

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK
KUN TIL EKSPORT

Tiltenkt bruk

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit er et sett med reagenser og forbruksartikler som brukes til å klargjøre prøvebibliotek fra genomisk DNA hentet fra humane celler og vev. Brukerleverte probepanener er nødvendige for klargjøring av biblioteker rettet mot bestemte genomiske interesseområder. De genererte prøvebibliotekene er beregnet for bruk på Illumina-sekvenseringssystemer.

Prosedyreprinsipper

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er beregnet på klargjøring av DNA-sekvenseringsbiblioteker som er anrikt for målrettede regioner fra genomisk DNA avledet fra humane celler og humant vev.

Brukerleverte, biotinylerede oligonukleotidpanener er nødvendige for målanrikning. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med en rekke panelstørrelser, inkludert små panener (< 20 000 prober) til store panener (> 200 000 prober). De genererte anrikede bibliotekene er beregnet for sekvensering på Illumina-sekvenseringssystemene.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-prosedyren består av følgende trinn:

- **Tagmentere genomisk DNA** – Bruker Enrichment BLT Small (eBLTS) til å tagmentere DNA-innmatingen. Under tagmentering fragmenteres gDNA og merkes med adaptore i ett enkelt trinn. En minste DNA-innmating på 50 ng er nødvendig for å sette eBLTS i tagmenteringsreaksjonen. Når den er mettet, fragmenterer eBLTS et bestemt antall DNA-molekyler for å generere normaliserte biblioteker med konsekvent fragmentstørrelsesfordeling.
- **Rengjøring etter tagmentering** – Rengjør det adaptermerkede DNA-et på eBLTS som skal brukes i forsterkning.
- **Forsterke tagmentert DNA** – Forsterker det tagmenterte DNA-et ved hjelp av et PCR-program med begrenset syklus. Unike doble (UD)-indekser legges til i endene av DNA-fragmentene, som muliggjør dobbel unik strekkoding av DNA-bibliotekene og klyngegenerering under sekvensering.
- **Rengjøre biblioteker** – Bruker en kulerenseprosedyre for å rense og velge størrelse på de forsterkede DNA-bibliotekene.
- **Slå sammen biblioteker** – Kombinerer DNA-biblioteker med unike indekser i én sammenslåing av opptil 12 biblioteker. Du kan slå sammen biblioteker etter volum eller masse.
- **Hybridisere prober** – Består av en hybridiseringsreaksjon, der de dobbeltstrengede DNA-bibliotekene denatureres og et panel av biotinylerede DNA-prober hybridiseres til målrettede genomiske regioner.
 - Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med flere panener. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit inneholder ikke et anrikingspanel. Probepanener fremskaffes av brukeren og må oppfylle de nødvendige spesifikasjonene. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-reagenser er

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

kompatible med både Illumina og tredjeparts anrikningspaneler for DNA-oligonukleotid som oppfyller de nødvendige spesifikasjonene. Du finner informasjon om nødvendige spesifikasjoner for tredjepartspaneler under [Krav til anrikningsprobepanel på side 9](#).

- **Fange hybridiserte prober** – Dette trinnet bruker streptavidinmagnetkuler (SMB3) til å fange de biotinylerte probene som er hybridisert til de målrettede interesseregionene.
- **Forsterke anrikede biblioteker** – Bruker PCR til å amplifisere de anrikede bibliotekene.
- **Rengjøre forsterkede, anrikede biblioteker** – Bruker en kulerenseprosedyre til å rense de anrikede bibliotekene som er klare for sekvensering.
- **Sekvensering** – Sekvensering av de anrikede bibliotekene utføres på MiSeqDx-, NextSeq 550Dx- eller NovaSeq 6000Dx-sekvenseringssystemer. For MiSeqDx og NextSeq 550Dx brukes den integrerte DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module til sekvensering av kjøringssoppsett, kjøringsovervåking og primæranalyse (FASTQ-generering fra basebetegnelser). For NovaSeq 6000Dx brukes DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for kjøringssoppsett og sekundæranalyse med flere tilgjengelige arbeidsflyter.

Prosedyremessige begrensninger

- Til *in vitro*-diagnostisk bruk.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med genomisk DNA fra humane celler og humant vev.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med dobbeltstrengede gDNA-innmatinger på 50–1000 ng. Ytelse kan ikke garanteres for innmatinger utenfor disse tersklene.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit inneholder ikke reagenser for DNA-ekstraksjon. De analytiske testresultatene, inkludert interferenstesting, som er oppgitt under [Ytelseskarakteristikker på side 55](#) er oppnådd med fullblod og FFPE som representative prøvetyper med representative DNA-ekstraksjonssett. Alle diagnostiske tester som er utviklet for bruk med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-reagenser krever full validering for alle aspekter av ytelse med det valgte DNA-ekstraksjonssettet.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er ikke anbefalt for FFPE-prøver av dårlig kvalitet med $\Delta Cq > 5$. Bruk av prøver med $\Delta Cq > 5$ kan øke sjansene for feil bibliotekklargjøring og redusere analyseytelsen.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -reagenser er konfigurert og testet for prøveinnmating, anrikningsreaksjoner og pleksitet som er angitt i den følgende tabellen.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Prøveinnmating	Anrikningsreaksjoner	Anrikningspleksitet
Sett for 16 prøver	Lav kvalitet (FFPE)	16 reaksjoner	1-pleks
Sett for 96 prøver	Høy kvalitet (f.eks. fullblod)	8 reaksjoner	12-pleks

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- Behandling av FFPE-innmating er testet og anbefales utelukkende for 1-pleksanrikningsreaksjoner ved bruk av settet for 16 prøver.
- Når det gjelder settet for 96 prøver, er det mulig med pleksiteter (2-pleks til 11-pleks) som ikke er standard, men det har følgende begrensninger:
 - Behandling av prøver i 2-pleks- til 11-pleksanrikningsreaksjoner reduserer settets kapasitet.
 - Optimale resultater kan ikke garanteres. Det kan være nødvendig med ekstra optimalisering for å oppnå egnet anrikningsytelse for pleksiteter som ikke er standard.
 - For strategier for sammenslåing av lave pleksiteter (2-pleks til 8-pleks) må det velges indeksadaptore med forskjellige sekvenser for å optimalisere fargebalansen for vellykket sekvensering og dataanalyse. DNA GenerateFASTQ Dx -modulen på MiSeqDx og NextSeq 550Dx har alternativer for fargebalanserte indeksskombinasjoner under kjøringsoppsett. Se [Metoder for sammenslåing på side 32](#) for å få mer informasjon om strategier for sammenslåing.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er begrenset til kun å levere anrikede biblioteker som sekvenseres på MiSeqDx, NextSeq 550Dx og NovaSeq 6000Dx. Bruk av andre sekvenseringssystemer krever full validering for alle ytelsesaspekter.
- Anrikningspaneler er ikke inkludert som en del av dette produktet. De analytiske testresultatene som oppgis under [Ytelseskaraktistikker på side 55](#) er oppnådd med representative anrikningspaneler, og er oppgitt kun til informasjon. De analytiske ytelseskaraktistikkene fungerer som eksempler på de generelle egenskapene til analysen, og fastslår ikke egenskapene eller egnetheten når det gjelder spesifikke analysekrav. Alle diagnostiske tester som ble utviklet for bruk med disse reagensene, krever full validering for alle ytelsesaspekter.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med både Illumina og tredjeparts anrikningspaneler. Ytelse med tredjeparts anrikningspaneler som ikke oppfyller panelkravene, kan imidlertid ikke garanteres. Se [Krav til anrikningsprobepanel på side 9](#) for informasjon om krav til paneler.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit bruker en hybridiseringstid på 2 timer. Ytelsesmetrikken kan påvirkes av en lengre hybridiseringstid.
- DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager-moduler leverer kun FASTQ-filer for MiSeqDx og NextSeq 550Dx. Hvis du bruker disse modulene, må du utføre sekundær analysevalidering.
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application er tilgjengelig på NovaSeq 6000Dx. Applikasjonen støtter flere sekundære analysearbeidsflyter, inkludert FASTQ-generering, FASTQ- og VCF-generering for deteksjon av kimlinjevarianter og FASTQ- og VCF-generering for somatisk variantdeteksjon. Hvis du bruker applikasjonen for VCF-generering, trenger du ikke utføre sekundær analysevalidering.
- Se [pakningsvedlegget for NovaSeq 6000Dx-instrumentet \(dokumentnr. 200025276\)](#) for begrensninger som gjelder DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application ved bruk med NovaSeq 6000Dx.

Produktkomponenter

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit består av følgende komponenter.

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

Reagenser som følger med

Å fullføre Illumina DNA Prep with Enrichment Dx krever Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A eller Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Du kan utføre følgende antall bibliotekklargjøringer og anrikningsreaksjoner ved hjelp av et sett for 16 prøver eller 96 prøver.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Prøveinnmating	Anrikningsreaksjoner	Anrikningspleksitet
Sett for 16 prøver	Lav kvalitet (FFPE)	16 reaksjoner	1-pleks
Sett for 96 prøver	Høy kvalitet (f.eks. fullblod)	8 reaksjoner	12-pleks

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

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, oppbevares ved 15 °C til 30 °C

Følgende reagenser sendes ved romtemperatur. Reagensene må straks settes til oppbevaring ved angitt oppbevaringstemperatur for å sikre riktig ytelse.

Reagensnavn	Rørantall		Hettefarge	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser
	16 prøver (nr. 20050020)	96 prøver (nr. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Rød	350 µl	Rengjøringsmiddelopløsning i vann.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Grønn	41 ml	Bufret vandig løsning som inneholder rengjøringsmiddel og salt.
Cleanup Beads (CB)	1	N/A (ikke tilgjengelig)*	Rød	10 ml	Paramagnetiske kuler, i fast fase, i bufret vandig løsning.

Cleanup Beads for 96 prøver er inkludert i Illumina Cleanup Beads 96 Samples (nr. 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 prøver), oppbevares ved 15 °C til 30 °C

Når det gjelder sett til 96 prøver, er Cleanup Beads inkludert i Illumina Prep Dx Cleanup Beads (katalognr. 20050030). Følgende reagens sendes ved romtemperatur. Reagensene må straks settes til oppbevaring ved angitt oppbevaringstemperatur for å sikre riktig ytelse. Når det gjelder sett til 16 prøver, er Cleanup Beads inkludert i Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (katalognr. 20050020).

Reagensnavn	Antall	Hettefarge	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser
Cleanup Beads (CB)	4	Rød	10 ml	Paramagnetiske kuler, i fast fase, i bufret vandig løsning.

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, oppbevares ved 2 °C til 8 °C

Følgende reagenser sendes nedkjølt. Reagensene må straks settes til oppbevaring ved angitt oppbevaringstemperatur for å sikre riktig ytelse. Oppbevar eBLTS-originalrøret stående, slik at kulene alltid er senket ned i bufferen.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Reagensnavn	Rørantall		Hettefarge	Fyllingsvolum		Aktive ingredienser
	16 prøver (nr. 20050021)	96 prøver (nr. 20050026)		16 prøver	96 prøver	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Gul	200 µl	290 µl	Streptavidin Magnetic Beads koblet til transposomer i bufret vandig løsning som inneholder glyserol, EDTA, ditiotritol, salt og rengjøringsmiddel.
Resuspensjonsbuffer (RSB)	1	4	Klar	1,8 ml	1,8 ml	Bufret vandig løsning.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, oppbevares ved -25 °C til -15 °C

Følgende reagenser sendes fryst. Reagensene må straks settes til oppbevaring ved angitt oppbevaringstemperatur for å sikre riktig ytelse.

Reagensnavn	Rørantall		Hettefarge	Fyllingsvolum		Aktive ingredienser
	16 prøver (nr. 20050022)	96 prøver (nr. 20050027)		16 prøver	96 prøver	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Klar	290 µl	290 µl	Bufret vandig løsning som inneholder magnesiumsalt og dimetylformamid.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Klar	200 µl	610 µl	DNA-polymerase og dNTP-er i bufret vandig løsning.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 prøver), oppbevares ved 2 °C til 8 °C

Når det gjelder sett til 16 prøver, er følgende reagenser inkludert i Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr. 20050023). Når det gjelder sett til 96 prøver, er reagensene inkludert i Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr. 20050028).

Følgende reagenser sendes nedkjølt. Reagensene må straks settes til oppbevaring ved angitt oppbevaringstemperatur for å sikre riktig ytelse.

Reagensnavn	Rørantall	Hettefarge	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Klar	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads i bufret vandig løsning som inneholder formamid, rengjøringsmiddel og salt.
Resuspensjonsbuffer (RSB)	1	Klar	1,8 ml	Bufret vandig løsning.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Klar	200 µl	Bufret vandig løsning som inneholder rengjøringsmiddel og salt.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Klar	200 µl	Bufret vandig løsning.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 prøver), oppbevares ved 2 °C til 8 °C

Når det gjelder sett til 96 prøver, er følgende reagenser inkludert i Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr. 20050028). Når det gjelder sett til 16 prøver, er reagensene inkludert i IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr. 20050023).

Følgende reagenser sendes nedkjølt. Reagensene må straks settes til oppbevaring ved angitt oppbevaringstemperatur for å sikre riktig ytelse.

Reagensnavn	Rørantall	Hettefarge	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Klar	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads i bufret vandig løsning som inneholder formamid, rengjøringsmiddel og salt.
Resuspensjonsbuffer (RSB)	4	Klar	1,8 ml	Bufret vandig løsning.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Klar	200 µl	Bufret vandig løsning som inneholder rengjøringsmiddel og salt.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Klar	200 µl	Bufret vandig løsning.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, oppbevares ved -25 °C til -15 °C

Følgende reagenser sendes fryst. Reagensene må straks settes til oppbevaring ved angitt oppbevaringstemperatur for å sikre riktig ytelse.

Reagensnavn	Rørantall		Hettefarge	Fyllingsvolum	Aktive ingredienser
	16 prøver (nr. 20050024)	96 prøver (nr. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Klar	580 µl	Rengjøringsmiddeloppløsning i vann.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Ravgul	4,1 ml	Bufret vandig løsning som inneholder salter og rengjøringsmidler.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Klar	320 µl	PCR-primerblanding (oligonukleotider).
2 N NaOH (HP3)	1	1	Klar	200 µl	2 N natriumhydroksidoppløsning (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Blå	480 µl	Bufret vandig løsning med Cot-1-DNA, flokkuleringsmiddel og formamid.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Klar	200 µl	DNA-polymerase og dNTP-er i bufret vandig løsning.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, oppbevares ved -25 °C til -15 °C

Følgende reagenser sendes fryst. Reagensene må straks settes til oppbevaring ved angitt oppbevaringstemperatur for å sikre riktig ytelse. Se [Vedlegg: Illumina UD-indeksadaptersekvenser på side 58](#) for informasjon om indekssadaptersekvenser.

