų reagentų rezervuarai be ribonukleazijų / deoksiribonukleazijų, vienkartiniai
- 8 mėgintuvėlių juostelės ir dangteliai be ribonukleazijų / deoksiribonukleazijų
- Serologinės pipetės
- 96 šulinėlių polipropileno gilių šulinėlių laikymo plokštelė, 0,8 ml (MIDI plokštelė)
- Kieto apvalkalo 96 šulinėlių viso pločio PGR plokštelės
- [FFPE] qPGR plokštelės suderinamos su qPGR prietaisu
- 96 šulinėlių plokštelių lipnieji sandarikliai, atitinkantys toliau nurodytas specifikacijas.
  - Nulupamas, optiškai skaidrus poliesteris
  - Tinka naudoti su viso pločio PGR plokštelėmis
  - Stiprūs klėjai, atlaikantys įvairius temperatūros pokyčius nuo –40 °C iki 110 °C
  - Be deoksiribonukleazijų / ribonukleazijų
- Plastikinės eksploatacinės medžiagos, suderinamos su pasirinktu kiekybinio nustatymo metodu
- Fluorometrinis dsDNR kiekybinio nustatymo rinkinys, suderinamas su pasirinkta kiekybinio nustatymo sistema.
  - Atliekant iš anksto gausintų amplifikuotų bibliotekų kiekybinį nustatymą, galima naudoti plataus diapazono kiekybinio nustatymo rinkinį.
  - Atliekant gausintų bibliotekų kiekybinį nustatymą, kiekybinio nustatymo rinkinio diapazonas priklauso nuo naudojamo zondo skydelio.
- Fragmentų analizės rinkinys bibliotekai kvalifikuoti su pasirinkta kvalifikavimo sistema.
  - Atliekant iš anksto gausintų amplifikuotų bibliotekų kvalifikavimą, galima naudoti plataus diapazono rinkinį.
  - Atliekant gausintų bibliotekų kvalifikavimą, kvalifikavimo rinkinio diapazonas priklauso nuo naudojamo zondo skydelio.
- [Pasirinktina] DNR išskyrimo iš žmogaus ląstelių ir audinių rinkinys. Galite naudoti bet kurį patvirtintą išskyrimo metodą.

## Mėginių surinkimas, transportavimas ir laikymas



### DĖMESIO

Su visais mėginiais elkitės taip, tarsi jie būtų potencialios infekcinės medžiagos.

- Šis tyrimas suderinamas su genomo DNR, gauta iš žmogaus ląstelių ir audinių.
- Jei naudojate komerciškai prieinamą išgrynintą gDNR, įsitikinkite, kad mėginiai buvo transportuojami tinkamomis sąlygomis ir laikomi pagal gamintojo instrukcijas. Laikykitės gerosios gDNR laikymo ir užšaldymo-atšildymo ciklų praktikos.

- Visos sudėties kraujo įvesties atveju laikykitės kraujo surinkimo, transportavimo ir laikymo reikalavimų, taikomų pasirinktam DNR išskyrimo metodui. Galima naudoti bet kurį patvirtintą išskyrimo metodą. Visos sudėties kraujo transportavimo procedūra turi atitikti šalies, federalinius, valstybinius ir vietinius reikalavimus, reglamentuojančius etiologinių medžiagų transportavimą.
- Išskiriant DNR iš FFPE audinio, galima naudoti bet kurį patvirtintą išskyrimo metodą. Nustatydami toliau nurodytas praktikas, laikykitės pasirinktam išskyrimo metodui taikomų instrukcijų ir rekomendacijų.
  - Audinių fiksavimo formalinu ir įliejimo į parafiną metodas siekiant užtikrinti geriausią išskirtos DNR kokybę.
  - FFPE mėginių laikymas.
  - Pradinės medžiagos reikalavimai, pvz., FFPE sekcijų skaičius ir storis. Taikant daugumą gryninimo metodų, rekomenduojama naudoti šviežiai išpjautas sekcijas.

## Įspėjimai ir atsargumo priemonės

- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ reagentuose yra potencialiai pavojingų cheminių medžiagų. Pavojus žmogui kyla įkvėpus, nurijus, patekus ant odos ir į akis. Dėvėkite tinkamai nuo pavojaus saugančias apsaugines priemones, įskaitant akių apsaugos priemones, pirštines ir laboratorinį chalata. Su panaudotais reagentais elkitės kaip su cheminėmis atliekomis ir utilizuokite laikydamiesi taikomų regiono, nacionalinių ir vietinių įstatymų bei teisės aktų. Su aplinkosauga, sveikatos apsauga ir saugumu susijusios papildomos informacijos ieškokite saugos duomenų lapuose (SDL) adresu [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- Su visais kraujo mėginiais dirbkite taip, tarytum būtų žinoma, kad jie yra užkrėsti žmogaus imunodeficito virusu (ŽIV), žmogaus hepatito B virusu (HBV) ir kitais krauju pernešamais patogenais (bendros atsargumo priemonės).
- Laikykitės įprastų laboratorinių atsargumo priemonių. Nesiurbkite pipetės burna. Darbo vietoje nevalgykite, negerkite ir nerūkykite. Dirbdami su mėginiais ir rinkinių reagentais, mūvėkite vienkartinės pirštines bei dėvėkite laboratorinius chalatus. Baigę dirbti su mėginiais ir rinkinių reagentais, kruopščiai nusiplaukite rankas.
- Kad nepakenktumėte mėginių ar reagentų kokybei, prieš pradėdami vykdyti protokolą įsitikinkite, kad visi natrio hipochlorito garai, susidarę valant, visiškai išsisklaidė.
- Mėginių užteršimas kitais PGR produktais / amplikonais gali lemti netikslius ir nepatikimus rezultatus. Kad išvengtumėte taršos, taikykite toliau aprašytas gerąsias praktikas.
  - Taikykite tinkamas laboratorijos praktikas ir laboratorijos higienos reikalavimus.
  - Darbo eigos veiksmus atlikite nurodytose vietose prieš amplifikavimą arba po amplifikavimo.
  - Prieš valydami bibliotekas, panaudotus reagentus laikykite vietoje prieš amplifikavimą.
  - Reagentus prieš amplifikavimą atskirkite nuo reagentų po amplifikavimo.
  - Įsitikinkite, kad vietose prieš amplifikavimą ir po amplifikavimo yra specialią įrangą, pvz., pipetės, pipečių antgaliai, sukurinis maišytuvas ir centrifuga.

- Stenkitės išvengti kryžminės taršos. Su kiekvienu mėginiu ir dozavimo reagentu naudokite naujus pipetės antgalius. Naudojant antgalius su filtrais, sumažinama amplikonų pernašos ir kryžminės mėginių taršos rizika.
  - Lašindami arba perkeldami mėginius arba reagentų pagrindinius mišinius, keiskite antgalius kiekvienam mėginiui.
  - Lašindami indekso adapterius su kelių kanalų pipete, keiskite antgalius kiekvienai eilutei arba kiekvienam stulpeliui. Jei naudojate vieno kanalo pipetę, antgalius keiskite kiekvienam mėginiui.
  - Pašalinkite nenaudotas indekso adapterio plokšteles iš darbo zonos.
- Atlikdami plovimo etanolio veiksmus, taikykite toliau aprašytas gerąsias praktikas.
  - Visada paruoškite šviežią 80 % etanolį. Etanolis gali absorbuoti vandenį iš oro, o tai gali turėti įtakos rezultatams.
  - Įsitikinkite, kad atliekant plovimo veiksmus iš šulinėlių dugno pašalinamas visas etanolis. Likęs etanolis gali turėti įtakos rezultatams.
  - Atlikdami veiksmus su magnetiniu stovu, laikykitės nurodytos džiovavimo trukmės, kad užtikrintumėte visišką išgaravimą. Likęs etanolis gali turėti įtakos vėlesnių reakcijų veiksmingumui.
- Pagrindinius mišinius visada paruoškite prieš naudojimą ir niekada nelaikykite sumaišytų darbinių tirpalų.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ veiksmingumas negarantuojamas, jei nesilaikoma pakuotės lapelyje nurodytų procedūrų.
- Nenaudokite jokių rinkinio komponentų, jei galiojimo laikas, nurodytas rinkinio etiketėje, pasibaigęs.
- Rinkinio komponentų nekeiskite komponentais iš kitų „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinių. Rinkiniai identifikuojami rinkinio etiketėje.

## Procedūros pastabos

### DNR įvesties rekomendacijos

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ protokolą suderinamas su aukštos kokybės, dviejų gijų genomo DNR (gDNR) 50–1 000 ng įvestimis.

Įsitikinkite, kad pradiniam gDNR mėginyje nėra > 1 mM EDTA ir organinių teršalų, pvz., fenolio ir etanolio. Šios medžiagos gali trukdyti tagmentacijos reakcijai ir tyrimas gali nepavykti.

#### gDNR įvestis ≥ 50 ng

Jei gDNR įvestis yra 50–1 000 ng, pradinio gDNR mėginio kiekybinis nustatymas ir normalizavimas nereikalingi.

#### gDNR įvestis < 50 ng

Galima naudoti 10–50 ng DNR įvestis atlikus toliau nurodytus koregavimus.



- Jei naudojama 10–49 ng gDNR įvestis, rekomenduojama atlikti kiekybinį pradinio gDNR mėginio nustatymą siekiant nustatyti PGR ciklą, reikalingų po tagmentacijos, skaičių. Naudodami fluorometrinį metodą, atlikite kiekybinį dviejų gijų gDNR įvesties nustatymą. Nenaudokite metodų, kuriais matuojama bendra nukleorūgštis, pvz., „NanoDrop“ ar kitų UV absorbcijos metodų.
- Šis protokolas nenormalizuoja galutinių iš anksto gausintos bibliotekos kiekių iš 10–49 ng gDNR, todėl prieš gausinimą ir po jo reikia atlikti bibliotekų kiekybinį nustatymą ir normalizavimą.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ charakterizuotas ir patvirtintas naudoti su 50–1 000 ng DNR įvestimis. gDNR įvestims esant < 50 ng, lygiavertis gaminio veiksmingumas negali būti garantuotas.

## Kraujo įvesties rekomendacijos

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ suderinamas su gDNR, išskirta iš periferinio visos sudėties kraujo. Galima naudoti bet kurį patvirtintą išskyrimo metodą. Išskiriant gDNR iš visos sudėties kraujo, pradinis kiekybinis DNR įvesties nustatymas nereikalingas ir „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ sudaro normalizuotus iš anksto gausintos bibliotekos kiekius.

Toliau nurodyti veiksniai gali neigiamai paveikti DNR, gautos iš viso kraujo mėginių, kiekį bei bibliotekos normalizavimą.

- Kraujo mėginio amžius
- Laikymo sąlygos
- Gretutinės sveikatos būklės, turinčios įtakos baltųjų kraujo kūnelių skaičiui

## FFPE audinio įvesties rekomendacijos

Naudodami toliau nurodytą FFPE DNR kokybės kriterijų, nustatykite atitinkamą įvestį bibliotekai sėkmingai paruošti.

- Naudojant FFPE mėginius, kurių  $\Delta Cq$  vertė  $\leq 5$ , rekomenduojama DNR įvestis yra 50–1 000 ng.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ nerekomenduojama naudoti su prastos kokybės FFPE mėginiais, kurių  $\Delta Cq > 5$ . Naudoti mėginius, kurių  $\Delta Cq > 5$ , galima, bet gali padidėti bibliotekos paruošimo nesėkmės tikimybė arba sumažėti tyrimo veiksmingumas.

### FFPE išskyrimas

Naudokite nukleorūgšties atskyrimo metodą, kuriuo sudaromi dideli atkūrimo kiekiai, sumažinamos mėginio sąnaudos ir išsaugomas mėginio vientisumas. Galite naudoti bet kurį patvirtintą DNR išskyrimo iš FFPE mėginių metodą. Naudojant iš FFPE audinio išskirtą gDNR, reikalingas pradinis DNR įvesties kiekybinis nustatymas, o „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ nesudaro normalizuotų iš anksto gausintų bibliotekų kiekių.

## FFPE DNR kvalifikacija

gDNR, išskirtą iš FFPE audinio, prieš naudojimą reikia kvalifikuoti. Norėdami užtikrinti optimalų veikimą, įvertinkite DNR mėginio kokybę naudodami patvirtintą išskyrimo metodą, skirtą iš FFPE mėginių išskirti DNR kvalifikuoti. „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ protokolas suderinamas su FFPE DNR mėginiais, kurių  $\Delta Cq$  vertė  $\leq 5$ . „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ nerekomenduojama naudoti su prastos kokybės FFPE mėginiais, kurių  $\Delta Cq > 5$ . Naudoti mėginius, kurių  $\Delta Cq > 5$ , galima, bet gali padidėti bibliotekos paruošimo nesėkmės tikimybė arba sumažėti tyrimo veiksmingumas.

## [Pasirinktinai] FFPE etaloniniai mėginiai

Vykdydami protokolą, kaip teigiamas kontrolines medžiagas naudokite charakterizuotas etalones medžiagas, tokias kaip „Horizon HD799“ (DNR). Kaip etaloniniai mėginiai taip pat gali būti naudojamos kvalifikuotos FFPE medžiagos iš ksenograftų, gautų iš ląstelių linijos. Prieš naudodami fluorometrinį metodą nustatykite etaloninių medžiagų kiekį.

**PASTABA** Naudojant teigiamą kontrolinį etaloninį mėginį arba neigiamą kontrolinį mėginį, naudojami reagentai ir sumažėja bendras nežinomų mėginių, kuriuos galima apdoroti, skaičius.

## Mėginio įvesties rekomendacijos

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ mėginio įvesties rekomendacijos apibendrintos toliau pateiktoje lentelėje.

1 lent. Mėginio įvesties rekomendacijos

Mėginio įvesties tipas	Mėginio įvesties kiekis	Reikalingos DNR įvesties kiekybinis nustatymas	Reikalinga DNR įvesties kokybė	Normalizuotos iš anksto gausintos bibliotekos kiekis
gDNR	10–49 ng	Taip	260/280 santykis 1,8–2,0	Ne
gDNR	50–1 000 ng	Ne	260/280 santykis 1,8–2,0	Taip
gDNR iš kraujo	50–1 000 ng	Ne	260/280 santykis 1,8–2,0	Taip
gDNR iš FFPE	50–1 000 ng	Taip	$\Delta Cq$ vertė $\leq 5$	Ne

Rekomenduojami eBLTS PGR programos PGR ciklai koreguojami pagal mėginio įvesties koncentraciją ir kokybę. Daugiau informacijos ieškokite skyriuje [Tagmentuotos DNR amplifikavimas 29 psl.](#)

## Patarimai ir darbo metodai

### Stenkitės išvengti kryžminės taršos

- Lašindami arba perkeldami mėginius, keiskite antgalius *kiekvienam mėginiui*.
- Lašindami indekso adapterius su kelių kanalų pipete, keiskite antgalius *kiekvienai eilutei* arba *kiekvienam stulpeliui*. Jei naudojate vieno kanalo pipetę, antgalius keiskite kiekvienam mėginiui.