Komponent	Antall
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 indekser), nr. 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 indekser), nr. 20050039	1

Reagenser som ikke følger med

Reagenser som er påkrevd, men som ikke følger med

- Reagenser for DNA-ekstraksjon og -rensing
- DNA-kvantifiseringsreagenser
- Etanol (200 proof for molekylær biologi)
- Nukleasefritt vann
- 1 M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- 1 N NaOH-oppløsning, molekylær biologisk kvalitet
- Ved bruk av NextSeq 550Dx-sekvenseringssystemet:
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykluser) (katalognr. 20028871)
- Ved bruk av MiSeqDx-sekvenseringssystemet:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalognr. 20037124)
- Ved bruk av NovaSeq 6000Dx-sekvenseringssystemet:
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 sykluser) (katalognr. 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 sykluser) (katalognr. 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalognr. 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalognr. 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalognr. 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (katalognr. 20062291)

Krav til anrikningsprobepanel

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-reagenser er kompatible med både Illumina og tredjeparts anrikningspaneler for DNA-oligonukleotid. Hvis du bruker tredjeparts biotinylerte DNA-prober (faste eller tilpassede paneler), må du kontrollere at de oppfyller de nødvendige spesifikasjonene.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er optimalisert og validert ved hjelp av følgende spesifikasjoner for tredjepartspaneler. Sammenlignbar ytelse kan ikke garanteres ved bruk av tredjepartspaneler som ikke oppfyller spesifikasjonene.

- Probelengde på 80 bp eller 120 bp
- Mellom 500 til 675 000 prober
- Enkelt- eller dobbeltstrenget DNA
- Total probeinnmating på ≥ 3 pmol for anrikning ved pleksiteter fra 1-pleks til 12-pleks

Oppbevaring og håndtering

- Romtemperatur defineres som 15 °C til 30 °C.
- Reagensene er stabile når de oppbevares som anvist frem til den angitte utløpsdatoen på settets etiketter. Se [Reagenser som følger med på side 4](#) for informasjon om oppbevaringstemperaturer.
- De fryste reagensene er stabile i maksimalt fire fryse/tine-sykluser som utføres før den angitte utløpsdatoen.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-prosedyren inneholder følgende sikre stoppunkter:
 - Etter [Forsterke tagmentert DNA på side 27](#) er de forsterkede bibliotekene stabile i opptil 30 dager når de oppbevares ved -25 °C til -15 °C.
 - Etter [Rengjøre biblioteker på side 29](#) er de rengjorte bibliotekene stabile i opptil 30 dager når de oppbevares ved -25 °C til -15 °C.
 - Etter [Slå sammen forhåndsanrikede biblioteker på side 32](#) er de sammenslåtte bibliotekene stabile i opptil 30 dager når de oppbevares ved -25 °C til -15 °C.
 - Etter [Forsterke anriket bibliotek på side 42](#) kan den anrikede, forsterkede bibliotekplante bli på termosykleren i opptil 24 timer. Alternativt kan platen oppbevares ved 2 °C til 8 °C i opptil 48 timer.
 - De endelig rengjorte, anrikede bibliotekene er stabile i opptil 7 dager når de oppbevares ved -25 °C til -15 °C.
- Hvis emballasjen eller innholdet i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er skadet eller åpnet, må du kontakte Illuminas kundeservice.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) kan danne synlige utfellinger eller krystaller. Varm opp til 37 °C i 10 minutter ved tegn til utfelling, og deretter roterer du til utfellingene løses opp.
- Hybridization Oligos (HYB) og Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) må forvarmes til samme temperatur som holdetemperaturen for hybridisering som gjelder per prøvetype og probepanel. Se [Prosedyremessige merknader på side 15](#) for mer informasjon om håndtering av NHB2 og EEW.
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) og HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) kan utvikle krystaller og uklarhet. Hvis du observerer krystaller og uklarhet, roterer du eller pipetterer opp og ned for å blande til oppløsningen er klar. Husk å forvarme NHB2 før pipettering.
- Bruk følgende beste praksis ved håndtering av Cleanup Beads (CB):
 - Frys aldri kulene.
 - Umiddelbart før bruk skal kulene roteres til de er resuspendert og fargen er homogen.
- Bruk følgende beste praksis ved håndtering av Enrichment BLT Small (eBLTS):
 - Oppbevar eBLTS-røret stående slik at kulene alltid er senket ned i bufferen.
 - Roter eBLTS grundig til kulene er resuspendert. Sentrifugering før pipettering anbefales ikke, ettersom det kan føre til at kulene synker til bunns igjen.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- Hvis kuler har klebet seg til siden eller toppen av en 96-brønners plate, sentrifugerer du ved 280 × g i 3 sekunder, og deretter pipetterer du for å resuspendere.
- Bruk følgende beste praksis ved håndtering av indeksadapterplater:
 - Ikke tilsett prøver i indeksadapterplaten.
 - Hver brønn i indeksplaten er kun til engangsbruk.

Nødvendig utstyr og materialer som ikke følger med

I tillegg til Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit må du sørge for at du har nødvendig utstyr og materiell før du starter protokollen.

Utstyr

Kontroller at du har det nødvendige utstyret før du starter protokollen.

Protokollen er optimalisert og validert ved hjelp av artikler med de oppførte spesifikasjonene. Sammenlignbar ytelse kan ikke garanteres ved bruk av utstyr som er utenfor spesifikasjonene.

Noen artikler er kun nødvendige for bestemte arbeidsflyter. Disse artiklene er angitt i egne tabeller.

- Termosykler med følgende spesifikasjoner
 - Oppvarmet lokk
 - Minste temperaturkontrollområde på 10 °C til 98 °C
 - Minste temperaturnøyaktighet på ±0,25 °C
 - Maksimalt reaksjonsvolum på 100 µl
 - Kompatibel med 96-brønners PCR-plater med høy kant
- Mikroprøveinkubator med følgende spesifikasjoner:
 - Temperaturområde i omgivelsene +5,0 °C til 99,0 °C
 - Kompatibel med 96-brønners MIDI-plate
- Mikroprøveinkubatorinnsatser som er kompatible med 96-brønners MIDI-plater
- Mikroplateryster med høy hastighet og et blande-hastighetsområde på 200–3000 o/min
- Magnetstativ som er kompatibelt med 96-brønners PCR-plater
- Magnetstativ som er kompatibelt med 96-brønners MIDI-plater
- Fluorometer som er kompatibelt med kvantifiseringsmetoden din
- DNA-fragmentanalysator
- Presisjonsdråpetellere:
 - 10 µl enkanals og flerkanals dråpetellere

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- 20 µl enkanals og flerkanals dråpetellere
- 200 µl enkanals og flerkanals dråpetellere
- 1000 µl enkanals dråpetellere
- Presisjonsdråpetellere sikrer nøyaktig reagens- og prøvetilførsel. Enkanals eller flerkanals dråpetellere kan brukes hvis de blir kalibrert regelmessig og er nøyaktige innen 5 % av det oppgitte volumet.
- Mikroplatesentrifuge
- Mikrosentrifuge
- Ett av følgende Illumina-sekvenseringsystemer:
 - MiSeqDx-instrument, katalognr. DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx-instrument, katalognr. 20005715
 - NovaSeq 6000Dx-instrument, katalognr. 20068232
- [Valgfritt] Vakuumpkonsentrator
- [FFPE] PCR-system på deteksjon i sanntid

Materiell

Kontroller at du har det nødvendige materiellet før du starter protokollen.

Noen artikler er kun nødvendige for bestemte arbeidsflyter. Disse artiklene er angitt i egne tabeller.

Protokollen er optimalisert og validert ved hjelp av artiklene som er oppført. Sammenlignbar ytelse kan ikke garanteres ved bruk av alternative materialer.

- Filtrerte dråpetellerspisser
- Kjegleformede sentrifugerør, 15 ml eller 50 ml
- 1,5 ml mikrosentrifugerør
- RNase-/DNase-frie flerkanals reagensbeholdere, til engangsbruk
- RNase-/DNase-frie 8-rørsstrimler og hetter
- Serologiske dråpetellere
- 96-brønners dypbrønnoppbevaringsplate i polypropylen, 0,8 ml (MIDI-plate)
- 96-brønners PCR-plater med hardt deksel og høy kant
- [FFPE] qPCR-plater som er kompatibel med qPCR-instrument
- Klebende forseglinger for 96-brønners plater med følgende spesifikasjoner:
 - Avrivbar, optisk klar polyester
 - Egnet til PCR-plater med kant
 - Sterkt lim som tåler flere temperaturendringer fra -40 °C til 110 °C
 - DNase-/RNase-fri
- Forbruksmateriell i plast som er kompatibelt med valgte kvantifiseringsmetode

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- Fluorometrisk dsDNA-kvantifiseringssett som er kompatibelt med valgt kvantifiseringsssystem:
 - Et kvantifiseringssett med stor kapasitet kan brukes til kvantifisering av forhåndsanrikede, forsterkede biblioteker.
 - Kapasiteten til kvantifiseringssettet for kvantifisering av anrikede biblioteker avhenger av hvilket probepanel som brukes.
- Fragmentanalysesett for bibliotekkvantifisering med valgt kvantifiseringsssystem:
 - Et sett med stor kapasitet kan brukes til kvalifisering av forhåndsanrikede, forsterkede biblioteker.
 - Kapasiteten til kvantifiseringssettet for kvalifisering av anrikede biblioteker avhenger av hvilket probepanel som brukes.
- **[Valgfritt]** Sett for DNA-ekstraksjon fra humane celler og humant vev. Du kan bruke hvilken som helst validert ekstraksjonsmetode.

Prøvetaking, transport og oppbevaring



FORSIKTIG

Håndter alle prøver som om de er potensielt smittefarlige stoffer.

- Denne analysen er kompatibel med genomisk DNA avledet fra humane celler og humant vev.
- For kommersielt tilgjengelig rensset gDNA må du kontrollere at prøvene er transportert under riktige forhold og oppbevart i henhold til instruksjoner fra produsenten. Følg beste praksis for oppbevaring av og fryse/tine-sykluser for gDNA.
- For fullblodinnmating følger kravene til blodprøvetaking, transport og oppbevaring som gjelder for den valgte DNA-ekstraksjonsmetoden. Hvilken som helst validert ekstraksjonsmetode kan brukes. Transport av fullblod skal overholde statlige og lokale bestemmelser for transport av etiologiske agenser.
- Alle validerte ekstraksjonsmetoder for ekstraksjon av DNA fra FFPE-vev kan brukes. Følg instruksjonene og anbefalingene som gjelder for den valgte ekstraksjonsmetoden for å bestemme følgende praksis:
 - Formalinfikserings- og parafininnstøpingsmetode for vev for å sikre best kvalitet på ekstrahert DNA.
 - Oppbevaring av FFPE-prøver.
 - Utgangsmateriellekravene, f.eks. antall og tykkelse på FFPE-snittene. De fleste rensmetoder anbefaler å bruke nykuttete snitt.

Advarsler og forholdsregler

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-reagenser inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk som er egnet ved risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Hvis du ønsker ytterligere informasjon om helse, miljø og sikkerhet, kan du se sikkerhetsdatabladene (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

- Alle blodprøver skal håndteres som om det finnes en smittefare med humant immunsviktvirus (HIV), humant hepatitt B-virus (HBV) og andre blodbårne patogener (universelle forholdsregler).
- Bruk rutinemessige forholdsregler for laboratoriet. Ikke pipetter med munnen. Ikke spis, drikk eller røyk i utpekte arbeidsområder. Bruk engangshansker og laboratoriefrakker når du håndterer prøver og settreagenser. Vask hendene grundig etter å ha håndtert prøvene og settreagensene.
- For å hindre nedbrytning av prøver eller reagenser må du kontrollere at all natriumhypoklorittdamp fra rengjøring er fullstendig oppløst før protokollen startes.
- Kontaminasjon av prøvene med andre PCR-produkter/amplikoner kan forårsake unøyaktige og upålitelige resultater. Bruk følgende beste praksis for å unngå kontaminasjon:
 - Bruk god laboratoriepraksis og laboratoriehygiene.
 - Utfør arbeidsflyttrinnene i de angitte preforsterknings- eller postforsterkningsområdene.
 - Sett brukte reagenser til oppbevaring før du rengjør biblioteker i et preforsterkningsområde.
 - Hold preforsterkningsreagenser adskilt fra postforsterkningsreagenser.
 - Kontroller at preforsterknings- og postforsterkningsområdene har sitt eget utstyr, f.eks. dråpetellere, dråpetellerspisser, roterer og sentrifuge.
- Unngå krysskontaminasjon. Bruk nye dråpetellerspisser mellom prøvene og mellom dispensering av reagenser. Bruk av filtrerte spisser reduserer risikoen for carryover av PCR-produkt og krysskontaminasjon fra prøve til prøve.
 - Når du skal tilsette eller overføre prøver eller reagenshovedblandinger, bytter du spisser mellom hver prøve.
 - Når du skal tilsette indeksadaptere med en flerkanals dråpeteller, bytter du spisser mellom hver rad eller hver kolonne. Hvis du bruker en enkanals dråpeteller, bytter du spisser mellom hver prøve.
 - Fjern ubrukte indeksadapterplater fra arbeidsområdet.
- Bruk følgende beste praksis for etanolvasketrinn:
 - Klargjør alltid ny 80 % etanol. Etanol kan absorbere vann fra luften, noe som kan påvirke resultatene.
 - Kontroller at all etanol blir fjernet fra bunnen av brønnene under vasketrinnene. Rester av etanol kan påvirke resultatene.
 - Følg de angitte tørketidene for magnetstativtrinnene for å sikre fullstendig fordampning. Rester av etanol kan påvirke ytelsen til påfølgende reaksjoner.
- Hovedblandinger skal alltid klargjøres før bruk, og de kombinerte arbeidsoppløsningene må aldri oppbevares.
- Ytelsen til Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kan ikke garanteres når prosedyrene ikke følges som beskrevet i pakningsvedlegget.
- Ikke bruk settkomponenter utover den oppgitte utløpsdatoen på etiketten på settet.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- Ikke bytt om settkomponenter fra forskjellige Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-sett. Sett er identifisert på etiketten på settet.

Prosedyremessige merknader

Anbefalinger for DNA-innmating

Protokollen Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibel med dobbeltstrengede, genomiske DNA (gDNA)-innmatninger på 50–1000 ng.

Kontroller at den første gDNA-prøven ikke inneholder > 1 mM EDTA og er fri for organiske kontaminanter, f.eks. fenol og etanol. Disse stoffene kan interferere med tagmenteringsreaksjonen og føre til analysefeil.

gDNA-innmating \geq 50 ng

For gDNA-innmatninger mellom 50–1000 ng er ikke kvantifisering og normalisering av den første gDNA-prøven nødvendig.

gDNA-innmating < 50 ng

DNA-innmatninger på 10–50 ng kan brukes med følgende justeringer:

- Hvis du bruker 10–49 ng gDNA-innmating, anbefales det å kvantifisere den første gDNA-prøven for å bestemme antall PCR-sykluser som er nødvendige etter tagmentering. Bruk en fluorometribasert metode for å kvantifisere dobbeltstrengt gDNA-innmating. Unngå metoder som måler total nukleinsyre, f.eks. NanoDrop eller andre UV-absorbansemetoder.
- Denne protokollen normaliserer ikke endelige forhåndsanrikede bibliotekproduksjoner fra 10–49 ng gDNA, og derfor er kvantifisering og normalisering av biblioteker før og etter anrikning nødvendig.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er karakterisert og verifisert for DNA-innmatninger på 50–1000 ng. Ekvivalent produktytelse kan ikke garanteres for gDNA-innmatninger < 50 ng.

Anbefalinger for innmating av blod

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er kompatibelt med gDNA som er ekstrahert fra perifert fullblod. Hvilken som helst validert ekstraksjonsmetode kan brukes. Når du ekstraherer gDNA fra fullblod, er innledende kvantifisering av DNA for innmating ikke nødvendig, og Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit gir normaliserte forhåndsanrikede bibliotekproduksjoner.

Følgende faktorer kan ha en negativ innvirkning på mengde DNA som oppnås fra fullblodsprøver og dermed biblioteknormaliseringen:

- Blodprøvealder
- Oppbevaringsforhold
- Underliggende medisinske tilstander som påvirker antall hvite blodceller

Anbefalinger for innmating av FFPE-vevsprøve

Bruk følgende FFPE DNA-kvalitetskriterier for å bestemme riktig innmating for vellykket bibliotekklargjøring:

- For FFPE-prøver med ΔCq -verdi på ≤ 5 er anbefalt DNA-innmating 50–1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx er ikke anbefalt for FFPE-prøver av dårlig kvalitet med $\Delta Cq > 5$. Det er mulig å bruke prøver med $\Delta Cq > 5$, men det kan øke sjansene for feil bibliotekklargjøring og redusere analyseytelsen.

FFPE-ekstraksjon

Bruk en nukleinsyreisolasjonsmetode som gir produksjoner med høy recovery, minimerer prøveforbruk og bevarer prøveintegriteten. Du kan bruke hvilken som helst validert metode for DNA-ekstraksjon fra FFPE-prøver. For gDNA ekstrahert fra FFPE-vev, er innledende kvantifisering av DNA for innmating nødvendig, og Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit gir ikke normaliserte forhåndsanrikede bibliotekproduksjoner.

FFPE DNA-kvalifisering

gDNA ekstrahert fra FFPE-vev skal kvalifiseres før bruk. For optimal ytelse vurderes DNA-prøvekvaliteten ved hjelp av en validert ekstraksjonsmetode for kvalifisering av DNA ekstrahert fra FFPE-prøver. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-protokollen er kompatibel med FFPE DNA-prøver med ΔCq -verdi på ≤ 5 . Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er ikke anbefalt for FFPE-prøver av dårlig kvalitet med $\Delta Cq > 5$. Det er mulig å bruke prøver med $\Delta Cq > 5$, men det kan øke sjansene for feil bibliotekklargjøring og redusere analyseytelsen.

[Valgfritt] FFPE-referanseprøver

Bruk karakteriserte referansematerialer, f.eks. Horizon HD799 (DNA), som en positiv kontroll når du utfører protokollen. Kvalifiserte FFPE-materialer fra cellelinjeavlede xenograften kan også brukes som referanseprøver. Bruk en fluorometribasert metode for å kvantifisere referansematerialer før bruk.

MERK Kjøring av en positiv kontrollreferanseprøve eller en kontroll uten mal (NTC) forbruker reagenser, og reduserer det totale antallet ukjente prøver som kan behandles.

Anbefalinger for prøveinnmating

Anbefalingene for prøveinnmating for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er oppsummert i tabellen som følger.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Tabell 1 Anbefalinger for prøveinnmating

Prøveinnmatingstype	Prøveinnmatingsmengde	Innmatings-DNA må kvantifiseres	Nødvendig DNA-innmatingskvalitet	Normalisert forhåndsanriket bibliotekproduksjon
gDNA	10–49 ng	Ja	260/280-forhold på 1,8–2,0	Nei
gDNA	50–1000 ng	Nei	260/280-forhold på 1,8–2,0	Ja
gDNA fra blod	50–1000 ng	Nei	260/280-forhold på 1,8–2,0	Ja
gDNA fra FFPE	50–1000 ng	Ja	ΔCq -verdi på ≤ 5	Nei

De anbefalte PCR-syklusene for eBLTS PCR-programmet justeres basert på prøveinnmatingkonsentrasjon og -kvalitet. Se [Forsterke tagmentert DNA på side 27](#) for mer informasjon.

Tips og teknikker

Unngå krysskontaminasjon

- Når du skal tilsette eller overføre prøver, bytter du spisser mellom *hver prøve*.
- Når du skal tilsette indeksadaptere med en flerkanals dråpeteller, bytter du spisser mellom *hver rad* eller *hver kolonne*. Hvis du bruker en enkanals dråpeteller, bytter du spisser mellom hver prøve.

Forsegling av platen

- Forsegl alltid den 96-brønners platen med en ny klebende forsegling ved hjelp av en gummivalse for å dekke til platen før trinnene i protokollen følges:
 - Ristetrinn
 - Inkubasjonstrinn. Hvis ikke platen forsegles på riktig måte, kan det føre til fordamping under inkubasjon.
 - Sentrifugeringstrinn
 - Hybridiseringstrinn
- Kontroller at kantene og brønnene er helt forseglet for å redusere risiko for krysskontaminasjon og fordamping.
 - Sentrifuger etter behov før forseglingen brytes hvis det observeres væske eller kondens på forseglingen eller sidene på platebrønnene.
- Plasser platen på et flatt underlag før du langsomt fjerner forseglingen.

Håndtere Enrichment BLT Small (eBLTS)

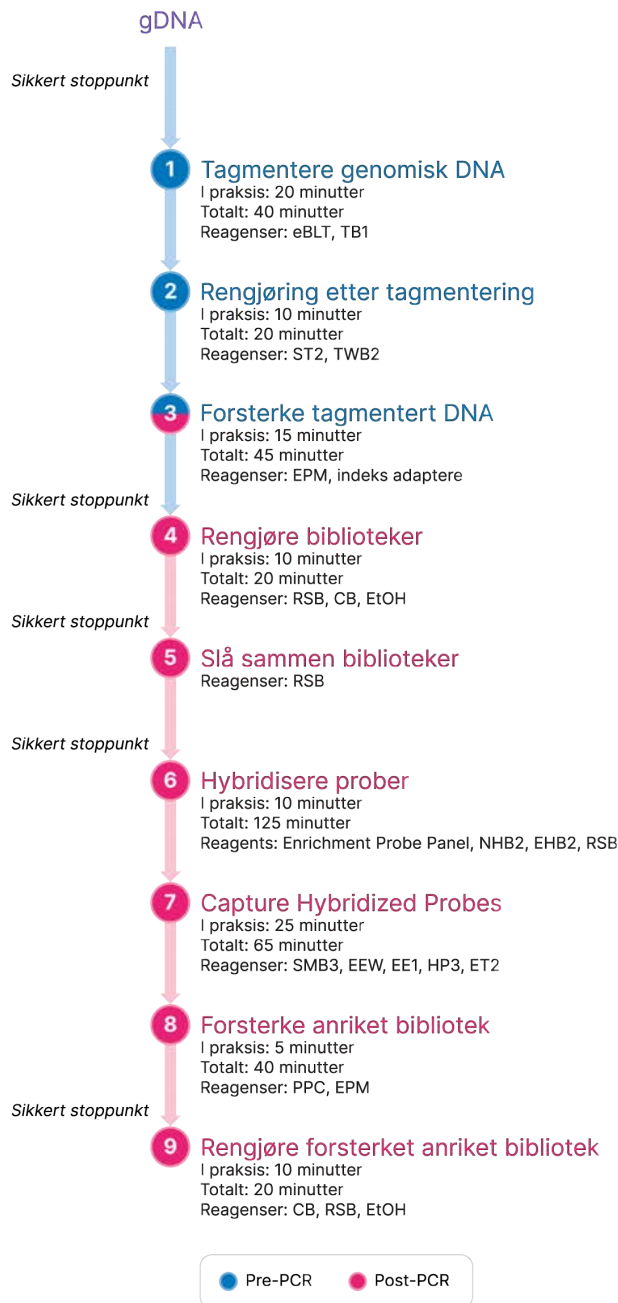
- Oppbevar eBLTS-originalrøret stående i kjøleskapet slik at kulene alltid er senket ned i bufferen.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- Umiddelbart før bruk roterer du eBLTS-originalrøret grundig til kulene er resuspenderte. Sentrifugering før pipettering anbefales ikke, ettersom det kan føre til at kulene synker til bunns igjen.
- Hvis kuler har klebet seg til siden eller toppen av en 96-brønners plate, sentrifugerer du ved $280 \times g$ i 3 sekunder, og deretter pipetterer du for å resuspendere.
- Ved vasking av eBLTS:
 - Bruk riktig magnetstativ for platen.
 - Hold platen på magnetstativet til instruksjonene angir at den skal fjernes.
 - Hvis kuler aspireres inn i dråpetellerspisser, må kulene dispenseres tilbake i platen på magnetstativet. Vent til væsken er klar (2 minutter).

Arbeidsflyt for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Diagrammet som følger illustrerer arbeidsflyten for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Sikre stoppunkter er merket mellom trinn. Anslåtte tider er basert på behandling av 12 prøver ved 12-pleksanrikning.



Bruksanvisning

Dette kapittelet beskriver Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-protokollen.

- Gå gjennom den planlagte, komplette arbeidsflyten for sekvensering fra prøve til analyse for å sikre kompatibilitet mellom produkter og forsøksparametere.
- Før du går videre må du bekrefte innholdet i settet og sørge for at du har nødvendige komponenter, utstyr og materiell.
 - Tredjeparts biotynlerte prober må oppfylle spesifikke krav. Les [Krav til anrikningsprobepanel på side 9](#) for å sikre at tredjepartsprobene dine oppfyller kravene.
- Følg protokollen i den viste rekkefølgen, og bruk de angitte volumene og inkubasjonsparameterne.
- Med mindre et sikkert stoppunkt er spesifisert i protokollen, går du umiddelbart videre til neste trinn.
- Når du lager en hovedblanding, er overskudd inkludert i volumene som er oppgitt.
- Sørg for å bruke riktig magnetstativ for platetypen din.

Klargjøre for sammenslåing

Dette trinnet er nødvendig for å sikre vellykket sekvensering av anrikede biblioteker. Sammenslåing av biblioteker kan skje for anrikning og før sekvensering.

Før anrikning – Individuelle indekserte forsterkede biblioteker slås sammen for anrikning med det valgte probepanelet. Dette skaper en multiplekset sammenslåing av anrikede biblioteker. For FFPE-prøveinnmating er behandling testet og anbefales utelukkende for 1-pleksanrikningsreaksjoner. For gDNA av høy kvalitet er 12-pleks testet, men 2-pleks til og med 11-pleks er mulig.

Før sekvensering – 1-pleksanrikede biblioteker og/eller multipleksanrikede biblioteker slås sammen før sekvensering. Antall anrikede biblioteker som kan sekvenseres, avhenger av målavlesningsdybden for hver prøve på sekvenseringssystemet ditt.

Unik dobbel indeksering

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit bruker unik dobbel indeksering.

- Dobbeltindekserte biblioteker legger til sekvensene Index 1 (Indeks 1) (i7) og Index 2 (Indeks 2) (i5) for å generere unikt merkede biblioteker.
- UD-indeks har distinkte, urelaterte indekssekvenser for i7- og i5-indeksavlesningen. Indekser er 10 baser lange.

Valg av indeksadaptere med forskjellige sekvenser for sammenslåtte biblioteker optimaliserer fargebalansen for vellykket sekvensering og dataanalyse. Pleksitetssammenslåinger som er ≥ 10 -pleks er iboende fargebalanserte, slik at du kan bruke hvilken som helst indeksadapterkombinasjon. Under

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

sekvenseringskjøringen gir DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager-modulen alternativer for fargebalanserte indekskombinasjoner og varsler deg hvis det ikke er tilstrekkelig mangfold i de valgte indekskombinasjonene.

Du finner informasjon om Illumina UD-indeksadaptersekvenser og plateoppsett i [Vedlegg: Illumina UD-indeksadaptersekvenser på side 58](#).

Støttede anrikningspleksiteter

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-reagenser er konfigurert og testet ved 1-pleks- og 12-pleksanrikningspleksitet. Selv om andre anrikningspleksiteter er mulig, krever noen pleksiteter ekstra klargjøring av forhåndsanrikningsbibliotek og anrikningsprobepanelreagenser.

Det kan være nødvendig med ekstra optimalisering for å oppnå egnet anrikningsytelse for anrikningspleksitet som ikke er standard. Optimale resultater kan ikke garanteres.

- **Anrikningspleksitet** – Antall forhåndsanrikede biblioteker (1–12) som er sammenslått i én anrikningsreaksjon for hybridisering med anrikningsprobepanelene. For eksempel vil å kombinere 12 forhåndsanrikede biblioteker sammen, skape en 12-pleksanrikningssammenslåing.
- **Anrikningsreaksjon** – Antall unike anrikningsreaksjonklargjøringer, uavhengig av antall forhåndsanrikede biblioteker som er slått sammen per reaksjon. For eksempel kan en enkelt anrikningsreaksjon klargjøre en 1-pleks- eller 12-pleksanrikningssammenslåing.

For å beregne det totale antallet etteranrikede biblioteker multipliserer du anrikningspleksitet per reaksjon med antall anrikningsreaksjoner. For eksempel gir en enkelt anrikningsreaksjon for en 12-pleksanrikningssammenslåing en sammenslåing av 12 etteranrikede biblioteker.

Ved sammenslåing av forhåndsanrikede biblioteker støtter Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-reagenser følgende anrikningsreaksjoner og -pleksitet.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-reagenser	Anrikningsreaksjoner	Anrikningspleksitet
Sett for 16 prøver	16 reaksjoner	1-pleks
Sett for 96 prøver	8 reaksjoner	12-pleks

Strategier for sammenslåing av to-pleks til og med åtte-pleks

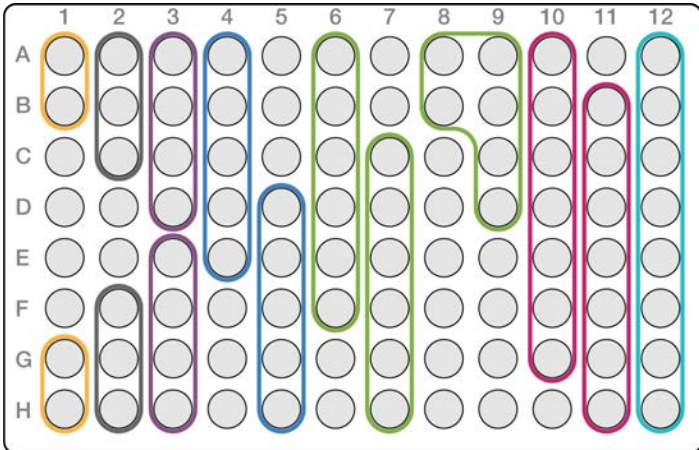
Tabellen som følger viser indeksadaptere (brønner) som kan kombineres i en sammenslåing av 2–8-pleks, mens den fargekodete figuren illustrerer hver kombinasjon.