### Plokštelės užsandarinimas

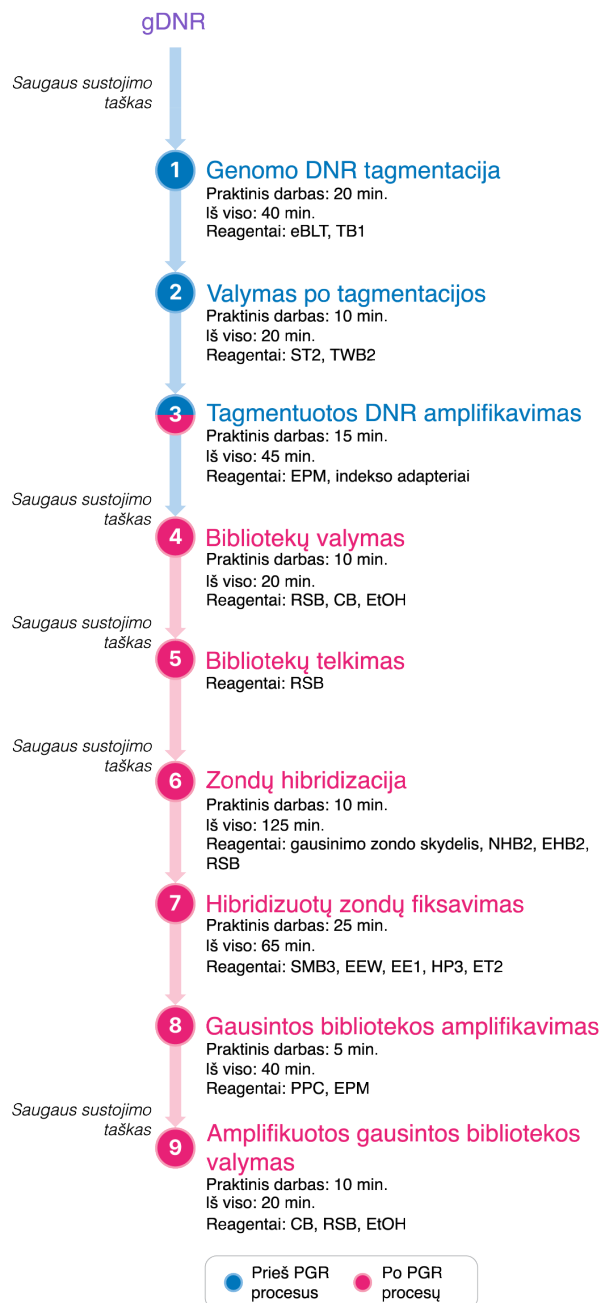
- 96 šulinėlių plokštelę visada užsandarinkite nauju lipniuoju sandarikliu naudodami guminį volelį, kad prieš toliau nurodytus protokolo veiksmus plokštelę uždengtumėte.
  - Maišymo veiksmai
  - Inkubavimo veiksmai. Tinkamai neužsandarinus plokštelės, inkubuojant galimas garavimas.
  - Centrifugavimo veiksmai
  - Hibridizacijos veiksmai
- Norėdami sumažinti kryžminės taršos ir garavimo riziką, įsitinkite, kad kraštai ir šulinėliai yra visiškai užsandarinti.
  - Jei ant sandariklio ar plokštelės šulinėlių šonų pastebėjote skysčio ar kondensato, prieš atidarydami centrifuguokite pagal poreikį.
- Padėkite plokštelę ant lygaus paviršiaus ir tada lėtai nuimkite plėvelę.

### Smulkių gausinimo BLT (eBLTS) naudojimas

- eBLTS atsargų mėgintuvėlį laikykite vertikaliai šaldytuve, kad granulės visada būtų pamerktos buferiniame tirpale.
- Prieš pat naudojimą kruopščiai išmaišykite eBLTS atsargų mėgintuvėlį sūkuriniu maišytuvu, kol granulės bus resuspenduotos. Kad nepakistų granulių vieta, nerekomenduojama centrifuguoti prieš pipetavimą.
- Jei granulės prilipo prie 96 šulinėlių plokštelės šono ar viršaus, 3 sekundes centrifuguokite 280 × g ir tada pipetuokite, kad resuspenduotumėte.
- Kai plaunate eBLTS:
  - Naudokite plokštei tinkamą magnetinį stovą.
  - Plokštelę laikykite ant magnetinio stovo, kol instrukcijomis bus nurodyta ją nuimti.
  - Jei granulės įsiurbiamos į pipetės antgalius, išleiskite jas atgal į plokštelę, esančią ant magnetinio stovo, ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 minutes).

# „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ darbo eiga

Toliau pateiktoje schemoje pavaizduota „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ darbo eiga. Tarp veiksmų pažymėti saugaus sustojimo taškai. Numatytasis laikas pagrįstas 12 mėginių apdorojimu atliekant 12-pusį gausinimą.



## Naudojimo instrukcijos

Šiame skyriuje apibūdinamas „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ protokolas.

- Peržiūrėkite suplanuotą visą sekos nustatymo darbo eigą nuo mėginio iki analizės, kad užtikrintumėte produktų ir eksperimento parametrų suderinamumą.
- Prieš tęsdami, patikrinkite rinkinio turinį ir įsitikinkite, kad turite reikalingus komponentus, įrangą ir medžiagas.
  - Trečiųjų šalių biotilinti zondai turi atitikti konkrečius reikalavimus. Žr. skyrių [Gausinimo zondo skydelio reikalavimai 11 psl.](#) ir įsitikinkite, kad jūsų trečiųjų šalių zondai atitinka reikalavimus.
- Protokolo laikykitės nurodyta tvarka, naudodami nurodytą tūrį ir inkubavimo parametrus.
- Jei protokole nenurodytas saugaus sustojimo taškas, nedelsdami pereikite prie kito veiksmo.
- Kuriant pagrindinį mišinį, perviršis į nurodytą tūrį yra įtrauktas.
- Būtinai naudokite savo plokštelės tipui tinkamą magnetinį stovą.

## Pasiruošimas atlikti telkimą

Šis veiksmas reikalingas norint užtikrinti sėkmingą gausintų bibliotekų sekų nustatymą. Bibliotekų telkimas galimas prieš gausinimą ir prieš sekos nustatymą.

**Prieš gausinimą** – atskiros indeksuotos amplifikuotos bibliotekos sutelkiamos kartu, kad būtų galima gausinti su pasirinktu zondo skydeliu. Taip sukuriama multipleksinis gausintų bibliotekų telkinys. Naudojant FFPE mėginio įvestį, buvo ištirtas apdorojimas, kuris rekomenduojamas išskirtinai 1-pusio gausinimo reakcijoms. Naudojant aukštos kokybės gDNR, buvo ištirtas 12-pusis gausinimas, tačiau yra galimas nuo 2-pusio iki 11-pusio.

**Prieš sekos nustatymą** – 1-pusio gausinimo bibliotekos ir (arba) multipleksinio gausinimo bibliotekos sutelkiamos kartu prieš sekos nustatymą. Gausintų bibliotekų, kurių seką galima nustatyti, skaičius priklauso nuo tikslinio kiekvieno mėginio, esančio jūsų sekos nustatymo sistemoje, nuskaitymo gylio.

## Unikalus dvigubas indeksavimas

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ naudoja unikalius dvigubus indeksus.

- Dvigubai indeksuotos bibliotekos prideda 1 (i7) indekso ir 2 (i5) indekso sekas, kad sugeneruotų unikalias pažymėtas bibliotekas.
- UD indeksai turi skirtingas, nesusijusias indeksų sekas, skirtas i7 ir i5 indeksams nuskaityti. Indeksai yra 10 bazių ilgio.

Pasirinkus indekso adapterius su įvairiomis sutelktų bibliotekų sekomis, optimizuojamas spalvos balansas sėkmingai sekoskaitai ir duomenų analizei atlikti. Telkinių, kurie pasižymi  $\geq 10$ -pusio gausinimo pusiškumu, spalva natūraliai subalansuota, todėl galite naudoti bet kurį indekso adapterio derinį. Vykdamas sekos nustatymą „DNA GenerateFASTQ Dx“ „Local Run Manager“ modulis pateikia subalansuotos spalvos indeksų derinių parinkčių ir praneša jums, jei pasirinktuose indeksų deriniuose nepakanka įvairovės.

Informacijos apie „Illumina“ UD indekso adapterio sekas ir plokštelės išdėstymus žr. [Priedas: „Illumina“ UD indekso adapterio sekos 62 psl.](#)

## Palaikomas gausinimo pusiškumas

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ reagentai sukonfigūruoti ir patikrinti taikant 1-pusį ir 12-pusį gausinimą. Nors galima taikyti kitokį gausinimo pusiškumą, tam tikri pusiškumo variantai reikalauja papildomo išankstinio gausinimo bibliotekos paruošimo ir gausinimo zondo skydelio reagentų.

Norint gauti tinkamą gausinimo kiekį taikant nestandartinį gausinimo pusiškumą, gali reikėti papildomai optimizuoti. Optimalūs rezultatai negarantuojami.

- **Gausinimo pusiškumas** – skaičius iš anksto gausintų bibliotekų (1–12), sutelktų kartu į vieną gausinimo reakciją hibridizacijai su gausinimo zondų skydeliais vykdyti. Pavyzdžiui, sujungus 12 iš anksto gausintų bibliotekų, sukuriamas 12-pusio gausinimo telkinys.
- **Gausinimo reakcija** – unikalių gausinimo reakcijų preparatų skaičius, nepaisant vienai reakcijai sutelktų iš anksto gausintų bibliotekų skaičiaus. Pavyzdžiui, per vieną gausinimo reakciją galima paruošti 1-pusio arba 12-pusio gausinimo telkinį.

Norėdami apskaičiuoti visą bibliotekų kiekį po gausinimo, padauginkite vienos reakcijos gausinimo pusiškumą iš gausinimo reakcijų skaičiaus. Pavyzdžiui, per vieną 12-pusio gausinimo telkinio gausinimo reakciją susidaro 12 bibliotekų po gausinimo telkinys.

Telkiant iš anksto gausintas bibliotekas, „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ reagentai palaiko toliau nurodytas gausinimo reakcijas ir pusiškumą.

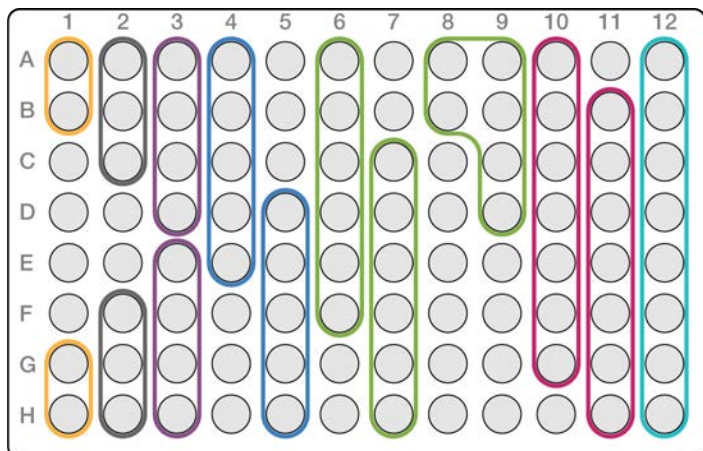
„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ reagentai	Gausinimo reakcijos	Gausinimo pusiškumas
16 mėginių rinkinys	16 reakcijų	1-pusis
96 mėginių rinkinys	8 reakcijos	12-pusis

## Nuo dvipusio iki aštuonpusio telkimo strategijos

Toliau pateiktoje lentelėje parodyti indekso adapteriai (šulinėliai), kuriuos galima sujungti į 2–8-pusį telkinį, o spalvomis užkoduotame paveikslėlyje pavaizduotas kiekvienas derinys.

Sutelkite bet kurį pusiškumą  $\geq 2$  iš stulpelio viršaus arba apačios. Netelkite per eilutę.

Pusiškumas	Deriniai	Spalva paveikslėlyje
2	Pirmieji du arba paskutiniai du šulinėliai stulpelyje: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A ir B</li> <li>• G ir H</li> </ul> C–F eilutės nenaudojamos.	Oranžinė
3	Pirmieji trys arba paskutiniai trys šulinėliai stulpelyje: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–C</li> <li>• F–H</li> </ul> D ir E eilutės nenaudojamos.	Pilka
4	Pirmieji keturi arba paskutiniai keturi šulinėliai stulpelyje: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–D</li> <li>• E–H</li> </ul>	Violetinė
5	Pirmieji penki arba paskutiniai penki šulinėliai stulpelyje: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–E</li> <li>• D–H</li> </ul>	Mėlyna
6	[1 parinktis] Pirmieji šeši arba paskutiniai šeši šulinėliai stulpelyje: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–F</li> <li>• C–H</li> </ul> [2 parinktis] Pirmieji du šulinėliai (A ir B) arba paskutiniai du šulinėliai (G ir H) viename stulpelyje ir bet kurie keturi šulinėliai gretimame stulpelyje.	Žalia
7	Pirmieji septyni arba paskutiniai septyni šulinėliai stulpelyje: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–G</li> <li>• B–H</li> </ul>	Rožinė
8	Visas stulpelis.	Žalsvai mėlyna

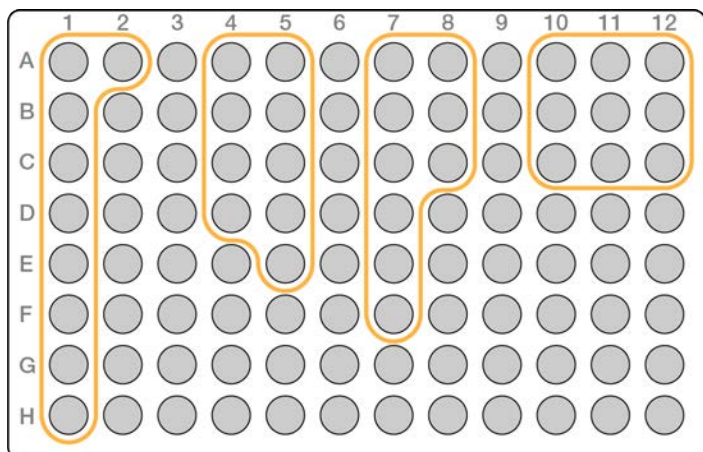


## Devynpusio telkimo strategijos

Naudokite indekso adapterius iš bet kurių šulinėlių, kurie optimizuoja sekos nustatymo vykdymo spalvos balansą, pavyzdžiui:

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

Toliau pateiktame paveikslėlyje pavaizduoti visi keturi pavyzdžiai.