Slå sammen en pleksitet ≥ 2 fra toppen eller bunnen av en kolonne. Ikke slå sammen på tvers av en rad.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Pleksitet	Kombinasjoner	Farge i figur
2	De to første eller de to siste brønnene i en kolonne: <ul style="list-style-type: none"> • A og B • G og H Radene C–F er ikke i bruk.	Oransje
3	De tre første eller de tre siste brønnene i en kolonne: <ul style="list-style-type: none"> • A–C • F–H Rad D og E er ikke i bruk.	Grå
4	De fire første eller de fire siste brønnene i en kolonne: <ul style="list-style-type: none"> • A–D • E–H 	Lilla
5	De fem første eller de fem siste brønnene i en kolonne: <ul style="list-style-type: none"> • A–E • D–H 	Blå
6	[Alternativ 1] De seks første eller de seks siste brønnene i en kolonne: <ul style="list-style-type: none"> • A–F • C–H [Alternativ 2] De to første brønnene (A og B) eller de to siste brønnene (G og H) i én kolonne og hvilke som helst fire kolonner i en tilstøtende kolonne.	Grønn
7	De syv første eller de syv siste brønnene i en kolonne: <ul style="list-style-type: none"> • A–G • B–H 	Rosa
8	Hele kolonnen.	Blågrønn

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

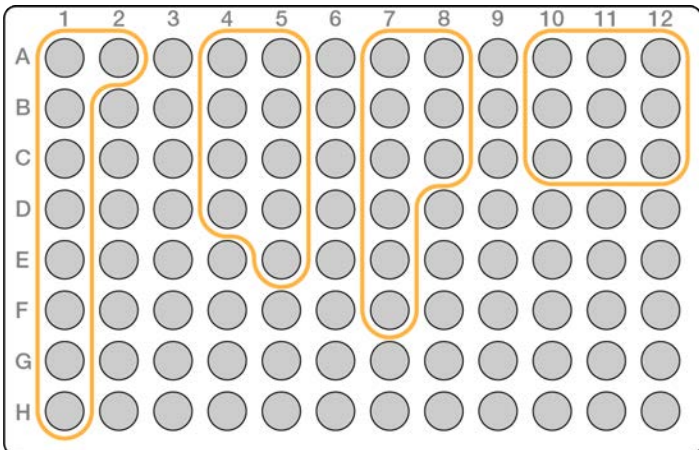


Strategier for sammenslåing av ni-pleks

Bruk indeksadaptore fra alle brønner som optimaliserer fargebalansen i en sekvenseringskjøring, for eksempel:

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

Figuren som følger viser alle fire eksempler.



Tagmentere genomisk DNA

Dette trinnet bruker Enrichment BLT Small (eBLTS) for å tagmentere DNA, som er en prosess som fragmenterer og merker DNA-et med adaptersekvenser.

Forbruksmaterieil

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (gul hette)

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nukleasefritt vann
- 96-brønners PCR-plate
- Klebende forsegling
- 1,7 ml mikrosentrifugerør
- 8-rørsstrimmel
- Dråpetellerspisser
 - 200 µl flerkanaals dråpetellere



FORSIKTIG

Dette reagenssettet inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk som er egnet ved risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Hvis du ønsker ytterligere informasjon om helse, miljø og sikkerhet, kan du se sikkerhetsdatabladene (SDS) på support.illumina.com/sds.html.

Om reagenser

- eBLTS må oppbevares ved temperaturer på 2 °C til 8 °C. Ikke bruk eBLTS som har blitt lagret under 2 °C.
- eBLTS må ikke sentrifugeres.

Klargjøring

1. Klargjør følgende forbruksmaterieill:

Vare	Oppbevaring	Instruksjoner
eBLTS (gul hette)	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur. Roter umiddelbart før bruk for å blande. Du må ikke sentrifugere før pipettering.
TB1	-25 °C til -15 °C	La nå romtemperatur. Roter for å blande.

2. Roter eller pipetter DNA, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
3. Lagre følgende TAG-program på termosykleren:
 - Velg alternativet for å varme opp lokk, og still inn på 100 °C
 - Still inn reaksjonsvolumet på 50 µl
 - 55 °C i 5 minutter
 - Holdes på 10 °C

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Prosedyre

1. Tilsett 2–30 µl DNA i hver brønn i en 96-brønners PCR-plate, slik at den totale innmatingsmengden er 50–1000 ng.
Hvis DNA-volum < 30 µl, tilsetter du nukleasefritt vann i DNA-prøvene, slik at det totale volumet blir 30 µl.
2. Roter eBLTS grundig til kulene er fullstendig resuspenderte.
3. Kombiner følgende volumer i et rør for å klargjøre tagmenteringshovedblandingen. Hvert volum multipliseres med antall prøver som skal behandles.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Reagensoverskudd er inkludert i volumet.
4. Pipetter tagmenteringshovedblandingen grundig for å blande.
5. Fordel tagmenteringshovedblandingsvolumet jevnt i en 8-rørsstrimmel.
6. Bruk en 200 µl flerkanales dråpeteller til å overføre 20 µl tagmenteringshovedblanding til hver brønn i PCR-platen som inneholder en prøve. Bruk nye spisser for hver prøvekolonne eller -rad.
7. Kast 8-rørsstrimmelen etter at tagmenteringshovedblandingen er dispensert.
8. Bruk en 200 µl flerkanales dråpeteller stilt inn på 40 µl, og bland ved å pipettere hver prøve 10 ganger. Bruk nye spisser for hver prøvekolonne.
Alternativt kan du forsegle PCR-platen og bruke en ryster ved 1600 o/min i 1 minutt.
9. Forsegl platen, og deretter plasserer du den på den forhåndsprogrammerte termosykleren og kjører TAG-programmet.
10. Vent til TAG-programmet har nådd 10 °C holdetemperatur, og ta deretter ut platen umiddelbart.
11. La 96-brønners PCR-plate stå i romtemperatur i 2 minutter, og fortsett deretter til neste trinn.

Rengjøring etter tagmentering

Dette trinnet vasker det adaptermerkede DNA-et på eBLTS før PCR-forsterkning.

Forbruksmateriell

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96-brønners PCR-platemagnetstativ
- Klebende forsegling
- 8-rørsstrimmel
- Dråpetellerspisser
 - 20 µl flerkanales dråpetellere
 - 200 µl flerkanales dråpetellere

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- Klargjør for senere prosedyre:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Indeksadapterplate

Om reagenser

- Sørg for å bruke riktig magnetstativ for platen din. Hvis du bruker et magnetstativ for MIDI-plater med en PCR-plate, kan det forhindre at TWB2 kleber seg til kuler.
- Pipetter TWB2 sakte for å minimere skumdannelse, slik at du unngår feil volumaspirasjon og ufullstendig blanding.

Klargjøring

1. Klargjør følgende forbruksmateriell:

Vare	Oppbevaring	Instruksjoner
EPM	-25 °C til -15 °C	La tine på is i 1 time. Bland ved å vende og deretter sentrifugere et kort øyeblikk.
ST2	15 °C til 30 °C	Varm opp til 37 °C i 10 minutter ved tegn til utfelling, og deretter roterer du til utfellingene er oppløst. Bruk ved romtemperatur.
TWB2	15 °C til 30 °C	Bruk ved romtemperatur.
Indeksadapterplate	-25 °C til -15 °C	La tine ved romtemperatur i 30 minutter.

Prosedyre

1. Tilsett 10 µl ST2 i hver tagmenteringsreaksjon. Hvis du bruker en flerkanals dråpeteller, pipetterer du ST2 i en 8-rørsstrimmel, og deretter overfører du de riktige volumene til PCR-platen. Bruk nye spisser for hver prøvekolonne eller -rad.
2. Bruk en dråpeteller på 200 µl satt til 50 µl, og pipetter sakte hver brønn 10 ganger for å resuspendere kulene.
Alternativt kan platen forsegles og ristes ved 1600 o/min i 1 minutt. Gjenta etter behov.
3. Forsegl platen og sentrifuger deretter ved 280 × g i 10 sekunder.
4. Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
5. Plasser den på PCR-platemagnetstativet, og vent til væsken er klar (3 minutter).
6. [≤ 48 prøver] Vask tre ganger på følgende måte.
 - a. Bruk en dråpeteller på 200 µl satt til 60 µl, og fjern og kast supernatant uten å forstyrre kulepelleten.
 - b. Fjern fra magnetstativet.
 - c. Umiddelbart etterpå tilsetter du sakte 100 µl TWB2 direkte på kulene.
 - d. Pipetter sakte til kulene er fullstendig resuspenderte. Alternativt kan platen forsegles og ristes ved 1600 o/min i 1 minutt.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- e. Hvis det oppstår sprut, snurrer du nedover ved $280 \times g$ i 10 sekunder.
 - f. Plasser på PCR-platemagnetstativet, og vent til væsken er klar (3 minutter).
La platen være på magnetstativet og TWB2 i brønner for å forhindre overtøking når du utfører den tredje vasken. Fjern og kast supernatant etter at du har klargjort PCR-hovedblandingen.
 - g. Bruk en 200 µl flerkanals dråpeteller satt til 100 µl, og fjern og kast supernatant.
 - h. Gjenta trinn c–f to ganger for totalt tre vasker.
7. [> 48 prøver] Vask tre ganger på følgende måte.
- a. Utfør trinn b og c i trinn på 1 kolonne til 2 kolonner til alle kolonnene er behandlet, for å forhindre overtøking.
 - b. Bruk en 200 µl flerkanals dråpeteller satt til 60 µl, og fjern og kast supernatant.
 - c. Fjern fra magnetstativet.
 - d. Umiddelbart etterpå dispenserer du sakte 100 µl TWB2 direkte på kulene.
 - e. Pipetter sakte til kulene er fullstendig resuspenderte. Alternativt kan platen forsegles og ristes ved 1600 o/min i 1 minutt.
 - f. Hvis det oppstår sprut, snurrer du nedover ved $280 \times g$ i 10 sekunder.
 - g. Plasser på PCR-platemagnetstativet, og vent til væsken er klar (3 minutter).
La platen være på magnetstativet og TWB2 i brønner for å forhindre overtøking når du utfører den tredje vasken. Fjern og kast supernatant etter at du har klargjort PCR-hovedblandingen.
 - h. Bruk en 200 µl flerkanals dråpeteller satt til 100 µl, og fjern og kast supernatant.
 - i. Fjern fra magnetstativet, og tilsett sakte 100 µl TWB2 direkte på kulene.
 - j. Gjenta trinn h og i trinn på 1 eller 2 kolonner til alle kolonner er behandlet.
 - k. Gjenta trinn e–h to ganger for totalt tre vasker.
8. La stå på magnetstativet til trinn 4 i delen *Prosedyre i Forsterke tagmentert DNA*.
TWB2 forblir i brønnene for å forhindre overtøking av kulene.

Forsterke tagmentert DNA

Dette trinnet forsterker det tagmenterte DNA-et ved hjelp av et PCR-program med begrenset syklus. PCR-trinnet tilsetter adaptore for indeks 1 (i7), adaptore for indeks 2 (i5) og sekvenser som er nødvendige for å sekvensere klyngegenerering.

Forbruksmaterieill

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Indeksadapterplate
- 96-brønners PCR-plate
- Nukleasefritt vann
- Klebende forsegling

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- 1,5 ml mikrosentrifugerør
- Dråpetellerspisser
 - 20 µl flerkanals dråpetellere
 - 200 µl flerkanals dråpetellere

Om reagenser

- Indeksadapterplater
 - En brønn kan inneholde > 10 µl indeksadaptere.
 - Ikke tilsett prøver i indeksadapterplaten.
 - Hver brønn i indeksplaten er kun til engangsbruk.

Klargjøring

1. Klargjør følgende forbruksmateriell:

Vare	Oppbevaring	Instruksjoner
EPM	-25 °C til -15 °C	La tine ved 4 °C eller på is i 1 time. Bland ved å vende og deretter sentrifugere et kort øyeblikk.
Indeksadapterplate	-25 °C til -15 °C	La tine ved romtemperatur i 30 minutter.

2. Lagre følgende eBLTS PCR-program på en termosyklus ved hjelp av riktig antall PCR-sykluser, som er angitt i tabellen nedenfor.

- Velg alternativet for å varme opp lokk, og still inn på 100 °C
- Still inn reaksjonsvolumet på 50 µl
- 72 °C i 3 minutter
- 98 °C i 3 minutter
- X sykluser med:
 - 98 °C i 20 sekunder
 - 60 °C i 30 sekunder
 - 72 °C i 1 minutt
- 72 °C i 3 minutter
- Holdes på 10 °C

Total kjøringstid er ~38 minutter for 9 sykluser og ~46 minutter for 12 sykluser.

Prøveinnmatingstype	Antall PCR-sykluser (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1000 ng gDNA	9
50–1000 ng gDNA ekstrahert fra FFPE	12

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Prøveinnmatingstype	Antall PCR-sykluser (X)
gDNA ekstrahert fra blod	9

Prosedyre

- Kombiner følgende for å klargjøre PC-hovedblandingen. Hvert volum multipliseres med antall prøver som skal behandles.
 - EPM (23 µl)
 - Nukleasefritt vann (23 µl)Reagensoverskudd er inkludert i volumet.
- Bland ved å pipettere PCR-hovedblandingen 10 ganger, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
- Med platen på det magnetstativet bruker du en 200 µl flerkanales dråpeteller til å fjerne og kaste TWB2. Skum som ligger igjen på brønnveggene påvirker ikke biblioteket negativt.
- Fjern fra magnetstativet.
- Tilsett umiddelbart 40 µl PCR-hovedblanding direkte på kulene i hver brønn.
- Bland ved å pipettere umiddelbart til kulene er fullstendig resuspendert. Alternativt kan platen forsegles og ristes ved 1600 o/min i 1 minutt.
- Forsegl prøveplaten og sentrifuger ved 280 × g i 10 sekunder.
- Sentrifuger indeksadapterplaten ved 1000 x g i 1 minutt.
- Klargjør indeksadapterplaten.
 - [< 96 prøver] Stikk hull i folieforseglingen på indeksadapterplaten med en ny dråpetellerspiss for hver brønn kun for det antall prøver som skal behandles.
 - [96 prøver] Innrett en ny PCR-plate med delvis kant over indeksadapterplaten, og trykk ned for å gjennomhulle folieforseglingen. Kast PCR-platen som ble brukt til å gjennomhulle folieforseglingen.
- Bruk en ny dråpetellerspiss til å tilsette 10 µl forhåndsparede indeksadaptere i hver brønn.
- Bruk en dråpeteller stilt inn på 40 µl, og bland ved å pipettere 10 ganger. Alternativt kan platen forsegles og ristes ved 1600 o/min i 1 minutt.
- Forsegl platen og sentrifuger deretter ved 280 × g i 10 sekunder.
- Plasser på termosykleren, og kjør eBLTS PCR-programmet.

SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, må den oppbevares ved -25 °C til -15 °C i opptil 30 dager.

Rengjøre biblioteker

Dette trinnet bruker dobbeltsidig kulerenseprosedyre for å rense de amplifiserte bibliotekene.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Forbruksmateriell

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Nylig klargjort 80 % etanol (EtOH)
- 96-brønners 0,8 ml dypbrønnoppbevaringsplate i polypropylen (MIDI-plate)
- 96-brønners PCR-plate
- MIDI-platemagnetstativ
- PCR-platemagnetstativ
- 1,5 ml mikrosentrifugerør
- Nukleasefritt vann

Om reagenser

- Cleanup Beads
 - Roter før hver bruk.
 - Roter hyppig for å sørge for at kulene blir jevnt fordelt.
 - Aspirer og dispenser sakte med tanke på oppløsningens viskositet.

Klargjøring

1. Klargjør følgende forbruksmateriell:

Vare	Oppbevaring	Instruksjoner
CB	Romtemperatur	Roter og vend for å blande til væskens farge er homogen.
RSB	2 °C til 8 °C	La tine i 30 minutter ved romtemperatur. Roter for å blande.

Prosedyre

1. Rist 96-brønners PCR-platen ved 1800 o/min i 1 minutt, og sentrifuger den deretter et kort øyeblikk.
2. Plasser den på PCR-platemagnetstativet, og vent til væsken er klar (1 minutt).
3. Roter CB 3 ganger i 10 sekunder, og deretter vender du den flere ganger for å resuspendere.
4. Gjør som følger for gDNA av høy kvalitet.
 - a. Tilsett 77 µl nukleasefritt vann i hver brønn i en ny MIDI-plate.
 - b. Tilsett 88 µl CB i hver brønn i MIDI-platen.
 - c. Overfør 45 µl supernatant fra hver brønn i PCR-platen til tilsvarende brønn i MIDI-platen.
 - d. Kast PCR-platen.
 - e. Bland ved å pipettere hver brønn 10 ganger. Alternativt kan platen forsegles og ristes ved 1800 o/min i 1 minutt.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- f. Forsegl platen og inkuber ved romtemperatur i 5 minutter.
 - g. Se etter luftbobler. Er det bobler, snurr nedover.
 - h. Plasser på MIDI-platemagnetstativet, og vent til væsken er klar (5 minutter).
 - i. Under inkubasjon roteres CB grundig, og deretter tilsettes 20 µl i hver brønn i en *ny* MIDI-plate.
 - j. Overfør 200 µl supernatant fra hver brønn i den første MIDI-platen i den tilsvarende brønnen i den nye MIDI-platen (som inneholder 20 µl CB).
 - k. Kast den første MIDI-platen.
 - l. Bland ved å pipettere hver brønn i den nye MIDI-platen 10 ganger. Alternativt kan platen forsegles og ristes ved 1800 o/min i 1 minutt.
5. Gjør som følger for ekstrahert FFPE.
- a. Tilsett 81 µl CB i hver brønn i en ny MIDI-plate.
 - b. Overfør 45 µl supernatant fra hver brønn i PCR-platen til tilsvarende brønn i MIDI-platen.
 - c. Kast PCR-platen.
 - d. Bland ved å pipettere hver brønn 10 ganger. Alternativt kan platen forsegles og ristes ved 1800 o/min i 1 minutt.
6. Inkuber ved romtemperatur i 5 minutter.
7. Se etter luftbobler. Er det bobler, snurr nedover.
8. Plasser på MIDI-platemagnetstativet, og vent til væsken er klar (5 minutter).
9. Fjern og kast supernatant uten å forstyrre kulene.
10. Vask kuler på følgende måte:
- a. Med platen på magnetstativet tilsetter du 200 µl ny 80 % EtOH uten å blande.
 - b. Inkuber i 30 sekunder.
 - c. Fjern og kast supernatant uten å forstyrre kulene.
11. Vask kulene **andre** gang.
12. La lufttørke på magnetstativet i 5 minutter.
13. Under lufttørring kan du bruke en 20 µl dråpeteller til å fjerne og kaste rester av EtOH.
14. Fjern fra magnetstativet.
15. Tilsett 17 µl RSB i kulene.
16. Forsegl platen og rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
17. Inkuber i romtemperatur i 2 minutter.
18. Se etter luftbobler. Er det bobler, snurr nedover.
19. Plasser platen på MIDI-platemagnetstativet, og vent til væsken er klar (2 minutter).
20. Overfør 15 µl supernatant til en ny 96-brønners PCR-plate.

SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, må du forsegle platen og oppbevare den ved -25 °C til -15 °C i opptil 30 dager.

Slå sammen forhåndsanrikede biblioteker

Dette trinnet kombinerer DNA-biblioteker med unike indekser i én sammenslåing av opptil 112 biblioteker.

Metoder for sammenslåing

Du kan slå sammen etter volum eller masse. Bruk den følgende tabellen til å bestemme riktig metode for innmatingen din.

Tabell 2 Anbefalte metoder for sammenslåing

Prøveinnmating	Metode for sammenslåing
10–49 ng gDNA	Masse
50–1000 ng gDNA	Volum
gDNA ekstrahert fra FFPE	Masse
gDNA ekstrahert fra blod	Volum

- Én-pleksanrikning krever ikke sammenslåing av forhåndsanrikede biblioteker. Det kan imidlertid være nødvendig å tilsette RSB.
- Etter kvantifisering av forhåndsanriket bibliotek, kan alle prøveinnmatingstyper slås sammen etter masse for å oppnå optimal indeksbalanse.
- Endelig produksjon for forhåndsanrikede biblioteker som er generert i separate, eksperimentelle klargjøringer, kan variere. Sammenslåing etter masse anbefales derfor for å oppnå optimal indeksbalanse.
- Bruk 1-pleksanrikning for følgende situasjoner.
 - 10–49 ng gDNA
 - 50–1000 ng gDNA ekstrahert fra FFPE
 - Lav mindre allelfrekvensdeteksjon for somatisk variantbetegnelse.

Slå sammen etter masse

For følgende situasjoner kvantifiserer du bibliotekene dine til å bruke en DNA-masse per bibliotek for anrikning som er spesifisert i [Slå sammen forhåndsanrikede biblioteker ved lik konsentrasjon på side 33](#).

- 10–49 ng gDNA-prøveinnmating
- 50–1000 ng gDNA ekstrahert fra FFPE-prøveinnmating
- Lav mindre allelfrekvensdeteksjon for somatisk variantbetegnelse
- gDNA ekstrahert fra blod for optimal indeksbalanse

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Kvantifisere forhåndsanrikede biblioteker

1. Kjør 1 µl av de forhåndsanrikede bibliotekene ved å bruke din foretrukne, fluorescensbaserte kvantifiseringsmetode som benytter dsDNA-interkalerende fargestoff.
 - For 50–1000 ng gDNA av høy kvalitet kan du forvente en ≥ 500 ng forhåndsanriket bibliotekproduksjon.
 - For 50–1000 ng gDNA ekstrahert fra FFPE kan du forvente en 500–6000 ng forhåndsanriket bibliotekproduksjon, avhengig av kvaliteten på den første prøven.

MERK For kvantifiseringsmetoder med forskjellige avvik kvalifiserer du kvantifiseringsmetoden for denne arbeidsflyten. Konsentrasjonsresultater kan variere avhengig av metoden som brukes.

Slå sammen forhåndsanrikede biblioteker ved lik konsentrasjon

Bruk den følgende tabellen til å bestemme DNA-massen per bibliotek som kreves for anriking i henhold til prøvetype og anrikningspleksitet. Optimale anrikningsproduksjoner og analyseytelse kan ikke garanteres ved bruk av lavere forhåndsanrikede bibliotekproduksjoner enn anbefalt.

Den totale DNA-massen i anrikningsreaksjonen skal ikke overstige 6000 ng.

Prøveinnmating	Anrikningspleksitet	DNA-masse per bibliotek (ng)	Total DNA-bibliotekmasse (ng)
gDNA av høy kvalitet	12	250–500	3000–6000
gDNA ekstrahert fra FFPE	1	200	200

1. Registrer indeksene for bibliotekene som du planlegger å slå sammen i dette trinnet.
2. Basert på konsentrasjonen til hvert bibliotek beregner du volumet som må legges til anrikningsreaksjonen for å oppnå den nødvendige DNA-massen.
 - gDNA av høy kvalitet: Beregn bibliotekvolumet som er nødvendig for en innmating på 250–500 ng.
 - gDNA ekstrahert fra FFPE: Beregn bibliotekvolumet som er nødvendig for en innmating på 200 ng.
3. Tilsett det beregnede volumet for hvert bibliotek i samme brønn i PCR-platen.
4. Hvis du bruker gDNA av høy kvalitet, utfører du ett av følgende basert på det totale volumet av sammenslåtte, forhåndsanrikede biblioteker:
 - Hvis forhåndsanriket bibliotekvolum = 30 µl, går du videre til [Hybridisere prober på side 35](#).
 - Hvis forhåndsanriket bibliotekvolum < 30 µl, tilsetter du RSB for å oppnå et totalt volum på 30 µl.
 - Hvis forhåndsanriket bibliotekvolum > 30 µl, bruker du en kulebasert metode eller en vakuumpkonsentrator for å konsentrere den sammenslåtte prøven. Tilsett RSB i den konsentrerte, sammenslåtte prøven for å oppnå et totalt volum på 30 µl.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

5. Hvis du bruker gDNA ekstrahert fra FFPE, utfører du ett av følgende basert på det totale volumet av sammenslåtte, forhåndsanrikede biblioteker:
- Hvis forhåndsanriket bibliotekvolum = 7,5 µl, går du videre til [Hybridisere prober på side 35](#).
 - Hvis forhåndsanriket bibliotekvolum < 7,5 µl, tilsetter du RSB for å oppnå et totalt volum på 7,5 µl.

SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, forsegler du platen og oppbevarer den ved –25 °C til –15 °C i opptil 30 dager.

Slå sammen etter volum

Når innmatingen er 50–1000 ng gDNA, er det ikke nødvendig å kvantifisere og normalisere individuelle biblioteker som er generert i samme forsøk.

For å oppnå optimal ytelse må du bare slå sammen forhåndsanrikede bibliotekprøver som er klargjort av samme bruker med samme reagenslot og indeksadapterplate.

1. Registrer indeksene for bibliotekene som du planlegger å slå sammen i dette trinnet.
2. Kombiner følgende forhåndsanrikede biblioteker og RSB-volumer for anrikningspleksiteten din i samme brønn i en ny PCR-plate.

Da får du et volum på 30 µl.

Anrikningspleksitet *	Hvert forhåndsanrikede bibliotekvolum (µl)	RSB-volum (µl)
1-pleks	14	16
2-pleks	14	2
3-pleks	10	0
4-pleks	7,5	0
5-pleks	6	0
6-pleks	5	0
7-pleks	4,2	0,6
8-pleks	3,7	0,4
9-pleks	3,3	0,3
10-pleks	3	0
11-pleks	2,7	0,3
12-pleks	2,5	0

*Se [Prosedyremessige begrensninger på side 2](#) for informasjon om pleksiteter (2-pleks- til 11-pleks) som ikke er standard.

SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, forsegler du platen og oppbevarer den ved –25 °C til –15 °C i opptil 30 dager.

[Valgfritt] Kvalifisere forhåndsanrikede biblioteker

Hvis du slår sammen etter volum for å kvantifisere de forhåndsanrikede bibliotekene, bruker du en fluorometribasert metode som benytter dsDNA-interkalerende fargestoff. For å kvalifisere de forhåndsanrikede bibliotekene bruker du en DNA-fragmentanalysator med hensiktsmessig fragmentanalysesett.

Bruk totalt 1 µl til bibliotekkvalifisering. Forhåndsanrikede biblioteker er tilstrekkelig konsentrerte til å tillate små fortynninger for kvantifisering eller fragmentanalyse.

Hybridisere prober

Dette trinnet binder målrettede områder av DNA med innfangingsprober.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-reagenser er kompatible med både Illumina og tredjeparts anrikningspaneler for DNA-oligonukleotid. Du finner informasjon om nødvendige spesifikasjoner for tredjepartspaneler under [Krav til anrikningsprobepanel på side 9](#).

Forbruksmateriell

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (blå hette)
- Anrikningsprobepanel
- 96-brønners PCR-plate
- Klebende forsegling
- Klargjør for senere prosedyre:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (ravgul hette)

Om reagenser

- NHB2 utfelles og separeres under oppbevaring.
- Anrikningsprobepanel viser til det valgte anrikningspanelet for oligonukleotid fra Illumina-leverandøren.

Klargjøring

1. Klargjør følgende forbruksmateriell:

Vare	Oppbevaring	Instruksjoner
EHB2	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur. Roter for å blande. Hvis du observerer krystaller og uklarhet, roterer du på nytt, eller pipetter opp og ned for å blande til oppløsningen er klar.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Vare	Oppbevaring	Instruksjoner
Anrikningsprobepanel	-25 °C til -15 °C (Illumina)	La både Illumina- og tredjepartspaneler nå romtemperatur. Roter for å blande.
NHB2 (blå hette)	-25 °C til -15 °C	Tin ved romtemperatur. Når den har nådd romtemperatur, forvarmes den i en mikroprøveinkubator til samme temperatur som proben du skal bruke, i 5 minutter. Roter ved maksimal hastighet 3 ganger i 10 minutter hver for å resuspendere. Sentrifuger et kort øyeblikk. Pipetter opp og ned fra bunnen av røret. Hvis du observerer krystaller og uklarhet, roterer du på nytt, eller pipetter opp og ned for å blande til oppløsningen er klar. Bruk mens den er varm for å unngå at det igjen dannes utfellinger.
SMB3*	2 °C til 8 °C	Hvis du går videre til neste prosedyre umiddelbart etter pausen i HYB-programmet på 90 minutter, lar du den nå romtemperatur i minst 2 timer før du starter HYB-programmet.
EEW* (ravgult rør)	-25 °C til -15 °C	Hvis du går videre til neste prosedyre umiddelbart etter pausen i HYB-programmet på 90 minutter, lar du den nå romtemperatur i minst 2 timer før du starter HYB-programmet. Når romtemperatur er nådd, forvarmes den på en mikroprøveinkubator til den aktuelle temperaturen for hybridisering og fanging i 30 minutter før HYB-programmet avsluttes.