## Genomo DNR tagmentacija

Atliekant šį veiksma, naudojamos smulkios gausinimo BLT granulės (eBLTS), skirtos DNR tagmentuoti. Tai procesas, per kurį DNR fragmentuojama ir pažymima adapterio sekomis.



## Eksploatacinės medžiagos

- eBLTS (smulkios gausinimo BLT) (geltonas dangtelis)
- TB1 (1 tagmentacijos buferinis tirpalas)
- Vanduo be nukleazės
- 96 šulinėlių PGR plokštelė
- Lipnasis sandariklis
- 1,7 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai
- 8 mėgintuvėlių juostelė
- Pipetės antgaliai
  - 200 µl kelių kanalų pipetės



### DĖMESIO

Šiame reagentų rinkinyje yra galimai pavojingų cheminių medžiagų. Pavojus žmogui kyla įkvėpus, nurijus, patekus ant odos ir į akis. Dėvėkite tinkamai nuo pavojaus saugančias apsaugines priemones, įskaitant akių apsaugos priemones, pirštines ir laboratorinį chalata. Su panaudotais reagentais elkitės kaip su cheminėmis atliekomis ir utilizuokite laikydamiesi taikomų regiono, nacionalinių ir vietinių įstatymų bei teisės aktų. Su aplinkosauga, sveikatos apsauga ir saugumu susijusios papildomos informacijos ieškokite saugos duomenų lapuose (SDL) adresu [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Apie reagentus

- eBLTS reikia laikyti nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje. Nenaudokite eBLTS, laikytų žemesnėje nei 2 °C temperatūroje.
- Necentrifuguokite eBLTS.

## Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
eBLTS (geltonas dangtelis)	Nuo 2 °C iki 8 °C	Palaukite, kol pasieks kambario temperatūrą. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu prieš pat naudojimą. Necentrifuguokite prieš pipetavimą.
TB1	Nuo –25 °C iki –15 °C	Palaukite, kol pasieks kambario temperatūrą. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.

2. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu arba pipetuokite DNR, tada trumpai centrifuguokite.

3. Įrašykite toliau nurodytą TAG programą termocikleryje.
  - Pasirinkite iš anksto pašildyto dangčio parinktį ir nustatykite 100 °C
  - Nustatykite 50 µl reakcijos tūrio vertę
  - 55 °C 5 minutes
  - Laikykite 10 °C temperatūroje

## Procedūra

1. Įlašinkite 2–30 µl DNR į kiekvieną 96 šulinėlių PGR plokštelės šulinėlį, kad bendras įvesties kiekis būtų 50–1 000 ng.  
Jei DNR tūris yra < 30 µl, į DNR mėginius pridėkite vandens be nukleazės, kad bendrasis tūris būtų 30 µl.
2. Kruopščiai išmaišykite eBLTS sūkuriniu maišytuvu, kol granulės bus visiškai resuspenduotos.
3. Mėgintuvėlyje sumaišykite toliau nurodytus tūrius, kad paruoštumėte tagmentacijos pagrindinį mišinį. Kiekvieną tūrį padauginkite iš apdorojamų mėginių skaičiaus.
  - eBLTS (11,5 µl)
  - TB1 (11,5 µl)Reagentų perviršis į tūrį įtrauktas.
4. Tagmentacijos pagrindinį mišinį kruopščiai pipetuokite, kad sumaišytumėte.
5. Tagmentacijos pagrindinio mišinio tūrį padalykite lygiomis dalimis į 8 mėgintuvėlių juostelę.
6. Naudodami 200 µl kelių kanalų pipetę, perkelti 20 µl tagmentacijos pagrindinio mišinio į kiekvieną PGR plokštelės šulinėlį su mėginiu. Su kiekvienu mėginio stulpeliu ar eilute naudokite naujus antgalius.
7. Atlikę tagmentacijos pagrindinio mišinio dozavimą, 8 mėgintuvėlių juostelę išmeskite.
8. Naudodami 200 µl kelių kanalų pipetę, nustatytą iki 40 µl, pipetuokite kiekvieną mėginį 10 kartų, kad sumaišytumėte. Su kiekvienu mėginio stulpeliu naudokite naujus antgalius.  
Arba užsandarinkite PGR plokštelę ir 1 minutę naudokite plokštelių maišytuvą 1 600 sūk./min. greičiu.
9. Užsandarinkite plokštelę, padėkite ją ant iš anksto užprogramuoto termociklerio ir vykdykite TAG programą.
10. Palaukite, kol TAG programa pasieks 10 °C laikymo temperatūrą, tada nedelsdami išimkite plokštelę.
11. Palikite 96 šulinėlių PGR plokštelę pastovėti kambario temperatūroje 2 minutes, tada pereikite prie kito veiksmo.

## Valymas po tagmentacijos

Atliekant šį veiksmą, naudojant eBLTS išplaunama adapteriu pažymėta DNR prieš PGR amplifikavimą.

### Eksploatacinės medžiagos

- ST2 (2 tagmentacijos sustabdymo buferinis tirpalas)
- TWB2 (2 tagmentacijos plovimo buferinis tirpalas)

- 96 šulinėlių PGR plokštelės magnetinis stovas
- Lipnūs sandariklis
- 8 mėgintuvėlių juostelė
- Pipetės antgaliai
  - 20 µl kelių kanalų pipetės
  - 200 µl kelių kanalų pipetės
- Pasiruošimas vėlesnei procedūrai
  - EPM (sustiprintas PGR mišinys)
  - Indekso adapterio plokštelė

### Apie reagentus

- Būtinai naudokite savo plokštei tinkamą magnetinį stovą. Jei su PGR plokšte naudosite MIDI plokštelės magnetinį stovą, TWB2 gali neprilipti prie granulių.
- TWB2 pipetuokite lėtai, kad sumažintumėte putojimą ir nebūtų įsiurbtas netinkamas tūris, o maišymas neliktų neužbaigtas.

### Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
EPM	Nuo –25 °C iki –15 °C	Atšildykite ant ledo 1 valandą. Apverskite, kad sumaišytumėte, tada trumpai centrifuguokite.
ST2	Nuo 15°C iki 30°C	Jei pastebite nuosėdų, šildykite 37 °C temperatūroje 10 minučių ir tada išmaišykite sukuriniu maišytuvu, kol nuosėdos ištirps. Naudokite kambario temperatūros.
TWB2	Nuo 15°C iki 30°C	Naudokite kambario temperatūros.
Indekso adapterio plokštelė	Nuo –25 °C iki –15 °C	Atšildykite 30 minučių palikdami kambario temperatūroje.

### Procedūra

1. Įlašinkite 10 µl ST2 į kiekvieną tagmentacijos reakciją. Jei naudojate kelių kanalų pipetę, pipetuokite ST2 į 8 mėgintuvėlių juostelę ir tada perkelti atitinkamus tūrius į PGR plokštelę. Su kiekvienu mėginio stulpeliu ar eilute naudokite naujus antgalius.
2. Naudodami 200 µl pipetę, nustatytą iki 50 µl, lėtai pipetuokite kiekvieną šulinėlį 10 kartų, kad resuspenduotumėte granules.  
Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 minutę maišykite 1 600 suk./min. greičiu. Jei reikia, pakartokite.

3. Užsandarinkite plokštelę ir 10 sekundžių centrifuguokite 280 × g.
4. Inkubuokite kambario temperatūroje 5 minutes.
5. Padėkite ant PGR plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (3 minutes).
6. [≤ 48 mėginiai] Plaukite tris kartus, kaip nurodyta toliau.
  - a. Naudodami 200 µl kelių kanalų pipetę, nustatytą iki 60 µl, pašalinkite ir išmeskite supernatantą nepažeisdami granulių.
  - b. Išimkite iš magnetinio stovo.
  - c. Iš karto po to lėtai įlašinkite 100 µl TWB2 tiesiogiai į granules.
  - d. Lėtai pipetuokite, kol granulės bus visiškai resuspenduotos. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 minutę maišykite 1 600 sūk./min. greičiu.
  - e. Jei turinys ištiško, 10 sekundžių sukite žemyn 280 × g.
  - f. Padėkite ant PGR plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (3 minutes). Palikite plokštelę ant magnetinio stovo, o TWB2 – šulinėliuose, kad pernelyg stipriai neišdžiūtų, atliekant trečiąjį plovimą. Paruošę PGR pagrindinį mišinį, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
  - g. Naudodami 200 µl kelių kanalų pipetę, nustatytą iki 100 µl, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
  - h. Pakartokite c–f veiksmus du kartus ir iš viso atlikite tris plovimo procedūras.
7. [> 48 mėginiai] Plaukite tris kartus, kaip nurodyta toliau.
  - a. Atlikite b ir c veiksmus žingsniais nuo 1 stulpelio iki 2 stulpelio, kol bus apdoroti visi stulpeliai, kad per stipriai neišdžiūtų.
  - b. Naudodami 200 µl kelių kanalų pipetę, nustatytą iki 60 µl, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
  - c. Išimkite iš magnetinio stovo.
  - d. Iš karto po to lėtai dozuokite 100 µl TWB2 tiesiogiai į granules.
  - e. Lėtai pipetuokite, kol granulės bus visiškai resuspenduotos. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 minutę maišykite 1 600 sūk./min. greičiu.
  - f. Jei turinys ištiško, 10 sekundžių sukite žemyn 280 × g.
  - g. Padėkite ant PGR plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (3 minutes). Palikite plokštelę ant magnetinio stovo, o TWB2 – šulinėliuose, kad pernelyg stipriai neišdžiūtų, atliekant trečiąjį plovimą. Paruošę PGR pagrindinį mišinį, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
  - h. Naudodami 200 µl kelių kanalų pipetę, nustatytą iki 100 µl, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
  - i. Išimkite iš magnetinio stovo ir lėtai įlašinkite 100 µl TWB2 tiesiogiai į granules.
  - j. Pakartokite h ir i veiksmus 1 ar 2 stulpelių žingsniais, kol bus apdoroti visi stulpeliai.
  - k. Pakartokite e–h veiksmus du kartus ir iš viso atlikite tris plovimo procedūras.
8. Palikite ant magnetinio stovo iki 4 dalies *Procedūra* veiksmo, aprašyto skiltyje *Tagmentuotos DNR amplifikavimas*.

TWB2 lieka šulinėliuose, kad granulės pernelyg stipriai neišdžiūtų.

## Tagmentuotos DNR amplifikavimas

Šiuo veiksmu amplifikuojama tagmentuota DNR naudojant apriboto ciklo PGR programą. Atliekant PGR veiksmą, pridedami 1 (i7) indekso adapteriai, 2 (i5) indekso adapteriai ir sekos, reikalingos nustatant sankaupos generavimo seką.

### Eksploatacinės medžiagos

- EPM (sustiprintas PGR mišinys)
- Indekso adapterio plokštelė
- 96 šulinėlių PGR plokštelė
- Vanduo be nukleazės
- Lipnūs sandariklis
- 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai
- Pipetės antgaliai
  - 20 µl kelių kanalų pipetės
  - 200 µl kelių kanalų pipetės

### Apie reagentus

- Indekso adapterių plokštelės
  - Šulinėlyje gali būti > 10 µl indekso adapterių.
  - Nedėkite mėginių į indekso adapterio plokštelę.
  - Kiekvienas indekso plokštelės šulinėlis yra skirtas naudoti tik vieną kartą.

### Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
EPM	Nuo –25 °C iki –15 °C	Atšildykite 4 °C temperatūroje arba laikykite ant ledo 1 valandą. Apverskite, kad sumaišytumėte, tada trumpai centrifuguokite.
Indekso adapterio plokštelė	Nuo –25 °C iki –15 °C	Atšildykite 30 minučių palikdami kambario temperatūroje.

2. Įrašykite toliau nurodytą eBLTS PGR programą į termociklerį, naudodami atitinkamą PGR ciklų skaičių, nurodytą toliau pateiktoje lentelėje.
  - Pasirinkite iš anksto pašildyto dangčio parinktį ir nustatykite 100 °C

- Nustatykite 50 µl reakcijos tūrio vertę
- 72 °C 3 minutes
- 98 °C 3 minutes
- X ciklą:
  - 98 °C 20 sekundžių
  - 60 °C 30 sekundžių
  - 72 °C 1 minutę
- 72 °C 3 minutes
- Laikykite 10 °C temperatūroje

Bendra vykdymo trukmė yra ~38 minutės, vykdant 9 ciklus, ir ~46 minutės, vykdant 12 ciklų.

Mėginio įvesties tipas	PGR ciklų skaičius (X)
10–49 ng gDNR	12
50–1 000 ng gDNR	9
50–1 000 ng gDNR, išskirtos iš FFPE	12
gDNR, išskirta iš kraujo	9

## Procedūra

1. Sumaišykite toliau nurodytas medžiagas, kad paruoštumėte PGR pagrindinį mišinį. Kiekvieną tūrį padauginkite iš apdorojamų mėginių skaičiaus.
  - EPM (23 µl)
  - Vanduo be nukleazės (23 µl)
 Reagentų perviršis į tūrį įtrauktas.
2. 10 kartų pipetuodami PGR pagrindinį mišinį sumaišykite, tada trumpai centrifuguokite.
3. Plokštei esant ant magnetinio stovo, naudodami 200 µl kelių kanalų pipetę pašalinkite ir išmeskite TWB2. Ant šulinėlio sienelių likusios putos bibliotekai neigiamo poveikio neturi.
4. Išimkite iš magnetinio stovo.
5. Iš karto įlašinkite 40 µl PGR pagrindinio mišinio tiesiogiai į kiekviename šulinėlyje esančias granules.
6. Pipetuodami iš karto sumaišykite, kol granulės bus visiškai resuspenduotos. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 minutę maišykite 1 600 sūk./min. greičiu.
7. Užsandarinkite mėginio plokštelę ir 10 sekundžių centrifuguokite 280 × g.
8. Centrifuguokite indekso adapterio plokštelę 1 minutę 1 000 × g.

9. Paruoškite indekso adapterio plokštelę.
  - [ $< 96$  mėginiai] Pradurkite indekso adapterio plokštelės folijos sandariklį, kiekvienam šulinėliui naudodami naują pipetės antgalį. Tai darykite tik su apdorojamais mėginiais.
  - [96 mėginiai] Prilygiuokite naują pusinio pločio PGR plokštelę virš indekso adapterio plokštelės ir paspauskite žemyn, kad pradurtumėte folijos sandariklį. Išmeskite PGR plokštelę, kuri buvo naudojama folijos sandarikliui pradurti.
10. Naudodami naują pipetės antgalį, įlašinkite 10  $\mu$ l iš anksto suporuotų indekso adapterių į kiekvieną šulinėlį.
11. Naudodami pipetę, nustatytą iki 40  $\mu$ l, pipetuodami 10 kartų sumaišykite. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 minutę maišykite 1 600 sūk./min. greičiu.
12. Užsandarinkite plokštelę ir 10 sekundžių centrifuguokite 280  $\times$  g.
13. Padėkite ant termociklerio ir vykdykite eBLTS PGR programą.

### SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, laikykite nuo  $-25$  °C iki  $-15$  °C temperatūroje ne ilgiau nei 30 dienų.

## Bibliotekų valymas

Atliekant šį veiksma, naudojama dvipusio granulių gryninimo procedūra, skirta amplifikuotoms bibliotekoms išgryninti.

### Eksploatacinės medžiagos

- CB (valymo granulės)
- RSB (resuspensijos buferinis tirpalas)
- Šviežiai paruoštas 80 % etanolis (EtOH)
- 96 šulinėlių 0,8 ml polipropileno gilių šulinėlių laikymo plokštelė (MIDI plokštelė)
- 96 šulinėlių PGR plokštelė
- MIDI plokštelės magnetinis stovas
- PGR plokštelės magnetinis stovas
- 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai
- Vanduo be nukleazės

### Apie reagentus

- Valymo granulės
  - Prieš naudodami kiekvieną kartą išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.
  - Dažnai išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, kad užtikrintumėte tolygų granulių pasiskirstymą.
  - Įsiurbkite ir dozuokite lėtai, nes tirpalas yra klampus.

## Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
CB	Kambario temperatūra	Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu ir apverskite, kad sumaišytumėte, kol skysčio spalva taps vienoda.
RSB	Nuo 2 °C iki 8 °C	Atšildykite 30 minučių palikdami kambario temperatūroje. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.

## Procedūra

1. Maišykite 96 šulinėlių PGR plokštelę 1 800 sūk./min. greičiu 1 minutę ir tada trumpai centrifuguokite.
2. Padėkite ant PGR plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (1 minutę).
3. CB 3 kartus po 10 sekundžių maišykite sūkuriniu maišytuvu, tada kelis kartus apverskite, kad resuspenduotumėte.
4. Jei naudojate aukštos kokybės gDNR, atlikite toliau nurodytus veiksmus.
  - a. Įlašinkite 77 µl vandens be nukleazės į kiekvieną naujos MIDI plokštelės šulinėlį.
  - b. Įlašinkite 88 µl CB į kiekvieną MIDI plokštelės šulinėlį.
  - c. Perkelkite 45 µl supernatanto iš kiekvieno PGR plokštelės šulinėlio į atitinkamą MIDI plokštelės šulinėlį.
  - d. Išmeskite PGR plokštelę.
  - e. Pipetuokite kiekvieną šulinėlį 10 kartų, kad sumaišytumėte. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 minutę maišykite 1 800 sūk./min. greičiu.
  - f. Užsandarinkite plokštelę ir inkubuokite kambario temperatūroje 5 minutes.
  - g. Patikrinkite, ar nėra oro burbuliukų. Jų pastebėję, pasukite žemyn.
  - h. Padėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (5 minutes).
  - i. Inkubuodami, kruopščiai išmaišykite CB sūkuriniu maišytuvu ir įlašinkite 20 µl į kiekvieną naujos MIDI plokštelės šulinėlį.
  - j. Perkelkite 200 µl supernatanto iš kiekvieno pirmosios MIDI plokštelės šulinėlio į atitinkamą naujos MIDI plokštelės šulinėlį (kuriame yra 20 µl CB).
  - k. Išmeskite pirmąją MIDI plokštelę.
  - l. Pipetuokite kiekvieną naujos MIDI plokštelės šulinėlį 10 kartų, kad sumaišytumėte. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 minutę maišykite 1 800 sūk./min. greičiu.
5. Jei naudojate išskirtą FFPE, atlikite toliau nurodytus veiksmus.
  - a. Įlašinkite 81 µl CB į kiekvieną naujos MIDI plokštelės šulinėlį.
  - b. Perkelkite 45 µl supernatanto iš kiekvieno PGR plokštelės šulinėlio į atitinkamą MIDI plokštelės šulinėlį.
  - c. Išmeskite PGR plokštelę.



- d. Pipetuokite kiekvieną šulinėlį 10 kartų, kad sumaišytumėte. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 minutę maišykite 1 800 sūk./min. greičiu.
6. Inkubuokite kambario temperatūroje 5 minutes.
7. Patikrinkite, ar nėra oro burbuliukų. Jų pastebėję, pasukite žemyn.
8. Padėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (5 minutes).
9. Nepažeisdami granulių, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
10. Išplaukite granules, kaip nurodyta toliau.
  - a. Plokštei esant ant magnetinio stovo, nemišydami įlašinkite 200 µl šviežio 80 % EtOH.
  - b. Inkubuokite 30 sekundžių.
  - c. Nepažeisdami granulių, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
11. Išplaukite granules **antrąjį** kartą.
12. Džiovinkite ore ant magnetinio stovo 5 minutes.
13. Džiovindami oru ir naudodami 20 µl pipetę, pašalinkite ir išmeskite likusį EtOH.
14. Išimkite iš magnetinio stovo.
15. Įlašinkite 17 µl RSB į granules.
16. Užsandarinkite plokštelę ir 2 minutes maišykite 1 800 sūk./min. greičiu.
17. Inkubuokite kambario temperatūroje 2 minutes.
18. Patikrinkite, ar nėra oro burbuliukų. Jų pastebėję, pasukite žemyn.
19. Padėkite plokštelę ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 minutes).
20. Perkelkite 15 µl supernatanto į naują 96 šulinėlių PGR plokštelę.

#### SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, sandariai uždarykite plokštelę ir laikykite ją nuo –25 °C iki –15 °C temperatūroje ne ilgiau nei 30 dienų.

## Iš anksto gausintų bibliotekų telkimas

Atliekant šį veiksma, DNR bibliotekos sujungiamos su unikaliais indeksais į vieną telkinį, kurį sudaro iki 12 bibliotekų.

### Telkimo metodai

Telkti galite pagal tūrį arba masę. Naudodami toliau pateiktą lentelę nustatykite atitinkamą savo įvesties metodą.

2 lent. Rekomenduojami telkimo metodai

Mėginio įvestis	Telkimo metodas
10–49 ng gDNR	Masė

Mėginio įvestis	Telkimo metodas
50–1 000 ng gDNR	Tūris
gDNR, išskirta iš FFPE	Masė
gDNR, išskirta iš kraujo	Tūris

- Vienpusis gausinimas nereikalauja iš anksto gausintų bibliotekų telkimo. Tačiau gali reikėti pridėti RSB.
- Atlikus iš anksto gausintos bibliotekos kiekybinį nustatymą galima telkti visus mėginio įvesties tipus pagal masę, kad būtų pasiektas optimalus indekso balansas.
- Galutinis iš anksto gausintų bibliotekų, sugeneruotų per atskiras eksperimentines ruošimo procedūras, kiekis gali skirtis. Todėl, norint pasiekti optimalų indekso balansą rekomenduojama telkti pagal masę.
- Toliau nurodytose situacijose naudokite 1-pusį gausinimą.
  - 10–49 ng gDNR
  - 50–1 000 ng gDNR, išskirtos iš FFPE
  - Somatinių variantų priskyrimo mažo smulkių alelių dažnio aptikimas.

## Telkimas pagal masę

Toliau nurodytose situacijose kiekybiškai nustatykite savo bibliotekas, kad būtų naudojama DNR masė vienai bibliotekai atliekant gausinimą, nurodytą dalyje [Iš anksto gausintų bibliotekų telkimas lygiomis koncentracijomis 35 psl.](#)

- 10–49 ng gDNR mėginio įvestis
- 50–1 000 ng gDNR, išskirtos iš FFPE, mėginio įvestis
- Somatinių variantų priskyrimo mažo smulkių alelių dažnio aptikimas
- gDNR, išskirta iš kraujo, optimaliam indekso balansui pasiekti

## Iš anksto gausintų bibliotekų kiekybinis nustatymas

1. Apdorokite 1 µl iš anksto gausintų bibliotekų naudodami pageidaujamą fluorescencija pagrįstą kiekybinio nustatymo metodą, su kuriuo naudojami dsDNR interkaliojami dažai.
  - Jei naudojate 50–1 000 ng aukštos kokybės gDNR, tikėtinas iš anksto gausintos bibliotekos kiekis yra  $\geq 500$  ng.
  - Jei naudojate 50–1 000 ng gDNR, išskirtos iš FFPE, tikėtinas iš anksto gausintos bibliotekos kiekis yra 500–6 000 ng, atsižvelgiant į pradinio mėginio kokybę.

**PASTABA** Jei naudojate skirtingų poslinkių kiekybinio nustatymo metodus, kvalifikuokite šios darbo eigos kiekybinio nustatymo metodą. Koncentracijos rezultatai gali skirtis, atsižvelgiant į naudojamą metodą.

**Iš anksto gausintų bibliotekų telkimas lygiomis koncentracijomis**

Naudokitės toliau pateikta lentele, kad nustatytumėte gausinimui reikalingą DNR masę vienai bibliotekai pagal mėginio tipą ir gausinimo pusiškumą. Optimalūs gausinimo kiekiai ir tyrimo veiksmingumas negarantuojami naudojant mažesnius iš anksto gausintos bibliotekos kiekius, nei rekomenduojama.

Bendroji DNR masė vykstant gausinimo reakcijai negali viršyti 6 000 ng.

Mėginio įvestis	Gausinimo pusiškumas	DNR masė vienai bibliotekai (ng)	Bendroji DNR bibliotekos masė (ng)
Aukštos kokybės gDNR	12	250–500	3 000–6 000
gDNR, išskirta iš FFPE	1	200	200

- Užsirašykite bibliotekų, kurias planuojate telkti per šį veiksmą, indeksus.
- Atsižvelgdami į kiekvienos bibliotekos koncentraciją, apskaičiuokite tūrį, kurį reikia pridėti prie gausinimo reakcijos, kad būtų pasiekta reikalinga DNR masė.
  - Aukštos kokybės gDNR: apskaičiuokite bibliotekos tūrį, reikalingą esant 250–500 ng įvesčiai.
  - gDNR, išskirta iš FFPE: apskaičiuokite bibliotekos tūrį, reikalingą esant 200 ng įvesčiai.
- Apskaičiuotą kiekvienos bibliotekos tūrį pridėkite į tą patį PGR plokštelės šulinėlį.
- Jei naudojate aukštos kokybės gDNR, atlikite vieną iš toliau nurodytų veiksmų, atsižvelgdami į bendrąjį sutelktų iš anksto gausintų bibliotekų tūrį.
  - Jei iš anksto gausintos bibliotekos tūris = 30 µl, pereikite prie dalies [Zondų hibridizacija 37 psl.](#)
  - Jei iš anksto gausintos bibliotekos tūris < 30 µl, pridėkite RSB, kad pasiektumėte 30 µl bendrąjį tūrį.
  - Jei iš anksto gausintos bibliotekos tūris > 30 µl, naudokite granulėmis pagrįstą metodą arba vakuomo koncentratorių, kad sukonzentruotumėte sutelktą mėginį. Pridėkite RSB prie koncentruoto sutelkto mėginio, kad pasiektumėte 30 µl bendrąjį tūrį.
- Jei naudojate gDNR, išskirtą iš FFPE, atlikite vieną iš toliau nurodytų veiksmų, atsižvelgdami į bendrąjį sutelktų iš anksto gausintų bibliotekų tūrį.
  - Jei iš anksto gausintos bibliotekos tūris = 7,5 µl, pereikite prie dalies [Zondų hibridizacija 37 psl.](#)
  - Jei iš anksto gausintos bibliotekos tūris < 7,5 µl, pridėkite RSB, kad pasiektumėte 7,5 µl bendrąjį tūrį.

**SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS**

Jei norite sustoti, sandariai uždarykite plokštelę ir laikykite ją nuo –25 °C iki –15 °C temperatūroje ne ilgiau nei 30 dienų.

## Telkimas pagal tūrį

Kai įvestis yra 50–1 000 ng gDNR, per tą patį eksperimentą sugeneruotų atskirų bibliotekų kiekybiškai nustatyti ir normalizuoti nereikia.

Norėdami pasiekti optimalų veiksmingumą, telkite tik iš anksto gausintų bibliotekų mėginius, paruoštus to paties naudotojo, su ta pačia reagentų partija ir indekso adapterio plokštele.

1. Užsirašykite bibliotekų, kurias planuojate telkti per šį veiksmą, indeksus.
2. Sumaišykite toliau nurodytus iš anksto gausintos bibliotekos ir savo gausinimo pusiškumo RSB tūrius tame pačiame naujos PGR plokštelės šulinėlyje.  
Gaunamas 30 µl tūris.

Gausinimo pusiškumas*	Kiekvienos iš anksto gausintos bibliotekos tūris (µl)	RSB tūris (µl)
1-pusis	14	16
2-pusis	14	2
3-pusis	10	0
4-pusis	7,5	0
5-pusis	6	0
6-pusis	5	0
7-pusis	4,2	0,6
8-pusis	3,7	0,4
9-pusis	3,3	0,3
10-pusis	3	0
11-pusis	2,7	0,3
12-pusis	2,5	0

\* Informacijos apie nestandartinį pusiškumą (nuo 2-pusio iki 11-pusio), žr. skyrių [Procedūros apribojimai 2 psl.](#)

### SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, sandariai uždarykite plokštelę ir laikykite ją nuo –25 °C iki –15 °C temperatūroje ne ilgiau nei 30 dienų.

## [Pasirinktina] Iš anksto gausintų bibliotekų kvalifikavimas

Jei telkiate pagal tūrį, norėdami kiekybiškai nustatyti iš anksto gausintas bibliotekas, naudokite fluorometrinį metodą, su kuriuo naudojami dsDNR interkaliojami dažai. Norėdami kvalifikuoti iš anksto gausintas bibliotekas, naudokite DNR fragmentų analizatorių su atitinkamu fragmentų analizės rinkiniu.

Bibliotekai kvalifikuoti iš viso naudokite 1 µl. Iš anksto gausintos bibliotekos yra pakankamai koncentruotos, kad būtų galima atlikti smulkios kiekybinio nustatymo arba fragmentų analizės skiedimus.

## Zondų hibridizacija

Atliekant šį veiksma, sujungiami tiksliniai DNR regionai su užfiksuotais zondais.

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“ reagentai suderinami tiek su „Illumina“, tiek su trečiųjų šalių gausinimo DNR oligonukleotidų skydeliais. Informacijos apie reikalingas trečiųjų šalių skydelių specifikacijas žr. skyriuje [Gausinimo zondo skydelio reikalavimai 11 psl.](#)

### Eksploatacinės medžiagos

- EHB2 (2 gausinimo hibridizacijos buferinis tirpalas)
- NHB2 (2 hibridizacijos buferinis tirpalas + IDT NXT blokatoriai) (mėlynas dangtelis)
- Gausinimo zondo skydelis
- 96 šulinėlių PGR plokštelė
- Lipnūs sandariklis
- Pasiruošimas vėlesnei procedūrai
  - SMB3 (streptavidino magnetinės granulės)
  - EEW (sustiprintas gausinimo plovimo buferinis tirpalas) (gelsvas dangtelis)

### Apie reagentus

- Laikant, NHB2 nusėda ir atsiskiria.
- Gausinimo zondo skydelis nurodo pasirinktą gausinimo oligonukleotidų skydelį iš „Illumina“ tiekėjo.

### Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
EHB2	Nuo 2 iki 8 °C	Palaukite, kol pasieks kambario temperatūrą. Išmaišykite sukuriniu maišytuvu. Pastebėję kristalų ir drumzlių, pakartokite maišymą sukuriniu maišytuvu arba pipetuodami aukštyn ir žemyn išmaišykite, kol tirpalas taps skaidrus.
Gausinimo zondo skydelis	Nuo –25 °C iki –15 °C („Illumina“)	Naudodami tiek „Illumina“, tiek trečiųjų šalių skydelius, palaukite, kol pasieks kambario temperatūrą. Išmaišykite sukuriniu maišytuvu.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
NHB2 (mėlynas dangtelis)	Nuo –25 °C iki –15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Pasiekus kambario temperatūrą, 5 minutes pašildykite mikromėginių inkubatoriuje iki tokios pat kaip naudojamo zondo temperatūros. Kiekvieną mėginį išmaišykite sukuriniu maišytuvu 3 kartus po 10 sekundžių, kad resuspenduotumėte. Trumpai centrifuguokite. Pipetuokite aukštyn ir žemyn nuo mėgintuvėlio apačios. Pastebėję kristalų ir drumzlių, pakartokite maišymą sukuriniu maišytuvu arba pipetuodami aukštyn ir žemyn išmaišykite, kol tirpalas taps skaidrus. Naudokite, kol šiltas, kad nesusidarytų nuosėdų.
SMB3*	Nuo 2 iki 8 °C	Jei po 90 minučių laikymo taikant HYB programą iš karto pereinate prie kitos procedūros, palaukite, kol pasieks kambario temperatūrą likus bent 2 valandoms iki HYB programos pradžios.
EEW * (gelsvas mėgintuvėlis)	Nuo –25 °C iki –15 °C	Jei po 90 minučių laikymo taikant HYB programą iš karto pereinate prie kitos procedūros, palaukite, kol pasieks kambario temperatūrą likus bent 2 valandoms iki HYB programos pradžios. Pasiekus kambario temperatūrą, pašildykite mikromėginių inkubatoriuje, kol pasieksite tinkamą hibridizaciją, ir išlaikykite šią temperatūrą 30 minučių iki HYB programos pabaigos.

\* Jei prieš kitą procedūrą sustojate, atidėkite šio reagento ruošimą, kol pasieksite šią procedūrą.

2. Įrašykite toliau nurodytą HYB programą į termociklerį, naudodami atitinkamą ciklą, nurodytų [Ciklų skaičius vienam mėginiui ar skydeliui 39 psl.](#), skaičių.
- Pasirinkite iš anksto pašildyto dangčio parinktį ir nustatykite 100 °C
  - Nustatykite reakcijos tūrį
    - [Aukštos kokybės gDNR] 100 µl
    - [gDNR, išskirta iš FFPE] 25 µl
  - 98°C 5 minutes
  - X ciklų po 1 minutę, pradedant nuo 98 °C temperatūros pirmajam ciklui, tada kiekvienam ciklui mažinant po 2 °C
  - Laikykite 90 minučių tinkamoje temperatūroje:
    - [gDNR, išskirta iš FFPE] 58 °C
    - [80 mer. zondų skydeliai] 58 °C
    - [Somatinių variantų priskyrimas] 58 °C
    - [Visi kiti] 62 °C

Bendra vykdymo trukmė yra ~115 minučių.

3 lent. Ciklų skaičius vienam mėginiui ar skydeliui

Mėginio ir skydelio tipas	Ciklų skaičius (X)
gDNR, išskirta iš FFPE (nepaisant skydelio tipo)	20
80 mer. zondų skydeliai (nepaisant mėginio tipo)	20
Somatinių variantų priskyrimas	20
Visi kiti mėginiai ir skydeliai	18

## Procedūra

1. **[Aukštos kokybės gDNR]** Įlašinkite toliau nurodytus reagentus *nurodyta tvarka* į kiekvieną sutelktą biblioteką PGR plokštelėje.  
Nesudarykite pagrindinio mišinio. Sudarius NHB2 ir EHB2 pagrindinį mišinį, neigiamai paveikiamas gausinimo našumas.
  - NHB2 (mėlynas dangtelis) (50 µl)
  - Gausinimo zondo skydelis (10 µl)
  - EHB2 (10 µl)
2. **[Aukštos kokybės gDNR]** Pipete, nustatyta iki 90 µl, pipetuokite kiekvieną šulinėlį 10 kartų, kad sumaišytumėte.
3. **[gDNR, išskirta iš FFPE]** Įlašinkite toliau nurodytus reagentus *nurodyta tvarka* į kiekvieną sutelktą biblioteką PGR plokštelėje.

Nesudarykite pagrindinio mišinio. Sudarius NHB2 ir EHB2 pagrindinį mišinį, neigiamai paveikiamas gausinimo našumas.

- NHB2 (mėlynas dangtelis) (12,5 µl)
  - Gausinimo zondo skydelis (2,5 µl)
  - EHB2 (2,5 µl)
4. [gDNR, išskirta iš FFPE] Pipete, nustatyta iki 20 µl, pipetuokite kiekvieną šulinėlį 10 kartų, kad sumaišytumėte.
  5. Užsandarinkite plokštelę ir 10 sekundžių centrifuguokite 280 × g.
  6. Padėkite mėginio plokštelę ant iš anksto užprogramuoto termociklerio ir vykdykite HYB programą.
  7. Pasibaigus HYB programos laikymo temperatūros laikui, nedelsdami pereikite prie kitos procedūros.



### DĖMESIO

Hibridizacijos reakcijos temperatūrai nukritus žemiau kambario temperatūros, susidaro nuosėdų.

## Hibridizuotų zondų fiksavimas

Atliekant šį veiksma, naudojamos streptavidino magnetinės granulės (angl. „Streptavidin Magnetic Beads“, SMB3), skirtos zondams, hibridizuotiems iki tikslinių dominančių regionų, užfiksuoti.

### Eksploatacinės medžiagos

- EEW (sustiprintas gausinimo plovimo buferinis tirpalas) (gelsvas dangtelis)
- EE1 (1 gausinimo eliuavimo buferinis tirpalas)
- ET2 (2 eliuavimo tikslinis buferinis tirpalas)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (streptavidino magnetinės granulės)
- 1,5 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlis
- 96 šulinėlių MIDI plokštelė
- 96 šulinėlių PGR plokštelė
- Lipnasis sandariklis
- MIDI plokštelės magnetinis stovas
- Pasiruošimas vėlesnei procedūrai
  - „Enhanced PCR Mix“ (sustiprintas PGR mišinys) (EPM)
  - „PCR Primer Cocktail“ (PGR pradinis mišinys) (PPC)



## Apie reagentus

- EEW
  - Pasirūpinkite, kad EEW būtų atšildytas iki kambario temperatūros bent 2 valandas prieš pašildymą mikromėginių inkubatoriuje.
  - Pasirūpinkite, kad EEW būtų šildomas mikromėginių inkubatoriuje 30 minučių iki HYB programos pabaigos.
  - Kai nenaudojate, EEW palikite mikromėginių inkubatoriuje. EEW turi likti pašildytas, kol bus vykdomas visas protokolas.
  - Pasiekus kambario temperatūrą, jis gali būti drumzlinas.
  - Gali tapti geltonos spalvos.
- SMB3
  - Prieš naudojant SMB3 turi būti kambario temperatūros.

## Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
SMB3	Nuo 2 iki 8 °C	Palikite 2 valandas, kol pasieks kambario temperatūrą. Apverskite ir išmaišykite, kol visiškai resuspenduosite.
EEW (gelsvas mėgintuvėlis)	Nuo –25 °C iki –15 °C	Po 2 valandų trukmės inkubavimo kambario temperatūroje pašildykite mikromėginių inkubatoriuje, kol pasieksite tinkamą hibridizaciją, ir išlaikykite šią temperatūrą 30 minučių iki HYB programos pabaigos.
EE1	Nuo –25 °C iki –15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje ir išmaišykite.
HP3	Nuo –25 °C iki –15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje ir išmaišykite.
ET2	Nuo 2 iki 8 °C	Palaukite, kol pasieks kambario temperatūrą. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.
EPM	Nuo –25 °C iki –15 °C	Atšildykite ant ledo vieną valandą. Apverskite, kad sumaišytumėte, tada trumpai centrifuguokite. Padėkite į šalį ant ledo.
PPC	Nuo –25 °C iki –15 °C	Atšildykite ant ledo vieną valandą. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. Padėkite į šalį ant ledo.

2. Pašildykite vieną mikromėginių inkubatorių su MIDI šilumos bloko įdėklą, kad inkubuotumėte mėginio plokštelę iki vienos iš toliau nurodytų temperatūrų. EEW pašildyti galima naudoti papildomą antrąjį mikromėginių inkubatorių. Padėkite EEW ant MIDI šilumos bloko įdėklo viršaus.

- [FFPE] 58 °C
- [80 mer. zondų skydeliams] 58 °C
- [Somatinių variantų priskyrimas] 58 °C
- [Visi kiti] 62 °C

## Procedūra

### Fiksavimas

1. Įlašinkite SMB3 į atitinkamą naujos MIDI plokštelės šulinėlį, kaip nurodyta toliau.
  - **[Aukštos kokybės gDNR]** Įlašinkite 250 µl SMB3.
  - **[gDNR, išskirta iš FFPE]** Įlašinkite 62,5 µl SMB3.
2. Pipete, nustatyta iki 100 µl, naudojant aukštos kokybės gDNR, arba 25 µl, naudojant FFPE, perkeltite kiekvieną sutelktą biblioteką iš 96 šulinėlių PGR plokštelės į atitinkamą naujos MIDI plokštelės šulinėlį.
3. Užsandarinkite plokštelę ir 4 minutes maišykite 1 200 suk./min. greičiu.
4. Jei turinys ištiško, trumpai centrifuguokite plokštelę.
5. Padėkite sutelktų bibliotekų plokštelę ant MIDI šilumos bloko įdėklo mikromėginių inkubatoriuje po EEW mėgintuvėliu, uždarykite dangtį ir inkubuokite 15 minučių tinkamoje temperatūroje.
  - [FFPE] 58 °C
  - [80 mer. zondo skydelis] 58 °C
  - [Somatinių variantų priskyrimas] 58 °C
  - [Visi kiti] 62 °C
6. Išimkite sutelktų bibliotekų plokštelę ir 30 sekundžių centrifuguokite 280 × g.
7. Nedelsdami padėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 minutes).
8. **[Aukštos kokybės gDNR]** Pipete, nustatyta iki 200 µl, pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą iš kiekvieno šulinėlio nepažeisdami granulių.
9. **[gDNR, išskirta iš FFPE]** Pipete, nustatyta iki 90 µl, pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą iš kiekvieno šulinėlio nepažeisdami granulių.
10. Pašalinkite ir išmeskite visą likusį supernatantą.

## Plovimas

1. Išimkite iš magnetinio stovo.
2. **[Aukštos kokybės gDNR]** Greitai išimkite EEW iš mikromėginių inkubatoriaus ir įlašinkite 200 µl į kiekvieną šulinėlį.
3. **[gDNR, išskirta iš FFPE]** Greitai išimkite EEW iš mikromėginių inkubatoriaus ir įlašinkite 50 µl į kiekvieną šulinėlį.
4. Nepanaudotą EEW vėl įdėkite į mikromėginių inkubatorių ir laikykite šildomą.
5. Užsandarinkite ir 4 minutes maišykite 1 800 suk./min. greičiu.
6. Padėkite mėginio plokštelę ant MIDI šilumos bloko įdėklo mikromėginių inkubatoriuje po EEW mėgintuvėliu, uždarykite dangtį ir inkubuokite 5 minutes tinkamoje temperatūroje:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80 mer. zondų skydeliai] 58 °C
  - [Somatinių variantų priskyrimas] 58 °C
  - [Visi kiti skydeliai] 62 °C
7. Nedelsdami padėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 minutes).
8. Pipete, nustatyta iki 200 µl, naudojant aukštos kokybės gDNR, arba 50 µl, naudojant FFPE, pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą iš kiekvieno šulinėlio.
9. Pakartokite 1–8 veiksmus du kartus ir iš viso atlikite tris plovimo procedūras.

## Plovimo tirpalo perkėlimas

1. Išimkite iš magnetinio stovo.
2. **[Aukštos kokybės gDNR]** Greitai išimkite EEW iš mikromėginių inkubatoriaus ir įlašinkite 200 µl į kiekvieną šulinėlį.
3. **[gDNR, išskirta iš FFPE]** Greitai išimkite EEW iš mikromėginių inkubatoriaus ir įlašinkite 50 µl į kiekvieną šulinėlį.
4. Užsandarinkite ir 4 minutes maišykite 1 800 suk./min. greičiu. Jei turinys ištiško, sumažinkite greitį iki 1 600 suk./min.
5. Perkelkite resuspenduotą granuliuotą tirpalą į naują MIDI plokštelę. Šulinėliuose gali likti mėginių.



### DĖMESIO

Perkeliant reagentą, sumažinama likutinių reagentų, kurie gali slopinti tolesnį PGR apdorojimą, pernaša.

6. Padėkite mėginio plokštelę ant MIDI šilumos bloko įdėklo mikromėginių inkubatoriuje, uždarykite dangtį ir inkubuokite 5 minutes tinkamoje temperatūroje:

- [FFPE] 58 °C
  - [80 mer. zondų skydeliai] 58 °C
  - [Somatinių variantų priskyrimas] 58 °C
  - [Visi kiti] 62 °C
7. Nedelsdami padėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 minutes).
  8. Pipete, nustatyta iki 200 µl, naudojant aukštos kokybės gDNR, arba 50 µl, naudojant FFPE, pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą iš kiekvieno šulinėlio.
  9. Centrifuguokite plokštelę 30 sekundžių 280 × g.
  10. Padėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaikykite 10 sekundžių.
  11. Naudodami 20 µl pipetę, pašalinkite ir išmeskite likusį skystį iš kiekvieno šulinėlio.
  12. Nedelsdami pereikite prie veiksmo [Eliuavimas 44 psl.](#), kad granulės pernelyg stipriai neišdžiūtų ir neprarastumėte bibliotekos kiekio.