*Hvis du skal stoppe før neste prosedyre, utsetter du klargjøring av dette reagenset til du kommer til denne prosedyren.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- Lagre følgende HYB-program på termosykleren ved hjelp av riktig antall sykluser, som er oppgitt i [Tabell 3](#).
 - Velg alternativet for å varme opp lokk, og still inn på 100 °C
 - Still inn reaksjonsvolumet
 - [gDNA av høy kvalitet] 100 µl
 - [gDNA ekstrahert fra FFPE] 25 µl
 - 98 °C i 5 minutter
 - X sykluser på 1 minutt hver med start ved 98 °C for den første syklusen, og deretter 2 °C lavere per syklus
 - Hold ved den aktuelle temperaturen i 90 minutter:
 - [gDNA ekstrahert fra FFPE] 58 °C
 - [80 mer probepaneller] 58 °C
 - [Somatisk variantbetegnelse] 58 °C
 - [Alle andre] 62 °CTotal kjøringstid er ~115 minutter.

Tabell 3 Syklusantall per prøve eller panel

Prøve- og paneltype	Antall sykluser (X)
gDNA ekstrahert fra FFPE (uavhengig av paneltype)	20
80 mer probepaneller (uavhengig av prøvetype)	20
Somatisk variantbetegnelse	20
Alle andre prøver og paneller	18

Prosedyre

- [gDNA av høy kvalitet] Tilsett følgende reagenser *i oppgitt rekkefølge* i hvert sammenslått bibliotek i PCR-platen.

Ikke lag en hovedblanding. Å lage en hovedblanding av NHB2 og EHB2 har negativ innvirkning på anrikningsytelsen.

 - NHB2 (blå hette) (50 µl)
 - Anrikningsprobepanel (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
- [gDNA av høy kvalitet] Bruk en dråpeteller stilt inn på 90 µl, og pipetter hver brønn 10 ganger for å blande.
- [gDNA ekstrahert fra FFPE] Tilsett følgende reagenser *i oppgitt rekkefølge* i hvert sammenslått bibliotek i PCR-platen.

Ikke lag en hovedblanding. Å lage en hovedblanding av NHB2 og EHB2 har negativ innvirkning på anrikningsytelsen.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- NHB2 (blå hette) (12,5 µl)
 - Anrikningsprobepanel (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[gDNA ekstrahert fra FFPE]** Bruk en dråpeteller stilt inn på 20 µl, og pipetter hver brønn 10 ganger for å blande.
 5. Forsegl platen og sentrifuger ved 280 × g i 10 sekunder.
 6. Plasser prøveplaten på den forhåndsprogrammerte termosykleren, og kjør HYB-programmet.
 7. Gå umiddelbart videre til neste prosedyre når HYB-programmets tid for å holde temperaturen, utløper.



FORSIKTIG

Utfelling forekommer hvis hybridiseringsreaksjonens temperatur faller under romtemperatur.

Fange hybridiserte prober

Dette trinnet bruker streptavidinmagnetkuler (Streptavidin Magnetic Beads, SMB3) til å fange prober som er hybridisert til de målrettede interesseregionene.

Forbruksmateriell

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (ravgul hette)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2 N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5 ml mikrosentrifugerør
- 96-brønners MIDI-plate
- 96-brønners PCR-plate
- Klebende forsegling
- MIDI-platemagnetstativ
- Klargjør for senere prosedyre:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Om reagenser

- EEW
 - Sørg for at EEW har fått tine ved romtemperatur i minst 2 timer før forvarming på en mikroprøveinkubator.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- Sørg for at EEW har blitt varmet opp i en mikroprøveinkubator i 30 minutter før HYB-programmet avsluttes.
 - La EEW stå i mikroprøveinkubator når den ikke er i bruk. EEW skal være oppvarmet gjennom hele protokollen.
 - Kan være uklar etter å ha nådd romtemperatur.
 - Kan se gul ut.
- SMB3
 - SMB3 må nå romtemperatur før bruk.

Klargjøring

1. Klargjør følgende forbruksmateriell.

Vare	Oppbevaring	Instruksjoner
SMB3	2 °C til 8 °C	La stå i 2 timer for å oppnå romtemperatur. Først vender og så roterer du til den er fullstendig resuspendert.
EEW (ravgult rør)	-25 °C til -15 °C	Etter inkubasjon ved romtemperatur i 2 timer forvarmes den på en mikroprøveinkubator til den aktuelle temperaturen for hybridisering og fanging i 30 minutter før HYB-programmet avsluttes.
EE1	-25 °C til -15 °C	La tine ved romtemperatur, og deretter roterer du den.
HP3	-25 °C til -15 °C	La tine ved romtemperatur, og deretter roterer du den.
ET2	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur. Roter for å blande.
EPM	-25 °C til -15 °C	La tine på is i én time. Bland ved å vende og deretter sentrifugere et kort øyeblikk. Sett til side på is.
PPC	-25 °C til -15 °C	La tine på is i én time. Roter for å blande, sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Sett til side på is.

2. Forvarm én mikroprøveinkubator med en MIDI-varmeblokkinnsett for å inkubere prøveplaten til én av følgende temperaturer. En valgfri andre mikroprøveinkubator kan brukes til å forvarme EEW. La EEW hvile oppå MIDI-varmeblokkinnsetten.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer per probepaneler] 58 °C
 - [Somatisk variantbetegnelse] 58 °C
 - [Alle andre] 62 °C

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Prosedyre

Fange

1. Tilsett SMB3 i den tilsvarende brønnen i en MIDI-plate på følgende måte.
 - [gDNA av høy kvalitet] Tilsett 250 µl SMB3.
 - [gDNA ekstrahert fra FFPE] Tilsett 62,5 µl SMB3.
2. Bruk en dråpeteller satt til 100 µl for gDNA av høy kvalitet eller 25 µl for FFPE, og overfør hvert sammenslått bibliotek fra 96-brønners PCR-platen til den tilsvarende brønnen i den nye MIDI-platen.
3. Forsegl platen og rist ved 1200 o/min i 4 minutter.
4. Hvis det oppstår sprut, sentrifugerer du platen et kort øyeblikk.
5. Plasser platen med de sammenslåtte bibliotekene på MIDI-varmeblokkinnsetsen på mikroprøveinkubatoren, under EEW-røret, lukk lokket, og deretter inkuberer du i 15 minutter ved den aktuelle temperaturen:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer probepanel] 58 °C
 - [Somatisk variantbetegnelse] 58 °C
 - [Alle andre] 62 °C
6. Fjern platen med de sammenslåtte bibliotekene, og sentrifuger ved 280 × g i 30 sekunder.
7. Plasser platen på et MIDI-platemagnetstativ umiddelbart, og vent til væsken er klar (2 minutter).
8. [gDNA av høy kvalitet] Bruk en dråpeteller satt til 200 µl til å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
9. [gDNA ekstrahert fra FFPE] Bruk en dråpeteller satt til 90 µl til å fjerne og kaste all supernatant fra hver brønn uten å forstyrre kulepelleten.
10. Fjern og kast alle rester av supernatant.

Vaske

1. Fjern fra magnetstativet.
2. [gDNA av høy kvalitet] Fjern raskt EEW fra mikroprøveinkubatoren, og tilsett 200 µl i hver brønn.
3. [gDNA ekstrahert fra FFPE] Fjern raskt EEW fra mikroprøveinkubatoren, og tilsett 50 µl i hver brønn.
4. Hell ubrukt EEW tilbake i mikroprøveinkubatoren, og hold den oppvarmet.
5. Forsegl og rist ved 1800 o/min i 4 minutter.
6. Plasser prøveplaten på MIDI-varmeblokkinnsetsen i mikroprøveinkubatoren, under EEW-røret, lukk lokket, og deretter inkuberer du i 5 minutter ved den aktuelle temperaturen:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer probepaneler] 58 °C
 - [Somatisk variantbetegnelse] 58 °C
 - [Alle andre paneler] 62 °C

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

7. Plasser platen på et MIDI-platemagnetstativ umiddelbart, og vent til væsken er klar (2 minutter).
8. Bruk en dråpeteller satt til 200 µl for gDNA av høy kvalitet eller 50 µl for FFPE, fjern og kast all supernatant fra hver brønn.
9. Gjenta trinn 1–8 to ganger for totalt tre vasker.

Overføre vask

1. Fjern fra magnetstativet.
2. [gDNA av høy kvalitet] Fjern raskt EEW fra mikroprøveinkubatoren, og tilsett 200 µl i hver brønn.
3. [gDNA ekstrahert fra FFPE] Fjern raskt EEW fra mikroprøveinkubatoren, og tilsett 50 µl i hver brønn.
4. Forsegl og rist ved 1800 o/min i 4 minutter. Hvis det oppstår sprut, reduserer du hastigheten til 1600 o/min.
5. Overfør resuspendert kuleoppløsning til en ny MIDI-plate.
Det kan hende at noe prøve blir igjen i brønnen.



FORSIKTIG

Overføring av reagens minimerer carryover av rester av reagenser som kan hemme nedstrøms-PCR.

6. Plasser prøveplaten på MIDI-varmeblokkinnsett på mikroprøveinkubatoren, lukk lokket, og deretter inkuberer du i 5 minutter ved den aktuelle temperaturen:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer probepaneler] 58 °C
 - [Somatisk variantbetegnelse] 58 °C
 - [Alle andre] 62 °C
7. Plasser platen på et MIDI-platemagnetstativ umiddelbart, og vent til væsken er klar (2 minutter).
8. Bruk en dråpeteller satt til 200 µl for gDNA av høy kvalitet eller 50 µl for FFPE, og fjern og kast all supernatant fra hver brønn.
9. Sentrifuger platen ved 280 × g i 30 sekunder.
10. Plasser på et MIDI-platemagnetstativ i 10 sekunder.
11. Bruk en 20 µl dråpeteller til å fjerne og kaste rester av væske fra hver brønn.
12. Gå umiddelbart videre til [Eluere på side 42](#) for å forhindre overtøking av kulene og tap av bibliotekproduksjon.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Eluere

1. Kombiner følgende volumer for å klargjøre en hovedblanding med eluering. Hvert volum multipliseres med antall sammenslåtte biblioteker som skal behandles.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Ekstra reagensoverskudd er inkludert i volumet.
2. Roter, og sentrifuger deretter et kort øyeblikk.
3. Fjern MIDI-platen fra magnetstativet.
4. Tilsett 23 µl hovedblanding med eluering i hver brønn.
5. Forsegl platen og rist ved 1800 o/min i 2 minutter.
6. Inkuber platen ved romtemperatur i 2 minutter.
7. Sentrifuger ved $280 \times g$ i 30 sekunder.
8. Plasser på et MIDI-platemagnetstativ, og vent til væsken er klar (2 minutter).
9. Overfør 21 µl supernatant fra MIDI-platen til tilsvarende brønn i en ny 96-brønners PCR-plate.
10. Kast MIDI-platen.
11. Tilsett 4 µl ET2 i hver brønn som inneholder 21 µl supernatant.
12. Still inn dråpetelleren på 20 µl, og pipetter hver brønn sakte 10 ganger for å blande.
13. Forsegl platen og sentrifuger deretter ved $280 \times g$ i 10 sekunder.
14. Inkuber platen i 1 minutt ved romtemperatur.

Forsterke anrikt bibliotek

Dette trinnet bruker PCR til å amplifisere det anrikede biblioteket.

Forbruksmateriell

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Klebende forsegling

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Klargjøring

1. Klargjør følgende forbruksmaterieill:

Vare	Oppbevaring	Instruksjoner
EPM	-25 °C til -15 °C	La tine ved 4 °C eller på is i én time. Bland ved å vende og deretter sentrifugere et kort øyeblikk. Sett til side på is.
PPC	-25 °C til -15 °C	La tine ved 4 °C på is i én time. Roter for å blande, sentrifuger deretter et kort øyeblikk. Sett til side på is.

2. Lagre følgende AMP-program på en termosyklus ved hjelp av riktig antall PCR-sykluser, som er oppgitt i tabellen som følger.

- Velg alternativet for å varme opp lokk, og still inn på 100 °C
- Still inn reaksjonsvolumet på 50 µl
- 98 °C i 45 sekunder
- (X) sykluser med:
 - 98 °C i 30 sekunder
 - 60 °C i 30 sekunder
 - 72°C i 30 sekunder
- 72 °C i 5 minutter
- Holdes på 10 °C

Total kjøringstid er ~35 minutter.

Prøve- og paneltype	(X) sykluser
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) for gDNA av høy kvalitet	10
Illumina Exome Panel (CEX) for FFPE	12
Alle andre prøver og paneler	12 ¹²³⁴

¹ Kan justeres opp til 15 sykluser for små tredjepartspaneler gjennom påfølgende optimalisering. Ved bruk av FFPE kan antall sykluser justeres opp til 17.

² Kan justeres opp til 17 sykluser for tredjepartspaneler som kun har 500 prober. Ved bruk av FFPE kan antall sykluser justeres opp til 19.

³ Kan justeres opp til 14 sykluser for FFPE-prøver.

⁴ Økning av antall PCR-sykluser kan føre til en høyere duplikatfrekvens og mindre fragmentstørrelser for FFPE-prøver.

Prosedyre

1. Tilsett 5 µl PPC i hver brønn.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

2. Tilsett 20 µl EPM i hver brønn.
3. Forsegl platen og rist ved 1200 o/min i 1 minutt.
4. Sentrifuger platen ved 280 × g i 10 sekunder.
5. Plasser på den forhåndsprogrammerte termosykleren, og kjør AMP-programmet.

SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, oppbevar ved 2 °C til 8 °C i opptil to dager. La eventuelt være på termosykleren i opptil 24 timer.

Rense forsterket anriket bibliotek

Dette trinnet bruker Cleanup Beads til å rense det anrikede biblioteket og fjerne uønskede produkter.

Forbruksmateriell

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Nylig klargjort 80 % etanol (EtOH)
- Klebende forseglinger
- 96-brønners MIDI-plate
- 96-brønners PCR-plate
- MIDI-platemagnetstativ

Om reagenser

- Cleanup Beads
 - Roter før hver bruk.
 - Roter hyppig for å sørge for at kulene blir jevnt fordelt.
 - Aspirer og dispenser sakte med tanke på oppløsningens viskositet.

Klargjøring

1. Klargjør følgende forbruksmateriell.

Vare	Oppbevaring	Instruksjoner
CB	Romtemperatur	Roter og vend for å blande til væskens farge er homogen.
RSB	2 °C til 8 °C	La nå romtemperatur. Roter for å blande.

2. Klargjør ny 80 % EtOH fra absolutt etanol.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Prosedyre

1. Sentrifuger PCR-platen ved 280 × g i 10 sekunder.
2. Roter CB 3 ganger i 10 sekunder, og deretter vender du den.
3. Tilsett 40,5 µl CB i hver brønn i en ny **MIDI**-plate.
4. Overfør 45 µl fra hver brønn i PCR-platen til tilsvarende brønn i MIDI-platen.
5. Platen forsegles og ristes ved 1800 o/min i 1 minutt.
6. MIDI-platen inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
7. Sentrifuger ved 280 × g i 10 sekunder.
8. Plasser på et MIDI-platemagnetstativ, og vent til væsken er klar (5 minutter).
9. Bruk en dråpeteller satt til 95 µl, og fjern og kast all supernatant fra hver brønn.
10. Vask to ganger på følgende måte.
 - a. Med platen på magnetstativet tilsetter du 200 µl ny 80 % EtOH uten å blande.
 - b. Inkuber i 30 sekunder.
 - c. Fjern og kast supernatant uten å forstyrre kulene.
11. La lufttørke på magnetstativet i 5 minutter.
12. Under lufttørking kan du bruke en 20 µl dråpeteller til å fjerne og kaste rester av EtOH fra hver brønn.
13. Fjern fra magnetstativet, og tilsett 32 µl RSB i hver brønn.
14. Platen forsegles og ristes ved 1800 o/min i 1 minutt.
15. Platen inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
16. Sentrifuger ved 280 × g i 10 sekunder.
17. Plasser på et MIDI-platemagnetstativ, og vent til væsken er klar (2 minutter).
18. Overfør 30 µl supernatant fra 96-brønners MIDI-platen til tilsvarende brønn i en ny PCR-plate.
19. Kast MIDI-platen.