## Eliuavimas

1. Sumaišykite toliau nurodytus tūrius, kad paruoštumėte eliuavimo pagrindinį mišinį. Kiekvieną tūrį padauginkite iš apdorojamų sutelktų bibliotekų skaičiaus.
  - EE1 (28,5 µl)
  - HP3 (1,5 µl)Papildomas reagentų paviršius į tūrį įtrauktas.
2. Išmaišykite ir tada trumpai centrifuguokite.
3. Išimkite MIDI plokštelę iš magnetinio stovo.
4. Įlašinkite 23 µl eliuavimo pagrindinio mišinio į kiekvieną šulinėlį.
5. Užsandarinkite plokštelę ir 2 minutes maišykite 1 800 sūk./min. greičiu.
6. Inkubuokite plokštelę kambario temperatūroje 2 minutes.
7. Centrifuguokite 30 sekundžių 280 × g.
8. Padėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 minutes).
9. Perkelkite 21 µl supernatanto iš MIDI plokštelės į atitinkamą naujos 96 šulinėlių PGR plokštelės šulinėlį.
10. Išmeskite MIDI plokštelę.
11. Įlašinkite 4 µl ET2 į kiekvieną šulinėlį, kuriame yra 21 µl supernatanto.
12. Nustatykite pipetę iki 20 µl ir 10 kartų lėtai pipetuokite kiekvieną šulinėlį, kad išmaišytumėte.
13. Užsandarinkite plokštelę ir 10 sekundžių centrifuguokite 280 × g.
14. Inkubuokite plokštelę 1 minutę kambario temperatūroje.

## Gausintos bibliotekos amplifikavimas

Atliekant šį veiksma, gausintai bibliotekai amplifikuoti naudojama PGR.

### Eksploatacinės medžiagos

- EPM (sustiprintas PGR mišinys)
- PPC (PGR pradinis mišinys)
- Lipnasis sandariklis

### Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
EPM	Nuo -25 °C iki -15 °C	Atšildykite 4 °C temperatūroje arba laikykite ant ledo vieną valandą. Apverskite, kad sumaišytumėte, tada trumpai centrifuguokite. Padėkite į šalį ant ledo.
PPC	Nuo -25 °C iki -15 °C	Atšildykite 4 °C temperatūroje ant ledo vieną valandą. Išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. Padėkite į šalį ant ledo.

2. Įrašykite toliau nurodytą AMP programą į termociklerį, naudodami atitinkamą PGR ciklą, nurodytų toliau pateiktoje lentelėje, skaičių.
  - Pasirinkite iš anksto pašildyto dangčio parinktį ir nustatykite 100 °C
  - Nustatykite 50 µl reakcijos tūrio vertę
  - 98 °C 45 sekundes
  - (X) ciklą:
    - 98 °C 30 sekundžių
    - 60 °C 30 sekundžių
    - 72°C 30 sekundžių
  - 72 °C 5 minutes
  - Laikykite 10 °C temperatūrojeBendra vykdymo trukmė yra ~35 minutės.

Mėginio ir skydelio tipas	(X) Ciklai
FPPE	14
„Illumina“ egzomų skydelis (CEX), skirtas aukštos kokybės gDNR	10
„Illumina“ egzomų skydelis (CEX), skirtas FFPE	12
Visi kiti mėginiai ir skydeliai	12 <sup>1234</sup>

<sup>1</sup> Naudojant mažus trečiųjų šalių skydelius, iki vélesnio optimizavimo galima koreguoti ne daugiau nei 15 ciklų.

Naudojant FFPE, ciklų skaičių galima koreguoti iki 17.

<sup>2</sup> Naudojant trečiųjų šalių skydelius, turinčius tik 500 zondų, galima koreguoti ne daugiau nei 17 ciklų. Naudojant FFPE, ciklų skaičių galima koreguoti iki 19.

<sup>3</sup> Naudojant FFPE mėginius, galima koreguoti ne daugiau nei 14 ciklų.

<sup>4</sup> Naudojant FFPE mėginius, PGR ciklų skaičiaus didinimas gali lemti didesnį pasikartojimų dažnį ir mažesnius fragmentų dydžius.

## Procedūra

1. Įlašinkite 5 µl PPC į kiekvieną šulinėlį.
2. Įlašinkite 20 µl EPM į kiekvieną šulinėlį.
3. Užsandarinkite plokštelę ir 1 minutę maišykite 1 200 sūk./min. greičiu.
4. Centrifuguokite plokštelę 10 sekundžių 280 × g.
5. Padėkite ant iš anksto užprogramuoto termociklerio ir vykdykite AMP programą.

## SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, laikykite nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje ne ilgiau nei dvi dienas. Arba palikite termocikleryje ne ilgiau nei 24 valandoms.

## Amplifikuotos gausintos bibliotekos valymas

Atliekant šį veiksma naudojami valymo granulės, skirtos gausintai bibliotekai išgryninti ir nepageidaujamiems produktams pašalinti.

## Eksploatacinės medžiagos

- CB (valymo granulės)
- RSB (resuspensijos buferinis tirpalas)
- Šviežiai paruoštas 80 % etanolis (EtOH)
- Lipnieji sandarikliai
- 96 šulinėlių MIDI plokštelė
- 96 šulinėlių PGR plokštelė
- MIDI plokštelės magnetinis stovas

## Apie reagentus

- Valymo granulės
  - Prieš naudodami kiekvieną kartą išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.
  - Dažnai išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, kad užtikrintumėte tolygų granulių pasiskirstymą.
  - Įsiurbkite ir dozuokite lėtai, nes tirpalas yra klampus.

## Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
CB	Kambario temperatūra	Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu ir apverskite, kad sumaišytumėte, kol skysčio spalva taps vienoda.
RSB	Nuo 2 °C iki 8 °C	Palaukite, kol pasieks kambario temperatūrą. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.

2. Paruoškite šviežią 80 % EtOH iš absoliutaus etanolio.

## Procedūra

1. Centrifuguokite PGR plokštelę 10 sekundžių 280 × g.
2. CB 3 kartus po 10 sekundžių maišykite sūkuriniu maišytuvu, tada apverskite.
3. Įlašinkite 40,5 µl CB į kiekvieną naujos **MIDI** plokštelės šulinėlį.
4. Perkelkite 45 µl iš kiekvieno PGR plokštelės šulinėlio į atitinkamą MIDI plokštelės šulinėlį.
5. Užsandarinkite plokštelę ir 1 minutę maišykite 1 800 suk./min. greičiu.
6. Inkubuokite MIDI plokštelę kambario temperatūroje 5 minutes.
7. Centrifuguokite 10 sekundžių 280 × g.
8. Padėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (5 minutes).
9. Pipete, nustatyta iki 95 µl, pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą iš kiekvieno šulinėlio.
10. Išplaukite du kartus, kaip nurodyta toliau.
  - a. Plokštei esant ant magnetinio stovo, nemišydami įlašinkite 200 µl šviežio 80 % EtOH.
  - b. Inkubuokite 30 sekundžių.
  - c. Nepažeisdami granulių, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
11. Džiovinkite ore ant magnetinio stovo 5 minutes.
12. Džiovindami ore ir naudodami 20 µl pipetę, pašalinkite ir išmeskite likusį EtOH iš kiekvieno šulinėlio.
13. Išimkite iš magnetinio stovo ir įlašinkite 32 µl RSB į kiekvieną šulinėlį.
14. Užsandarinkite plokštelę ir 1 minutę maišykite 1 800 suk./min. greičiu.
15. Inkubuokite plokštelę kambario temperatūroje 5 minutes.
16. Centrifuguokite 10 sekundžių 280 × g.

17. Padėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 minutes).
18. Perkelkite 30 µl supernatanto iš 96 šulinėlių MIDI plokštelės į atitinkamą naujos PGR plokštelės šulinėlį.
19. Išmeskite MIDI plokštelę.

#### **SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS**

Jei norite sustoti, sandariai uždarykite plokštelę ir laikykite ją nuo –25 °C iki –15 °C temperatūroje ne ilgiau nei 7 dienas.

## **Gausintų bibliotekų patikra**

Norėdami kiekybiškai nustatyti dviejų gijų gDNR įvestį, naudokite fluorescencija pagrįstą metodą, su kuriuo naudojami interkaliuojami dažai. Nenaudokite metodų, kuriais matuojama bendra nukleorūgštis, pvz., „NanoDrop“ ar kitų UV absorbcijos metodų.

1. Naudodami pasirinktą kiekybinio nustatymo metodą, tirkite 1 µl gausintų bibliotekų.

**PASTABA** Bendras zondo moliškumas proporcingai veikia bibliotekos kiekį po gausinimo.

Tikėtinas vidutinis fragmento dydis yra 125–235 bp, o šių dydžių DNR fragmentų pasiskirstymas svyruoja nuo ~200 bp iki ~1 000 bp.



## Bibliotekų atskiedimas iki pradinės koncentracijos

Atliekant šį veiksma, bibliotekos atskiedžiamos iki pradinės jūsų sekos nustatymo sistemos koncentracijos ir tai yra pirmasis nuosekliojo skiedimo veiksmas. Atskiedus iki pradinės koncentracijos, bibliotekos yra paruoštos denatūruoti ir atskiesti iki galutinės įkėlimo koncentracijos.

Nepaisant naudojamo gausinimo zondo skydelio, atliekant sekos nustatymą „Illumina“ rekomenduoja nustatyti pagal galą suporuotą seriją su 151 ciklu per nuskaitymą (2 × 151) ir 10 ciklų per indekso nuskaitymą. Jei norite, kad būtų mažiau persidengiančių nuskaitymų arba mažesnė pirminė aprėptis, galite nustatyti seką iki 2 × 126 arba 2 × 101.

1. Apskaičiuokite bibliotekos arba sutelktų bibliotekų moliškumo vertę, naudodami toliau pateiktą formulę.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{vidutinis bibliotekos dydis (bp)}} = \text{Moliškumas (nM)}$$

Pavyzdžiui, jei jūsų bibliotekos koncentracija yra 20 ng/μl, o vidutinis dydis yra 350 bp, gauta moliškumo vertė bus 86,58 nM.

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

2. Naudodami moliškumo vertę, apskaičiuokite RSB ir bibliotekos tūrius, reikalingus skiedžiant bibliotekas iki pradinės jūsų sistemos koncentracijos.

Sekos nustatymo sistema	Minimalus reikalingas bibliotekos tūris (μl)	Pradinė koncentracija (nM)	Galutinė įkėlimo koncentracija (pM)
„NextSeq 550Dx“	10	2	1,2
„MiSeqDx“	5	4	11
„NovaSeq 6000Dx“	150 (S2) arba 310 (S4)	1,75	350

[„NovaSeq 6000Dx“] 1,75 nM yra pradinė koncentracija norint gauti galutinę 350 pM įkėlimo koncentraciją. Jei reikia, pakoreguokite galutinę įkėlimo koncentraciją naudodami toliau nurodytą lentelę.

Galutinė įkėlimo koncentracija (pM)	Sutelktos bibliotekos koncentracija (nM)
100	0,50
150	0,75

Galutinė įkėlimo koncentracija (pM)	Sutelktos bibliotekos koncentracija (nM)
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Atskieskite bibliotekas naudodami RSB:

- **Bibliotekos, kiekybiškai nustatytos kaip multipleksinis bibliotekų telkinys**,– atskieskite telkinį iki pradinės savo sistemos koncentracijos.
- **Bibliotekos, kiekybiškai nustatytos atskirai**,– atskieskite kiekvieną biblioteką iki pradinės savo sistemos koncentracijos. Įlašinkite 10 µl kiekvienos atskiestos bibliotekos į mėgintuvėlį, kad sudarytumėte multipleksinį bibliotekų telkinį.

4. Vykdydami savo sistemos denatūravimo ir skiedimo instrukcijas, atskieskite iki galutinės įkėlimo koncentracijos.

- Jei naudojate „NextSeq 550Dx“ sistemą, žr. skyrių „[NextSeq 550Dx“ sekos nustatymo paruošimas 50 psl.](#)
- Jei naudojate „MiSeqDx“ sistemą, žr. skyrių „[MiSeqDx“ sekos nustatymo paruošimas 52 psl.](#)
- Jei naudojate „NovaSeq 6000Dx“ sistemą, žr. skyrių „[NovaSeq 6000Dx“ sekos nustatymo paruošimas 53 psl.](#)

Galutinės įkėlimo koncentracijos yra pradinis taškas ir bendroji gairė. Optimizuokite savo darbo eigos ir kiekybinio nustatymo metodo koncentracijas per vėlesnius sekos nustatymo vykdymus arba atlikdami pratekamosios kiuvetės titravimą.

## „NextSeq 550Dx“ sekos nustatymo paruošimas

Naudokite toliau pateiktas bibliotekų denatūravimo ir atskiedimo instrukcijas, kad nustatytumėte seką „NextSeq 550Dx“ sekos nustatymo sistemoje.

### Eksploatacinės medžiagos

- HT1 (hibridizacijos buferinis tirpalas)
- 1N NaOH
- 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

## Paruošimas

Paruoškite šviežią 0,2N NaOH skiedinį, kad galėtumėte denatūruoti bibliotekas sekoms nustatyti. Kad nedidelės pipetavimo klaidos neigiamai nepaveiktų galutinės NaOH koncentracijos, paruošiamas papildomas tūris.



### DĖMESIO

Šviežiai atskiestas 0,2N NaOH yra esminė denatūravimo proceso dalis. Netinkamai denatūravus gali sumažėti kiekis.

1. Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje sumaišykite toliau nurodytus tūrius ir atskieskite 1N NaOH iki 0,2N NaOH:
1. Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
HT1	Nuo -25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Laikykite nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje, kol būsite pasiruošę atskiesti denatūruotas bibliotekas.

2. Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje sumaišykite toliau nurodytus tūrius ir paruoškite šviežią NaOH skiedinį.
  - Laboratorinis vanduo (800 µl)
  - 1N NaOH (200 µl)Rezultatas – 1 ml 0,2N NaOH.
3. Mėgintuvėlį keletą kartų apverskite, kad susimaišytų.
4. Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje sumaišykite toliau nurodytus tūrius ir paruoškite 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.
  - Laboratorinis vanduo (800 µl)
  - 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)Rezultatas – 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

**PASTABA** Mėgintuvėlį laikykite uždengtą. Šviežią skiedinį sunaudokite per **12 valandų**.

## Bibliotekų denatūravimas

1. Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje sumaišykite toliau nurodytus bibliotekos ir šviežiai atskiesto 0,2N NaOH tūrius.
  - 10 µl biblioteka
  - 10 µl 0,2N NaOH
2. Trumpai išmaišykite ir 1 minutę centrifuguokite 280 × g.
3. Inkubuokite kambario temperatūroje 5 minutes.
4. Įlašinkite 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

## Denatūruotų bibliotekų atskiedimas iki 20 pM

- Į denatūruotų bibliotekų mėgintuvėlį įlašinkite 970 µl iš anksto atšaldyto HT1.  
Rezultatas – 20 pM denatūruota biblioteka.
- Trumpai išmaišykite ir 1 minutę centrifuguokite 280 × g.
- 20 pM bibliotekas padėkite ant ledo, kol būsite pasiruošę pereiti prie galutinio skiedimo.

## Bibliotekų atskiedimas iki įkėlimo koncentracijos

- Įlašinkite toliau nurodytus tūrius, kad atskiestumėte denatūruotas 20 pM bibliotekos tirpalą iki 1,2 pM.
  - Denatūruotos bibliotekos tirpalas (78 µl)
  - Iš anksto atšaldytas HT1 (1 222 µl)Bendras tūris yra 1,3 ml, esant 1,2 pM.
- Apverskite, kad sumaišytumėte, o tada centrifuguokite impulsais.
- Pereikite prie sekos nustatymo. Instrukcijų ieškokite prietaiso „NextSeq 550Dx“ informaciniame vadove (dokumento Nr. 1000000009513).

## „MiSeqDx“ sekos nustatymo paruošimas

Naudokite toliau pateiktas bibliotekų denatūravimo ir atskiedimo instrukcijas, kad nustatytumėte seką „MiSeqDx“ sekos nustatymo sistemoje.

### Eksploatacinės medžiagos

- HT1 (hibridizacijos buferinis tirpalas)
- 1N NaOH

### Paruošimas

Paruoškite *šviežią* 0,2N NaOH skiedinį, kad galėtumėte denatūruoti bibliotekas sekoms nustatyti. Kad nedidelės pipetavimo klaidos neigiamai nepaveiktų galutinės NaOH koncentracijos, paruošiamas papildomas tūris.



#### DĖMESIO

Šviežiai atskiestas 0,2N NaOH yra esminė denatūravimo proceso dalis. Netinkamai denatūravus gali sumažėti kiekis.

- Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje sumaišykite toliau nurodytus tūrius ir atskieskite 1N NaOH iki 0,2N NaOH:
- Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
HT1	Nuo -25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Laikykite nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje, kol būsite pasiruošę atskiesti denatūruotas bibliotekas.

- Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje sumaišykite toliau nurodytus tūrius ir paruoškite šviežią NaOH skiedinį.
  - Laboratorinis vanduo (800 µl)
  - 1N NaOH (200 µl)
 Rezultatas – 1 ml 0,2N NaOH.

**PASTABA** Mėgintuvėlį laikykite uždengtą. Šviežią skiedinį sunaudokite per **12 valandų**.

#### 4 nM bibliotekos denatūravimas

- Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje sumaišykite toliau nurodytus tūrius.
  - 4 nM biblioteka (5 µl)
  - 0,2N NaOH (5 µl)
- Trumpai išmaišykite ir 1 minutę centrifuguokite 280 × g.
- Inkubuokite kambario temperatūroje 5 minutes.
- Į mėgintuvėlį, kuriame yra denatūruota biblioteka, įlašinkite 990 µl iš anksto atšaldyto HT1.  
Rezultatas – 1 ml 20 pM denatūruotos bibliotekos.

#### Denatūruotos 20 pM bibliotekos skiedimas

- Atskieskite iki norimos koncentracijos, naudodami toliau nurodytus tūrius.

Koncentracija	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
<b>20 pM biblioteka</b>	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
<b>Iš anksto atšaldytas HT1</b>	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- Apverskite, kad sumaišytumėte, o tada centrifuguokite impulsais.
- Pereikite prie sekos nustatymo. Instrukcijas žr. „MiSeqDx“ prietaiso informaciniame vadove, skirtame „MOS v4“ sistemai (dokumento Nr. 1000000157953).

## „NovaSeq 6000Dx“ sekos nustatymo paruošimas

Naudokite toliau pateiktas bibliotekų denatūravimo ir atskiedimo instrukcijas, kad nustatytumėte seką „NovaSeq 6000Dx“ sekos nustatymo sistemoje.

**Eksploatacinės medžiagos**

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (resuspensijos buferinis tirpalas)
- 1N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- „NovaSeq 6000Dx“ bibliotekos mėgintuvėlis

**Paruošimas**

Paruoškite *šviežią* 0,2N NaOH skiedinį, kad galėtumėte denatūruoti bibliotekas sekoms nustatyti. Kad nedidelės pipetavimo klaidos neigiamai nepaveiktų galutinės NaOH koncentracijos, paruošiamas papildomas tūris.

**DĖMESIO**

Šviežiai atskiestas 0,2N NaOH yra esminė denatūravimo proceso dalis. Netinkamai denatūravus gali sumažėti kiekis.

1. Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje sumaišykite toliau nurodytus tūrius ir atskieskite 1N NaOH iki 0,2N NaOH:

4 lent. S2 režimas

Reagentas	Vienos pratekamosios kiuvetės tūris (μl)	Dviejų pratekamųjų kiuvečių tūris (μl)
Laboratorinis vanduo	40	80
1N NaOH atsargos	10	20

Iš šių tūrių gaunama 50 μl 0,2N NaOH vienai pratekamajai kiuvetei arba 100 μl 0,2N NaOH dviem pratekamosioms kiuvetėms.

5 lent. S4 režimas

Reagentas	Vienos pratekamosios kiuvetės tūris (μl)	Dviejų pratekamųjų kiuvečių tūris (μl)
Laboratorinis vanduo	80	160
1N NaOH atsargos	20	40

Iš šių tūrių gaunama 100 μl 0,2N NaOH vienai pratekamajai kiuvetei arba 200 μl 0,2N NaOH dviem pratekamosioms kiuvetėms.

2. Keletą kartų apverskite ir išmaišykite arba kruopščiai išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.

**PASTABA** Mėgintuvėlį laikykite uždengtą. Šviežių skiedinį sunaudokite per **12 valandų**.

## Normalizuotos bibliotekos telkinio kūrimas

Įkėlimo koncentracija gali skirtis, atsižvelgiant į bibliotekos paruošimo, kiekybinio nustatymo ir normalizavimo metodus.

Vadovaudamiesi toliau pateiktomis instrukcijomis, normalizuokite bibliotekas iki atitinkamos koncentracijos ir tada sutelkite jas. Bibliotekas, kurių seka nustatoma toje pačioje pratekamojoje kiuvetėje, reikia sujungti į vieną normalizuotą telkinį.

**PASTABA** Maksimalus skaičius mėginių, kuriuos galima tirti linijoje su „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit“, yra 192. Šį apribojimą lemia bendras UD indeksų A ir B rinkiniuose skaičius.

## Telkti ketinamų bibliotekų normalizavimas

- Nustatykite reikiamą telkiamos bibliotekos koncentraciją, atsižvelgdami į norimą galutinę įkėlimo koncentraciją.
  - Norint gauti galutinę 350 pM įkėlimo koncentraciją, reikalinga telkiamos bibliotekos koncentracija yra 1,75 nM.
  - Norėdami nustatyti telkiamos bibliotekos koncentraciją skirtingai galutinei įkėlimo koncentracijai gauti, žr. skyrių [Bibliotekų atskiedimas iki pradinės koncentracijos 49 psl.](#)
- Normalizuokite bibliotekas iki norimos telkiamos bibliotekos koncentracijos, naudodami 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.  
Jei reikia pagalbos skiedžiant bibliotekas iki atitinkamos koncentracijos, žr. skyrių [Telkimo skaičiuotuvą](#) „Illumina“ svetainėje.

### Rekomenduojamos įkėlimo koncentracijos

Optimali DNR įkėlimo koncentracija priklauso nuo bibliotekos tipo ir įdėklo dydžio. Naudojant > 450 bp bibliotekas, gali reikėti didesnių įkėlimo koncentracijų.

## Normalizuotų bibliotekų telkimas ir papildomos „PhiX“ kontrolės pridėjimas

- Naujame mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje sumaišykite atitinkamą kiekvienos normalizuotos bibliotekos tūrį, kad būtų gautas vienas iš toliau nurodytų galutinių tūrių.

Režimas	Galutinis tūris (μl)
S2	150
S4	310

- [Pasirinktinai]** Pridėkite 1 % nedenatūruotos „PhiX“, kaip nurodyta toliau.
  - Atskieskite 10 nM „PhiX“ iki 2,5 nM, naudodami 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.

b. Įlašinkite atitinkamą tūrį nedenatūruotos 2,5 nM „PhiX“ į nedenatūruotas bibliotekos telkinio mėgintuvėlį.

Režimas	Nedenatūruota 2,5 nM „PhiX“ (µl)	Nedenatūruotos bibliotekos telkinys (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Pridedant „PhiX“, 1 % yra rekomenduojamas kiekis gerai subalansuotoms bibliotekoms užtikrinti. Naudojant mažesnės įvairovės bibliotekas, gali reikėti daugiau. Norėdami naudoti „PhiX“ kontrolę su mažos įvairovės bibliotekomis, rekomendacijų kreipkitės į „Illumina“ techninės priežiūros skyrių.

### Bibliotekos telkinio denatūravimas ir papildoma „PhiX“ kontrolė

1. Įlašinkite 0,2N NaOH į nedenatūruotas bibliotekos telkinio ir papildomos „PhiX“ mėgintuvėlį, kaip nurodyta toliau.

Pratekamoji kiuvetė	0,2N NaOH	Nedenatūruotos bibliotekos telkinys (µl)	Gautas tūris
S2	37	150	187 µl arba 187,9 µl su „PhiX“
S4	77	310	387 µl arba 388,9 µl su „PhiX“

- Uždenkite ir trumpai išmaišykite.
- Centrifuguokite ne ilgiau nei 1 minutę 280 × g.
- Inkubuokite kambario temperatūroje 8 minutes, kad denatūruotumėte.
- Įlašinkite 400 mM Tris-HCl, pH 8,0, kaip nurodyta toliau, kad neutralizuotumėte.

Režimas	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Gautas tūris
S2	38	225 µl arba 225,9 µl su „PhiX“
S4	78	465 µl arba 466,9 µl su „PhiX“

- Uždenkite ir trumpai išmaišykite.
- Centrifuguokite ne ilgiau nei 1 minutę 280 × g.
- Perkelkite visą denatūruotas bibliotekas arba denatūruotas bibliotekas ir „PhiX“ tūrį į „NovaSeq 6000Dx“ bibliotekos mėgintuvėlį.
- Pereikite prie sekos nustatymo. Instrukcijų ieškokite „NovaSeq 6000Dx“ prietaiso produkto dokumentuose (dokumento Nr. 200010105).



## Trikčių šalinimas

Darbo eigos triktims šalinti naudokitės toliau pateikta lentelė. Jei mėginio sekos nustatymo vykdymas arba bibliotekos paruošimas nepavyksta du kartus, gali reikėti atlikti papildomus trikčių šalinimo veiksmus. Kreipkitės į „Illumina“ techninės priežiūros skyrių.

Pastebėta triktis	Galima priežastis	Rekomenduojamas veiksmas
Sekos nustatymo vykdymas neatitinka vykdymo kokybės kontrolės specifikacijų	Naudotojo arba laboratorijos įrangos klaida tyrimo darbo eigoje	<p>Kvalifikuokite gausintas bibliotekas, kad užtikrintumėte atitinkamą bibliotekos kiekį ir fragmentų dydžių pasiskirstymą. Pakartokite bibliotekos paruošimo procedūrą nuo vieno iš toliau nurodytų veiksmų, atsižvelgdami į tai, kur įvyko įtariama naudojimo ar įrangos klaida. Jei to nežinote arba jei įvyko kitų klaidų, kreipkitės į „Illumina“ techninės priežiūros skyrių, kad būtų pašalintos vykdymo triktys.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Iš naujo nustatykite bibliotekų seką. Žr. skyrių „<a href="#">NextSeq 550Dx“ sekos nustatymo paruošimas 50 psl.</a>, „<a href="#">MiSeqDx“ sekos nustatymo paruošimas 52 psl.</a> arba „<a href="#">NovaSeq 6000Dx“ sekos nustatymo paruošimas 53 psl.</a></li> <li>Vėl atlikite bibliotekų gausinimą. Žr. skyrių <a href="#">Zondų hibridizacija 37 psl.</a></li> <li>Pradėkite bibliotekos paruošimo procedūrą nuo darbo eigos pradžios. Žr. skyrių <a href="#">Naudojimo instrukcijos 21 psl.</a></li> </ul>
	Prietaiso triktis	Kreipkitės į „Illumina“ techninės priežiūros skyrių.
Klaida, susijusi su FASTQ generavimu, arba bendra sekos nustatymo sistemos klaida (pvz., tinklo klaida, klaidos įkeliant / iškeliant reagentus ir pan.)	Programinės įrangos ar prietaiso triktis	<p>Žr. „<a href="#">Local Run Manager“ programinės įrangos vadovą (dokumento Nr. 100000002702)</a> dėl pagalbos generuojant FASTQ arba „<a href="#">NextSeq 550Dx“ prietaiso informacinį vadovą (dokumento Nr. 1000000009513)</a>, „<a href="#">MiSeqDx“ prietaiso informacinį vadovą, skirtą v. MOS (dokumento Nr. 1000000157953)</a>, arba „<a href="#">NovaSeq 6000Dx“ prietaiso produkto dokumentus (dokumento Nr. 200010105)</a>. Papildomos pagalbos kreipkitės į „Illumina“ techninės priežiūros skyrių.</p>

Pastebėta triktis	Galima priežastis	Rekomenduojamas veiksmas
DNR biblioteka nesugeneruoja pakankamo kiekio sekos nustatymui įkelti	Neįvykdyti mėginio įvesties reikalavimai	Užtikrinkite atitinkamą mėginio įvestį ir pakartokite bibliotekos paruošimo procedūrą. Žr. skyrių <a href="#">Mėginio įvesties rekomendacijos 18 psl.</a>
	Naudojimo ar įrangos klaida tyrimo darbo eigoje	Pakartokite bibliotekos paruošimo procedūrą nuo vieno iš toliau nurodytų veiksmų, atsižvelgdami į tai, kur įvyko įtariama naudojimo ar įrangos klaida. Jei to nežinote arba jei įvyko kitų klaidų, kreipkitės į „Illumina“ techninės priežiūros skyrių, kad būtų pašalintos vykdymo triktys.  <ul style="list-style-type: none"> <li>Iš naujo nustatykite bibliotekų seką. Žr. skyrių <a href="#">„NextSeq 550Dx“ sekos nustatymo paruošimas 50 psl.</a>, <a href="#">„MiSeqDx“ sekos nustatymo paruošimas 52 psl.</a> arba <a href="#">„NovaSeq 6000Dx“ sekos nustatymo paruošimas 53 psl.</a></li> <li>Vėl atlikite bibliotekų gausinimą. Žr. skyrių <a href="#">Zondų hibridizacija 37 psl.</a></li> <li>Pradėkite bibliotekos paruošimo procedūrą nuo darbo eigos pradžios. Žr. skyrių <a href="#">Naudojimo instrukcijos 21 psl.</a></li> </ul>
	Neįvykdyti gausinimo zondo skydelio reikalavimai	Pasirūpinkite atitinkamu gausinimo zondo skydeliu ir pakartokite bibliotekos paruošimo procedūrą. Žr. skyrių <a href="#">Gausinimo zondo skydelio reikalavimai 11 psl.</a>

## Veikimo charakteristikos

„DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ programos, skirtos „NovaSeq 6000Dx“, veikimo charakteristikos pateiktos „NovaSeq 6000Dx“ prietaiso pakuotės lapelyje (dokumento Nr. 200025276).