SIKKERT STOPPUNKT

Hvis du skal stoppe, må du forsegle platen og oppbevare den ved -25 °C til -15 °C i opptil 7 dager.

Kontrollere anrikede biblioteker

Til å kvantifisere dobbeltstrenget gDNA-innmating brukes en fluorescensbasert metode som benytter interkalerende fargestoff. Unngå metoder som måler total nukleinsyre, f.eks. NanoDrop eller andre UV-absorbansemetoder.

1. Kjør 1 µl av de anrikede bibliotekene ved hjelp av din kvantifiseringsmetode.

MERK Total probemolaritet påvirker bibliotekproduksjonen etter anrikning proporsjonalt.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Forvent en gjennomsnittlig fragmentstørrelse på 125–235 bp og fordeling av DNA-fragmenter med et størrelsesområde fra ~200 bp til ~1000 bp.

Fortynne biblioteker til startkonsentrasjonen

Dette trinnet fortynner bibliotekene til startkonsentrasjonen for sekvenseringssystemet ditt, og er det første trinnet i en seriell fortynning. Etter fortynning til startkonsentrasjonen er bibliotekene klare til å denatureres og fortynnes til den endelige lastekonsentrasjonen.

For sekvensering – uavhengig av anrikningsprobepanelet du bruker – anbefaler Illumina å sette opp en paired-end-kjøring med 151 sykluser per avlesning (2 × 151) og 10 sykluser per indeksavlesning. Hvis du vil ha færre overlappede avlesninger eller mindre rå dekning, kan du sekvensere ned til 2 × 126 eller 2 × 101.

1. Beregn molaritetsverdien for biblioteket eller de sammenslåtte bibliotekene ved hjelp av den følgende formelen.
 - For biblioteker som er kvalifisert på en DNA-fragmentanalysator brukes den gjennomsnittlige størrelsen som er oppnådd for biblioteket.
 - For alle andre kvalifiseringsmetoder brukes 350 bp som den gjennomsnittlige bibliotekstørrelsen.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{gjennomsnittlig bibliotekstørrelse (bp)}} = \text{molaritet (nM)}$$

Hvis for eksempel bibliotekkonsentrasjonen er 20 ng/μl og gjennomsnittlig størrelse er 350 bp, er den resulterende molaritetsverdien 86,58 nM.

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

2. Bruk molaritetsverdien til å beregne volumene av RSB og bibliotek som er nødvendige for å fortynne biblioteker til startkonsentrasjonen for systemet ditt.

sekvenseringssystem	Minstekrav til bibliotekvolum (μl)	Startkonsentrasjon (nM)	Endelig lastekonsentrasjon (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) eller 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM er startkonsentrasjonen for en endelig lastekonsentrasjon på 350 pM. Juster eventuelt den endelige lastekonsentrasjonen ved å bruke følgende tabell.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Endelig lastekonsentrasjon (pM)	Konsentrasjon for sammenslåing av biblioteker (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Fortynne biblioteker ved hjelp av RSB:

- **Biblioteker kvantifisert som en multiplekset biblioteksammenslåing**– Fortynn sammenslåingen til startkonsentrasjonen for systemet ditt.
- **Biblioteker kvantifisert individuelt**– Fortynn hvert bibliotek til startkonsentrasjonen for systemet ditt. Tilsett 10 µl av hvert fortynnet bibliotek i et rør for å lage en multiplekset biblioteksammenslåing.

4. Følg instruksjonene for denaturering og fortynning for systemet ditt for å fortynne til den endelige konsentrasjonen.

- Se [Klargjøre NextSeq 550Dx-sekvensering på side 47](#) for informasjon om NextSeq 550Dx-systemet.
- Se [Klargjøre MiSeqDx-sekvensering på side 49](#) for MiSeqDx-systemet.
- Se [Klargjøre NovaSeq 6000Dx-sekvensering på side 50](#) for NovaSeq 6000Dx-systemet.

De endelige lastekonsentrasjonene er et startpunkt og en generell retningslinje. Optimaliser konsentrasjoner for arbeidsflyten og kvantifiseringsmetoden over påfølgende sekvenseringskjøringer eller ved strømningscelletitrering.

Klargjøre NextSeq 550Dx-sekvensering

Bruk følgende instruksjoner for denaturering og fortynning av biblioteker for sekvensering på NextSeq 550Dx-sekvenseringssystemet.

Forbruksmaterieil

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

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Klargjøring

Klargjør en *fersk* fortytning på 0,2 N NaOH for å denaturere biblioteker for sekvensering. For å forhindre at små pipetteringsfeil påvirker den endelige NaOH -konsentrasjonen, tilberedes ekstra volum.



FORSIKTIG

Nyfortynnet 0,2 N NaOH er avgjørende for denatureringsprosessen. Feil denaturering kan redusere produksjonen.

1. Kombiner følgende volumer i et mikrosentrifugerør for å fortynne 1 N NaOH til 0,2 N NaOH:

1. Klargjør følgende forbruksmaterieil.

Vare	Oppbevaring	Instruksjoner
HT1	-25 °C til -15 °C	Tin ved romtemperatur. Oppbevares ved 2 °C til 8 °C til du er klar til å fortynne denaturerte biblioteker.

2. Kombiner følgende volumer i et mikrosentrifugerør for å klargjøre en ny fortytning av NaOH:

- Vann av laboratorie kvalitet (800 µl)
- 1 N NaOH (200 µl)

Det gir 1 ml 0,2 N NaOH.

3. Vend røret flere ganger for å blande.

4. Kombiner følgende volumer i et mikrosentrifugerør for å klargjøre 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

- Vann av laboratorie kvalitet (800 µl)
- 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

Det gir 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

MERK Røret må være korket. Den nye fortytningen må brukes innen **12 timer**.

Denaturere biblioteker

1. Kombiner følgende volumer med bibliotek og nylig fortynnet 0,2 N NaOH i et mikrosentrifugerør.

- 10 µl bibliotek
- 10 µl 0,2 N NaOH

2. Roter et kort øyeblikk, og sentrifugerer deretter ved 280 × g i 1 minutt.

3. Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.

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

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Fortynne denaturerte biblioteker til 20 pM

1. Tilsett 970 µl forhåndskjølt HT1 i røret med denaturerte biblioteker.
Det gir et denaturert bibliotek på 20 pM.
2. Roter et kort øyeblikk, og sentrifugerer deretter ved $280 \times g$ i 1 minutt.
3. Bibliotekene på 20 pM plasseres på is til du er klar til å gå videre til endelig fortynning.

Fortynne biblioteker til lastekonsentrasjon

1. Tilsett følgende volumer for å fortynne denaturert biblioteksløsning på 20 pM til 1,2 pM.
 - Denaturert biblioteksløsning (78 µl)
 - Forhåndskjølt HT1 (1222 µl)Totalt volum er 1,3 ml ved 1,2 pM.
2. Bland ved å vende og deretter pulssentrifugere.
3. Gå videre til sekvensering. Du finner instruksjoner i *referanseveiledningen for NextSeq 550Dx-instrumentet* (dokumentnr. 1000000009513).

Klargjøre MiSeqDx-sekvensering

Bruk følgende instruksjoner for denaturering og fortynning av biblioteker for sekvensering på MiSeqDx-sekvenseringssystemet.

Forbruksmaterieil

- HT1 (hybridiseringsbuffer)
- 1 N NaOH

Klargjøring

Klargjør en *fersk* fortynning på 0,2 N NaOH for å denaturere biblioteker for sekvensering. For å forhindre at små pipetteringsfeil påvirker den endelige NaOH-konsentrasjonen, tilberedes ekstra volum.



FORSIKTIG

Nyfortynnet 0,2 N NaOH er avgjørende for denatureringsprosessen. Feil denaturering kan redusere produksjonen.

1. Kombiner følgende volumer i et mikrosentrifugerør for å fortynne 1 N NaOH til 0,2 N NaOH:
1. Klargjør følgende forbruksmaterieil.

Vare	Oppbevaring	Instruksjoner
HT1	-25 °C til -15 °C	Tin ved romtemperatur. Oppbevares ved 2 °C til 8 °C til du er klar til å fortynne denaturerte biblioteker.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

2. Kombiner følgende volumer i et mikrosentrifugerør for å klargjøre en ny fortynning av NaOH:
 - Vann av laboratorie kvalitet (800 µl)
 - 1 N NaOH (200 µl)Det gir 1 ml 0,2 N NaOH.

MERK Røret må være korket. Den nye fortynningen må brukes innen **12 timer**.

Denaturere et 4 nM-bibliotek

1. Kombiner følgende volumer i et mikrosentrifugerør.
 - Bibliotek på 4 nM (5 µl)
 - 0,2 N NaOH (5 µl)
2. Roter et kort øyeblikk, og sentrifugerer deretter ved 280 × g i 1 minutt.
3. Inkuberes ved romtemperatur i 5 minutter.
4. Tilsett 990 µl forhåndskjølt HT1 i røret som inneholder denaturert bibliotek.
Det gir 1 ml denaturert bibliotek på 20 pM.

Fortynne denaturert 20 pM-bibliotek

1. Fortynnes til ønsket konsentrasjon ved hjelp av følgende volumer.

Konsentrasjon	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Bibliotek på 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Forhåndskjølt HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Bland ved å vende og deretter pulssentrifugere.
3. Gå videre til sekvensering. Se instruksjoner i *Referanseveiledning for MiSeqDx-instrumentet for MOS v4* (dokumentnr. 1000000157953).

Klargjøre NovaSeq 6000Dx-sekvensering

Bruk følgende instruksjoner for denaturering og fortynning av biblioteker for sekvensering på NovaSeq 6000Dx-sekvenseringssystemet.

Forbruksmaterieill

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

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- NovaSeq 6000Dx Library Tube

Klargjøring

Klargjør en *fersk* fortytning på 0,2 N NaOH for å denaturere biblioteker for sekvensering. For å forhindre at små pipetteringsfeil påvirker den endelige NaOH -konsentrasjonen, tilberedes ekstra volum.



FORSIKTIG

Nyfortynnet 0,2 N NaOH er avgjørende for denatureringsprosessen. Feil denaturering kan redusere produksjonen.

1. Kombiner følgende volumer i et mikrosentrifugerør for å fortynne 1 N NaOH til 0,2 N NaOH:

Tabell 4 S2-modus

Reagens	Volum for én strømningscelle (µl)	Volum for to strømningsceller (µl)
Vann av laboratoriekvalitet	40	80
Original 1 N NaOH	10	20

Disse volumene resulterer i 50 µl 0,2 N NaOH for én strømningscelle eller 100 µl 0,2 N NaOH for to strømningsceller.

Tabell 5 S4-modus

Reagens	Volum for én strømningscelle (µl)	Volum for to strømningsceller (µl)
Vann av laboratoriekvalitet	80	160
Original 1 N NaOH	20	40

Disse volumene resulterer i 100 µl 0,2 N NaOH for én strømningscelle eller 200 µl 0,2 N NaOH for to strømningsceller.

2. Vend flere ganger for å blande, eller roter grundig.

MERK Røret må være korket. Den nye fortytningen må brukes innen **12 timer**.

Opprette et normalisert bibliotek for sammenslåing

Lastekonsentrasjonen kan variere avhengig av bibliotekklargjøring, kvantifisering og normaliseringsmetoder. Bruk følgende instruksjoner for å normalisere bibliotekene til riktig konsentrasjon og deretter sammenslåing. Biblioteker sekvensert på samme strømningscelle må kombineres til en enkelt normalisert sammenslåing.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

MERK Maksimalt antall prøver som kan kjøres per bane med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, er 192. Denne grensen skyldes det totale antallet UD-indekser i sett A og B.

Normalisere biblioteker for sammenslåing

- Bestem aktuell konsentrasjon for sammenslåing av bibliotek basert på ønsket endelig lastekonsentrasjon.
 - Til en endelig lastekonsentrasjon på 350 pM kreves en konsentrasjon for sammenslåing av bibliotek på 1,75 nM.
 - Se [Fortynne biblioteker til startkonsentrasjonen på side 46](#) for å bestemme konsentrasjon for sammenslåing av biblioteker for en annen endelig lastekonsentrasjon.
- Normaliser bibliotekene til ønsket konsentrasjon for sammenslåing av biblioteker ved å bruke 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
Se [Kalkulator for sammenslåing](#) på Illuminas nettside for å få hjelp med å fortynne biblioteker til riktig konsentrasjon.

Anbefalte lastekonsentrasjoner

Den optimale DNA-lastekonsentrasjonen avhenger av bibliotekstypen og størrelsen på innsatsen. For biblioteker > 450 bp kan høyere lastekonsentrasjoner være nødvendig.

Slå sammen normaliserte biblioteker og legge til valgfri PhiX-kontroll

- Kombiner egnet volum av hver normalisert bibliotek i et nytt mikrosentrifugerør for å få ett av følgende sluttvolumer:

Modus	Endelig volum (µl)
S2	150
S4	310

- [Valgfritt]** Tilsett i 1 % ikke-denaturert PhiX på følgende måte.
 - Fortynn 10 nM PhiX til 2,5 nM med 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
 - Tilsett egnet volum av ikke-denaturert 2,5 nM PhiX til røret med ikke-denaturert biblioteksammenslåing.

Modus	Ikke-denaturert 2,5 nM PhiX (µl)	Ikke-denaturert biblioteksammenslåing (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Ved tilsetting i PhiX er 1 % den anbefalte mengden for godt balanserte biblioteker. Biblioteker med lavt mangfold kan kreve mer. Kontakt Illuminas tekniske støtte for å bruke en PhiX-kontroll med biblioteker med lavt mangfold.

Denature bibliotek for sammenslåing og valgfri PhiX-kontroll

1. Tilsett 0,2 N NaOH i røret med ikke-denaturert biblioteksammenslåing og valgfri PhiX på følgende måte.

Strømningscelle	0,2 N NaOH	Ikke-denaturert biblioteksammenslåing (µl)	Resulterende volum
S2	37	150	187 µl, eller 187,9 µl med PhiX
S4	77	310	387 µl, eller 388,9 µl med PhiX

2. Ta på hetten, og roter en kort stund.
3. Sentrifuger ved 280 × g i opptil 1 minutt.
4. Denaturer ved å inkubere ved romtemperatur i 8 minutter.
5. Tilsett 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 på følgende måte for å nøytralisere.