## Veikimas su visos sudėties egzomų skydeliais

Egzomų skydelio veikimas buvo ištirtas naudojant mažiausią (50 ng) ir didžiausią (1 000 ng) rekomenduojamą Coriell ląstelių linijos gDNR NA12878 įvestį su žinoma nustatyta tiesa genocitų linijos variantui („Coriell platinum genome“) aptikti. 1 egzomų skydelis (45 Mb) ir 2 egzomų skydelis (36,8 Mb) buvo naudojami kaip pavyzdiniai skydeliai. Per „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimą ištirti 24 techniniai replikatai, naudojant 1 egzomų skydelį (45 Mb) dviejose 12-pusio gausinimo reakcijose. 12 techninių replikatų tirti „Illumina DNA Prep with

Enrichment Dx“ tyrimu, naudojant 2 egzomų skydelį (36,8 Mb) vienoje 12-pusio gausinimo reakcijoje. „NextSeq 550Dx“ sekos nustatymo sistemoje nustatytos gausintų bibliotekų sekos naudojant „DNA GenerateFASTQ Dx“ „Local Run Manager“ modulį.

Toliau pateiktoje lentelėje parodytos vidutinės antrinio sekos nustatymo ir techninių replikatų, tirtų su kiekvienu skydeliu, variantų priskyrimo veiksmingumo metrikos vertės.

6 lent. Tyrimo veiksmingumas su dviem visos sudėties egzomų skydeliais

Skydelis	Unikalūs nuskaitymo gausinimas naudojant dėklą	Aprėpties vientisumas	Fragmento ilgio mediana	SNV atšaukimas <sup>1</sup>	SNV tikslumas <sup>2</sup>	Intarpo / iškritos atšaukimas <sup>1</sup>	Intarpo / iškritos tikslumas <sup>2</sup>
1 egzomų skydelis (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
2 egzomų skydelis (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

<sup>1</sup> Atšaukimas=teigiami / (teisingai teigiami + klaidingai neigiami)

<sup>2</sup> Tikslumas=teisingai teigiami / (teisingai teigiami + klaidingai teigiami)

## Aptikimo riba

Aptikimo ribai ištirti naudotas „Horizon HD799“ DNR pamatinis etalonas. HD799 sudaro vidutiniškai pažeista formalinu apdorota DNR su žinomais vieno nukleotido variantais (angl. „single nucleotide variants“, SNV), kai alelinis dažnis svyruoja tarp 1–24,5 %. Buvo naudota mažiausia rekomenduojama DNR įvestis (50 ng) ir įvertintas SNV aptikimo greitis esant  $\geq 5,0$  % varianto alelio dažnumui (VAF). Taikant FFPE darbo eigą, „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimu tirta 16 techninių replikatų, gausintų viso vėžio 16-usio (1-pusio) gausinimo skydeliu (1,94 Mb), tada nustatytos jų sekos „NextSeq 550Dx“ prietaise naudojant „DNA GenerateFASTQ Dx“ modulį.

Visi mėginiai atitiko konkretaus skydelio mėginio veiksmingumo reikalavimus, kaip pavaizduota toliau pateiktoje lentelėje.

7 lent. Aptikimo ribos mėginio veiksmingumas

Skydelis	SNV su $\geq 5,0$ % VAF varianto aptikimo dažnis	Vidutinis Aprėpties vientisumas
Viso vėžio gausinimo skydelis (1,94 Mb, 523 genai)	100 %	99 %

## Trukdančiosios medžiagos

Potencialių trukdančiųjų medžiagų poveikis įvertintas „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimu, analizuojant tyrimo veiksmingumą esant trukdančiosioms medžiagoms.

### Trukdžiai visos sudėties kraujo mėginyje

Acetaminofenas (egzogeninis junginys, vaistas), kreatininas ir trigliceridai (endogeniniai metabolitai) buvo ištirti į juos pridėjus žmogaus visos sudėties kraujo mėginių prieš DNR išskyrimą. Siekiant įvertinti trukdžius, atsirandančius imant kraują (trumpas ėmimas), į visos sudėties kraujo mėginius taip pat buvo pridėta EDTA. Be to, siekiant įvertinti trukdžius, atsirandančius ruošiant mėginį, į DNR, išskirtą iš visos sudėties kraujo, buvo pridėta molekulinio etanolio.

Toliau pateiktoje lentelėje parodytos tirtos koncentracijos vienai trukdančiai medžiagai.

8 lent. Potencialiai trukdančios medžiagos ir jų koncentracijos, ištirtos visos sudėties kraujo mėginyje

Tiriama medžiaga	Tirta koncentracija
Acetaminofenas	15,6 mg/dl* Tris kartus didesnė už didžiausią koncentraciją, tikėtiną po terapinės vaisto dozės.
Kreatininas	15 mg/dl* Didžiausia nustatyta koncentracija populiacijoje.
Trigliceridai	1,5 g/dl* Didžiausia nustatyta koncentracija populiacijoje.
EDTA	6 mg/ml Tris kartus didesnė už koncentraciją, tikėtiną kraujo mėginiuose, paimtuose į EDTA mėgintuvėlius.
Molekulinis etanolis	15 % v/v Eliuate po DNR išskyrimo.

\* Pagal CLSI EP37-ED1:2018

Su viena trukdančia medžiaga „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimu tirta 12 techninių replikatų, gausintų 1 egzomų skydeliu (45 Mb) per atskirą (12-pusį) gausinimą, tada nustatytos jų sekos „NextSeq 550Dx“ prietaise naudojant „DNA GenerateFASTQ Dx“ modulį.

Visi 12 tirtų medžiagų mėginių atitiko mėginio veiksmingumo reikalavimus ir nebuvo pastebėta jokie jų poveikio tyrimo veiksmingumui.

### Trukdžiai FFPE audinyje

Buvo tirti du kolorektalinių FFPE audinių mėginiai su hemoglobinu, kurio koncentracija 0,1 mg 10 µm FFPE sekcijoje, ir be jo, siekiant pavaizduoti blogiausio atvejo scenarijų, kai 50 % FFPE audinio mėginio yra užteršta dideliu hemoglobino kiekiu kraujyje. Mėginiai tirti „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimu, naudojant 1

viso vėžio gausinimo skydelį (1,94 Mb) kaip pavyzdinį vienpusio gausinimo skydelį. Tada „NextSeq 550Dx“ prietaise nustatytos gausintų bibliotekų sekos naudojant „DNA GenerateFASTQ Dx“ modulį. Visi mėginiai atitiko mėginio veiksmingumo reikalavimus ir buvo parodyta, kad hemoglobinas netrukdo tyrimo veiksmingumui.

Siekiant įvertinti trukdžius, atsirandančius ruošiant mėginį, į DNR, išskirtą iš šlapimo pūslės vėžio paveikto FFPE audinio mėginio, buvo pridėti du egzogeniniai junginiai. Tirtos egzogeninės medžiagos yra išskyrimo tirpalai, dažniausiai naudojami per DNR išskyrimo procesą. Šios medžiagos ir tirti jų kiekiai nurodyti toliau pateiktoje lentelėje.

Tiriamų medžiagų tirpalai komerciškai prieinami stulpelio pagrindo DNR atskyrimo rinkiniuose.

9 lent. Potencialiai trukdančios egzogeninės medžiagos ir jų koncentracijos, ištirtos FFPE audinyje

Tiriama medžiaga	Tirta koncentracija (µl / 30 µl eliuato)
Deparafinizavimo tirpalas	113 x 10 <sup>-6</sup>
Plovimo buferinis tirpalas AW2	0,417

Su viena trukdančia medžiaga „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimu tirti aštuoni techniniai replikatai, gausinti viso vėžio vienpusio gausinimo skydeliu (1,94 Mb), tada nustatytos jų sekos „NextSeq 550Dx“ prietaise naudojant „DNA GenerateFASTQ Dx“ modulį.

Visi aštuoni abiejų tirtų medžiagų mėginiai atitiko mėginio veiksmingumo reikalavimus ir nebuvo pastebėta jokio jų poveikio tyrimo veiksmingumui.

## Kryžminė tarša

Coriell ląstelių linijos gDNR NA12878 (moteriškos lyties, 10 mėginių), Coriell ląstelių linijos gDNR NA12877 (vyriškos lyties, 12 mėginių) ir neigiami kontroliniai mėginiai (NTC, 2 mėginiai) buvo ištirti „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimu naudojant šachmatų lentos išdėstymą. Su visais mėginiais naudota didžiausios (1 000 ng) gDNR įvesties rekomendacija kaip griežčiausia mėginio kryžminės taršos vertinimo sąlyga. Tyrimas atliktas du kartus dviejų atskirų operatorių. Buvo naudotas 1 egzomų skydelis (45 Mb) per 12-pusio gausinimo reakcijas. „NextSeq 550Dx“ prietaise nustatytos gausintų bibliotekų sekos naudojant „DNA GenerateFASTQ Dx“. Vertinimas atliktas išanalizavus vyriškos lyties specifinės Y chromosomos aprėptį moteriškos lyties mėginiuose, lyginant su foniniais visos moteriškos lyties mėginių plokštelės lygiais bei NTC mėginių indekso vaizdu.

10 lent. Kryžminės taršos rezultatai

Moteriškos lyties mėginiai su vyriškos lyties Y chromosomų aprėptimi esant < 3x baziniam triukšmui	NTC indekso vaizdas
100 %	< 0,0005 %

## Priedas: „Illumina“ UD indekso adapterio sekos

Šie unikalaus dvigubo (UD) indekso adapteriai plokštelėje išdėstyti taip, kad būtų laikomasi rekomenduojamos poravimo strategijos. Indekso adapteriai yra 10 bazių ilgio, o ne įprasto aštuonių bazių ilgio.

### 1 (i7) indekso adapteriai

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

### 2 (i5) indekso adapteriai

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Toliau nurodyta seka naudojama 1 nuskaitymo ir 2 nuskaitymo adapterio pradžiai / pabaigai koreguoti.

CTGTCTCTTATACACATCT

## A plokštelės / 1 rinkinio indekso adapteriai

Indekso pavadinimas	i7 bazės adapteryje	i5 bazės adapteryje
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG

Indekso pavadinimas	i7 bazės adapteryje	i5 bazės adapteryje
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACC GCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG

Indekso pavadinimas	i7 bazės adapteryje	i5 bazės adapteryje
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGCACTAATG	TGACTACATA



Indekso pavadinimas	i7 bazės adapteryje	i5 bazės adapteryje
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGGT	CTCATAGCGA
UDP0083	GTAAGGCATA	AGACACATTA
UDP0084	GTCCACTTGT	GCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	CATGAGTACT
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	CATGTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGAAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

## B plokštelės / 2 rinkinio indekso adapteriai

Indekso pavadinimas	i7 bazės adapteryje	i5 bazės adapteryje
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT

Indekso pavadinimas	i7 bazės adapteryje	i5 bazės adapteryje
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGC GTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	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

Indekso pavadinimas	i7 bazės adapteryje	i5 bazės adapteryje
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	TATAGATTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA

Indekso pavadinimas	i7 bazės adapteryje	i5 bazės adapteryje
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	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

## Keitimo istorija

Dokumentas	Data	Keitimo aprašas
Dokumento Nr. 200019584 v02	2022 m. rugsėjo mėn.	Pridėta turinio apie sekos nustatymą naudojant „NovaSeq 6000Dx“ prietaisą.
Dokumento Nr. 200019584 v01	2022 m. gegužė	Pridėti sekos nustatymo sistemų pavadinimai ir katalogo numeriai. Pašalinta atskiro indeksavimo bibliotekų unikalios dvigubo indeksavimo informacija.
Dokumento Nr. 200019584 v00	2022 m. gegužė	Pirmasis leidimas.

## Patentai ir prekių ženklai

Šis dokumentas ir jo turinys priklauso „Illumina, Inc.“ ir jos filialams („Illumina“), jis skirtas tik klientui naudoti pagal sutartį, kiek tai susiję su čia aprašyto (-ų) produkto (-ų) naudojimu, ir jokių kitu tikslu. Šis dokumentas ir jo turinys negali būti naudojami ar platinami jokių kitu tikslu ir (arba) kitaip negali būti pateikiami, atskleidžiami ar atkuriami kokiu nors būdu be išankstinio rašytinio „Illumina“ sutikimo. „Illumina“ šiuo dokumentu neperduoda jokios trečiosios šalies licencijos pagal jos patentą, prekės ženklą, autorių teises, bendras teises nei panašių teisių.

Kvalifikuotas ir tinkamai išmokytas personalas turi griežtai ir aiškiai vadovautis šiame dokumente pateiktomis instrukcijomis, kad būtų užtikrintas tinkamas ir saugus šiame dokumente aprašyto (-ų) produkto (-ų) naudojimas. Prieš naudojant tokį (-ius) produktą (-us), visas šio dokumento turinys turi būti išsamiai perskaitytas ir suprastas.

JEI NEBUS PERSKAITYTOS VISOS ČIA PATEIKTOS INSTRUKCIJOS IR JOMIS NEBUS AIŠKIAI VADOVAJAMASI, GALIMAS PRODUKTO (-Ų) PAŽEIDIMAS, NAUDOTOJO BEI KITŲ ASMENŲ SUŽEIDIMAS IR ŽALA KITAI NUOSAVYBEI, BE TO, TAI PANAIKINA PRODUKTUI (-AMS) TAIKOMOS GARANTIJOS GALIOJIMĄ.

„ILLUMINA“ NEPRISIIMA JOKIOS ATSAKOMYBĖS, JEI ČIA APRAŠOMAS (-I) PRODUKTAS (-AI) (ĮSKAITANT DALIS IR PROGRAMINĘ ĮRANGĄ) NAUDOJAMAS (-I) NETINKAMAI.

© 2022 m. „Illumina, Inc.“. Visos teisės saugomos.

Visi prekių ženklai priklauso „Illumina, Inc.“ ar kitiems savininkams. Informacijos apie konkrečius prekių ženklus ieškokite adresu [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktinė informacija



„Illumina“

5200 Illumina Way

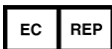
San Diego, California 92122 JAV

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (ne Šiaurės Amerikoje)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Nyderlandai

**Užsakovas Australijoje**

„Illumina Australia Pty Ltd“

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Australija

## **Gaminio ženklimas**

Visą informaciją apie simbolius, kurie yra ant gaminių pakuočių ir etikečių, rasite simbolių legendoje, pateiktoje svetainės [support.illumina.com](http://support.illumina.com) kortelėje *Documentation* (dokumentai), kurioje reikia pasirinkti savo rinkinį.