Modus	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Resulterende volum
S2	38	225 µl, eller 225,9 µl med PhiX
S4	78	465 µl, eller 466,9 µl med PhiX

6. Ta på hetten, og roter en kort stund.
7. Sentrifuger ved 280 × g i opptil 1 minutt.
8. Overfør hele volumet av denaturert bibliotek eller denaturert bibliotek og PhiX til NovaSeq 6000Dx Library Tube.
9. Gå videre til sekvensering. Se *produktokumentasjonen for NovaSeq 6000Dx-instrumentet (dokumentnr. 200010105)* for mer informasjon.

Feilsøking

Bruk følgende tabell til å feilsøke problemer i arbeidsflyten. Dersom en sekvenseringskjøring eller bibliotekklargjøring for en prøve mislykkes to ganger, kan det være nødvendig med ytterligere feilsøking. Kontakt Illuminas tekniske støtte.

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
Sekvenseringskjøringen samsvarer ikke med kvalitetskontrollspesifikasjonene	Bruker- eller laboratoriestyrsfeil i analysearbeidsflyten	<p>Kvalifiser anrikede biblioteker for å sikre riktig bibliotekproduksjon og fordeling av fragmentstørrelser. Gjenta bibliotekklargjøring fra ett av følgende trinn avhengig av hvor den mistenkte bruks- eller utstyrsfeilen oppsto. Kontakt Illuminas tekniske støtte for å feilsøke kjøringen hvis det har oppstått ukjente eller andre feil.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sekvenser biblioteker på nytt. Se Klargjøre NextSeq 550Dx-sekvensering på side 47, Klargjøre MiSeqDx-sekvensering på side 49 eller Klargjøre NovaSeq 6000Dx-sekvensering på side 50. • Anrik biblioteker på nytt. Se Hybridisere prober på side 35. • Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Bruksanvisning på side 20.
	Instrumentproblem	Kontakt Illuminas tekniske støtte.
Feil med FASTQ-generering eller generell sekvenseringsfeil (f.eks. nettverksfeil, feil med innlasting/utlasting av reagenser osv.)	Programvare- eller instrumentproblem	<p>Se <i>Veiledning for Local Run Manager-programvare (dokumentnr. 100000002702)</i> for hjelp til FASTQ-generering, eller se <i>Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)</i>, <i>Referanseveiledning for MiSeqDx-instrumentet for MOS v4 (dokumentnr. 1000000157953)</i> eller <i>Produktdokumentasjonen for NovaSeq 6000Dx-instrumentet (dokumentnr. 200010105)</i>.</p> <p>Kontakt Illuminas tekniske støtte for å få mer hjelp.</p>

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Observasjon	Mulig årsak	Anbefalt handling
DNA-bibliotek genererer ikke tilstrekkelig produksjon for sekvenseringslasting	Krav til prøveinngang ble ikke oppfylt	Sørg for riktig prøveinnmating, og gjenta bibliotekklargjøring. Se Anbefalinger for prøveinnmating på side 16 .
	Bruks- eller utstyrfeil i analysearbeidsflyten	Gjenta bibliotekklargjøring fra ett av følgende trinn avhengig av hvor den mistenkte bruks- eller utstyrfeilen oppsto. Kontakt Illuminas tekniske støtte for å feilsøke kjøringen hvis det har oppstått ukjente eller andre feil. <ul style="list-style-type: none">• Sekvenser biblioteker på nytt. Se Klargjøre NextSeq 550Dx-sekvensering på side 47, Klargjøre MiSeqDx-sekvensering på side 49 eller Klargjøre NovaSeq 6000Dx-sekvensering på side 50.• Anrik biblioteker på nytt. Se Hybridisere prober på side 35.• Start bibliotekklargjøring fra begynnelsen av arbeidsflyten. Se Bruksanvisning på side 20.
	Krav til anrikningsprobepanel ble ikke oppfylt	Sørg for riktig anrikningsprobepanel, og gjenta bibliotekklargjøring. Se Krav til anrikningsprobepanel på side 9 .

Ytelseskarakteristikker

Se *pakningsvedlegget for NovaSeq 6000Dx-instrumentet (dokumentnr. 200025276)* for ytelseskarakteristikker som gjelder DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application ved bruk med NovaSeq 6000Dx.

Ytelse med eksompaneler

Ytelse med eksompaneler ble testet ved å bruke den laveste (50 ng) og den høyeste (1000 ng) anbefalte innmatingen av Coriell Cell Line gDNA NA12878, med et kjent sannhetssett for deteksjon av kimbanevarianter (Coriell platinagenom). Eksompanel 1 (45 Mb) og eksompanel 2 (36,8 Mb) ble brukt som representative paneler. 24 tekniske replikater ble testet gjennom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analyse ved bruk av eksompanel 1 (45 Mb) i to 12-pleksanrikningsreaksjoner. 12 tekniske replikater ble testet med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen ved bruk av eksompanel 2 (36,8 Mb) i en enkel 12-pleksanrikningsreaksjon. De anrikede bibliotekene ble sekvensert på NextSeq 550Dx-sekvenseringssystemet med DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager-modulen.

Tabellen som følger viser gjennomsnittsverdiene for sekundær sekvensering og ytelsesverdier for variantbetegnelser for de tekniske replikatene som er testet med hvert panel.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Tabell 6 Analyseytelse med to hele eksompaneler

Panel	Polstret unik avlesnings-anriking	Deknings-overens-stemmelse	Fragment-lengde-median	SNV-tilbake-kalling ¹	SNV-presisjon ²	Indeltilbake-kalling ¹	Indelpresisjon ²
Eksompanel 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Eksompanel 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹Tilbakekalling=positive/(sanne positive + falske negative)

²Presisjon=sanne positive/(sanne positive + falske positive)

Deteksjonsgrense

DNA-referansestandard Horizon HD799 ble brukt for å teste deteksjonsgrensen. HD799 består av moderat kompromittert formalinbehandlet DNA med kjente SNV-er i allelfrekvenser i området 1–24,5 %. Den laveste anbefalte DNA-innmatingen (50 ng) ble brukt, og deteksjonshastigheten til SNV-er med $\geq 5,0$ % allelfrekvens for variant (VAF) ble evaluert. 16 tekniske replikater testet med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen ved hjelp av FFPE-arbeidsflyten, anriket med et pan-kreftanrikningspanel (1,94 Mb) i 16 (1-pleks)-anrikninger, og deretter sekvensert på et NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulen.

Alle prøver besto kravene til panelspesifikk prøveytelse, som vist i den følgende tabellen.

Tabell 7 Prøveytelse for deteksjonsgrense

Panel	Variantedeteksjonshastighet for SNV-er på $\geq 5,0$ % VAF	Gjennomsnitt Dekningsoverensstemmelse
Pan-kreftanrikningspanel (1,94 Mb, 523 gener)	100 %	99 %

Forstyrrende stoffer

Virkingen av potensielle interferenter ble vurdert i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ved å evaluere analysens ytelse ved tilstedeværelse av interfererende stoffer.

Interferens med fullblod

Paracetamol (eksogen forbindelse, legemiddel), kreatinin og triglyserider (endogene metabolitter) ble testet ved å tilsette dem i prøver av humant fullblod før DNA-ekstraksjon. For å vurdere interferensen som resulterte fra blodprøvetaking (kort prøvetaking), ble EDTA også tilsatt fullblodprøvene. Dessuten ble etanol av molekylær kvalitet tilsatt i DNA ekstrahert fra fullblod for å vurdere interferensen som resulterte fra prøveklargjøring.

Tabellen som følger viser testkonsentrasjonene per interferent.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Tabell 8 Potensielt interfererende stoffer og konsentrasjoner testet i fullblod

Teststoff	Testkonsentrasjon
Paracetamol	15,6 mg/dl* Tre ganger den høyeste konsentrasjonen som forventes etter en terapeutisk legemiddeldose.
Kreatinin	15 mg/dl* Høyeste observerte konsentrasjon i populasjon.
Triglyserider	1,5 g/dl* Høyeste observerte konsentrasjon i populasjon.
EDTA	6 mg/ml Tre ganger konsentrasjonen som forventes i blod, tatt i EDTA-rør.
Etanol av molekylær kvalitet	15 % v/v I eluatet etter DNA-ekstraksjon.

*I henhold til CLSI EP37-ED1:2018

Per interfererende stoff ble 12 tekniske replikater testet med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen, anriket med et eksompanel 1 (45 Mb) en enkelt (12-pleks) anrikning, og deretter sekvensert på et NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulen.

For de testede stoffene oppfylte alle 12 prøver kravene til prøveytelse, og det ble ikke observert interferens med analysens ytelse.

Interferens i FFPE-vev

To kolorektale FFPE-prøver ble testet i nærvær og fravær av hemoglobin ved 0,1 mg per 10 µm FFPE-snitt for å representere et verste tenkelige utfall med 50 % FFPE-vevsprøvekontaminasjon i blod med høyt hemoglobinnivå. Prøvene ble testet med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen ved hjelp av pankreftanrikningspanel 1 (1,94 Mb) som et representativt panel i enkeltpleks-anrikninger. De anrikede bibliotekene ble deretter sekvensert på et NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulen. Alle prøver oppfylte kravene til prøveytelse, og det ble dokumentert at hemoglobin ikke interfererer med analysens ytelse.

For å vurdere interferens som følge av prøveklargjøring ble to eksogene forbindelser tilsatt i DNA ekstrahert fra en FFPE-vevsprøve av blærekreft. De eksogene stoffene som ble testet, er ekstraksjonsoppløsninger som vanligvis brukes under DNA-ekstraksjonsprosessen, og som er oppført med testede mengder i tabellen som følger.

Teststoffoppløsningene er kommersielt tilgjengelig i kolonnebaserte DNA-isolasjonssett.

Tabell 9 Potensielt interferer-ende eksogene stoffer og konsentrasjoner testet i FFPE

Teststoff	Testkonsentrasjon (µl / 30 µl eluat)
Deparafiniseringsoppløsning	113 x 10 ⁻⁶
Vaskebuffer AW2	0,417

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Per interfererende stoff ble åtte tekniske replikater testet med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen, anriket med et pan-kreftanrikingspanel (1,94 Mb) i enkeltpleks-anrikninger, og deretter sekvensert på et NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulen.

For begge de testede stoffene oppfylte alle åtte prøver kravene til prøveytelse, og det ble ikke observert interferens i analysens ytelse.

Krysskontaminasjon

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (kvinne, 10 prøver), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (mann, 12 prøver) og kontroller uten mal (NTC, 2 prøver) ble testet med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen i et sjakkbrettplateoppsett. Alle prøvene brukte den høyeste (1000 ng) gDNA-innmatingsanbefalingen som den strengeste betingelsen for å evaluere krysskontaminasjon av prøver. Testing ble utført to ganger av to separate operatører. Eksompanel 1 (45 Mb) ble i 12-pleksanrikningsreaksjoner. De anrikede bibliotekene ble sekvensert på NextSeq 550Dx med DNA GenerateFASTQ Dx. Evaluering ble gjort ved å vurdere dekningen av det mannlige spesifikke Y-kromosomet i de kvinnelige prøvene ved å sammenligne med bakgrunnsnivåene til en full plate med kvinnelige prøver, samt indeksrepresentasjon av NTC-prøvene.

Tabell 10 Resultater for krysskontaminasjon

Kvinnelige prøver med mannlig Y-kromosomdekning i < 3x baselinestøy	Indeksrepresentasjon i NTC
100 %	< 0,0005 %

Vedlegg: Illumina UD-indeksadaptersekvenser

Disse unike doble (UD) indeksadapterne er anordnet i platen for å håndheve den anbefalte sammenknytningsstrategien. Indeksadapterne er 10 baser lange i stedet for de typiske åtte basene.

Indeks 1-adaptere (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Indeks 2-adaptere (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Sekvensen som følger brukes til adaptertilpasning for Read 1 (Avlesning 1) og Read 2 (Avlesning 2).

CTGTCTCTTATACACATCT

Plate A / sett 1-indeksadaptere

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCCGG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACCTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTGCGA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
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
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

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Plate B / sett 2-indeksadaptere

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTTCGAG
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

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	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	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Indeksnavn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTCGCATT	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

Revisjonshistorikk

Dokument	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 200019584 v02	September 2022	Lagt til innhold for å støtte sekvensering på NovaSeq 6000Dx- instrumentet.
Dokumentnr. 200019584 v01	Mai 2022	Lagt til sekvenssystemnavn og katalognumre. Fjernet unik dobbel indekseringsinformasjon for enkeltindekserte biblioteker.
Dokumentnr. 200019584 v00	Mai 2022	Første versjon.

Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Patenter og varemerker

Dette dokumentet og dets innhold er opphavsrettslig beskyttet for Illumina, Inc. og dets tilknyttede selskaper («Illumina»), og er ment utelukkende for kontraktbruk av kunden i forbindelse med bruk av produktet (produktene) beskrevet her, og for intet annet formål. Dette dokumentet og dets innhold skal ikke brukes eller distribueres til andre formål og/eller på annen måte kommuniseres, fremlegges eller reproduseres på noen måte uten forutgående, skriftlig samtykke fra Illumina. Illumina overfører ikke noen lisens under sitt patent, varemerke, opphavsrett eller sedvanerett eller lignende rettigheter til tredjeparter gjennom dette dokumentet.

Instruksjonene i dette dokumentet skal følges nøyaktig og kun av kvalifisert og tilfredsstillende utdannet personell for å sikre riktig og sikker bruk av produktet (produktene) som er beskrevet i dette dokumentet. Alt innhold i dette dokumentet skal leses fullt ut og være forstått før produktet (produktene) brukes.

HVIS DET UNNLATES Å LESE FULLSTENDIG OG UTTRYKKELEG FØLGE ALLE INSTRUKSJONENE I DETTE DOKUMENTET, KAN DET FØRE TIL SKADE PÅ PRODUKTET (PRODUKTENE), SKADE PÅ PERSONER, INKLUDERT BRUKERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANNEN EIENDOM, OG DETTE VIL UGYLDIGGJØRE EVENTUELL GARANTI SOM GJELDER FOR PRODUKTET (PRODUKTENE).

ILLUMINA PÅTAR SEG IKKE ANSVAR SOM FØLGE AV FEIL BRUK AV PRODUKTET (PRODUKTENE) SOM ER BESKREVET I DETTE DOKUMENTET (INKLUDERT DELER AV DETTE ELLER PROGRAMVARE).

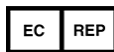
© 2022 Illumina, Inc. Med enerett.

Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. Ytterligere informasjon om varemerker finner du på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformasjon



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California, 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (utenfor Nord-Amerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australsk sponsor

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

Produktmerking

Ønsker du en fullstendig oversikt over symboler som finnes på produktemballasjen og -merkingen, kan du gå til support.illumina.com og lese under fanen *Documentation* (Dokumentasjon) for settet.