

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO
TYLKO NA EKSPORT

Przeznaczenie

Zestaw Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit to zestaw odczynników oraz materiałów eksploatacyjnych przeznaczonych do przygotowywania bibliotek próbek z genomowego DNA pochodzącego z ludzkich komórek i tkanek. Dostarczone przez użytkownika panele sond są wymagane do przygotowania bibliotek ukierunkowanych na określone regiony genomu będące przedmiotem zainteresowania. Wygenerowane biblioteki próbek są przeznaczone do użytku w systemach sekwencjonowania firmy Illumina.

Zasady dotyczące procedury

Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest przeznaczony do przygotowania bibliotek sekwencjonowania DNA wzbogaconych o regiony docelowe z genomowego DNA pochodzącego z ludzkich komórek i tkanek.

Do docelowego wzbogacenia wymagane są dostarczone przez użytkownika panele biotynylowanych oligonukleotydów. Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest zgodny z różnymi rozmiarami paneli, od małych paneli (< 20 000 sond) do dużych paneli (> 200 000 sond). Wygenerowane wzbogacone biblioteki są przeznaczone do sekwencjonowania w systemach sekwencjonowania firmy Illumina.

Procedura Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit obejmuje następujące etapy:

- **Tagmentowane genomowe DNA** – wykorzystuje odczynnik Enrichment BLT Small (eBLTS) do tagmentacji wejściowego DNA. Podczas tagmentacji gDNA jest fragmentowane i znakowane za pomocą adapterów w jednym etapie. Do nasycenia odczynnika eBLTS w reakcji tagmentacji wymagane jest wejściowe DNA w minimalnej ilości 50 ng. Po nasyceniu system eBLTS fragmentuje określoną liczbę cząsteczek DNA w celu wygenerowania znormalizowanych bibliotek o spójnym rozkładzie wielkości fragmentów.
- **Oczyszczanie po tagmentacji** – czyści DNA znakowane adapterem w systemie eBLTS w celu wykorzystania w amplifikacji.
- **Amplifikacja tagmentowanego DNA** – amplifikuje tagmentowane DNA przy użyciu programu PCR o ograniczonym cyklu. Unikalne podwójne indeksy (UD) są dodawane na końcach fragmentów DNA, co umożliwia podwójne, unikalne oznaczanie kodem kreskowym bibliotek DNA i generowanie klastrów podczas sekwencjonowania.
- **Czyszczenie bibliotek** – wykorzystuje kulki w procedurze oczyszczenia i wyboru wielkości amplifikowanych bibliotek DNA.
- **Pulowanie bibliotek** – łączy biblioteki DNA z unikalnymi indeksami w jedną pulę (do 12 bibliotek). Pulowanie bibliotek można przeprowadzić według objętości lub masy.

- **Hybrydyzacja sond** – składa się z reakcji hybrydyzacji, podczas której biblioteki dwuniciowego DNA są denaturowane, a panel biotynylowanych sond DNA ulega hybrydyzacji do docelowych regionów genomowych.
 - Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest zgodny z wieloma panelami. Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nie zawiera panelu wzbogacającego. Panele sond są dostarczane przez użytkownika i muszą spełniać wymagane specyfikacje. Odczynniki z zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit są zgodne zarówno z panelami wzbogacania oligonukleotydów DNA firmy Illumina, jak i innych firm, które spełniają wymagane specyfikacje. Informacje na temat wymaganych specyfikacji paneli innych firm – patrz [Wymagania dotyczące panelu sond wzbogacających na stronie 11](#).
- **Wychwytywanie zhybrydowanych sond** – kulki magnetyczne ze streptawidyną (SMB3) są wykorzystywane do wychwytywania biotynylowanych sond, które uległy hybrydyzacji do docelowych regionów będących przedmiotem zainteresowania.
- **Amplifikacja wzbogaconych bibliotek** – wykorzystuje metodę PCR do amplifikacji wzbogaconych bibliotek.
- **Oczyszczanie zamplifikowanych bibliotek wzbogaconych** – wykorzystuje kulki w procedurze oczyszczenia wzbogaconych bibliotek gotowych do sekwencjonowania.
- **Sekwencjonowanie** – sekwencjonowanie wzbogaconych bibliotek odbywa się w systemach sekwencjonowania MiSeqDx, NextSeq 550Dx lub NovaSeq 6000Dx. W systemach MiSeqDx i NextSeq 550Dx zintegrowany moduł DNA GenerateFASTQ Dx lokalnego menedżera przebiegu jest wykorzystywany do konfiguracji przebiegu sekwencjonowania, monitorowania przebiegu oraz analizy podstawowej (wygenerowania pliku FASTQ na podstawie rozpoznawania nukleotydów). Aplikacja DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application dostępna w przypadku aparatu NovaSeq 6000Dx służy do konfiguracji przebiegu i analizy wtórnej, wykonywanych przy użyciu kilku dostępnych procedur.

Ograniczenia dotyczące procedury

- Do celów diagnostyki *in vitro*.
- Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest zgodny z genomowym DNA pochodzącym z ludzkich komórek i tkanek.
- Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest zgodny z wejściowym dwuniciowym gDNA na poziomie 50–1000 ng. Działania nie można zagwarantować, jeśli ilość materiału wejściowego wykracza poza podane wartości progowe.
- Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nie zawiera odczynników do ekstrakcji DNA. Wyniki testów analitycznych, w tym testów zakłóceń, przedstawione w punkcie [Charakterystyka działania oznaczenia na stronie 61](#), uzyskano z użyciem próbek krwi pełnej i próbek FFPE jako reprezentatywnych typów próbek z reprezentatywnymi zestawami do ekstrakcji DNA. Wszystkie testy diagnostyczne opracowane do użytku z odczynnikami Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit wymagają pełnej walidacji we wszystkich aspektach działania z wybranym zestawem do ekstrakcji DNA.

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nie jest zalecany w przypadku próbek FFPE niskiej jakości o wartości $\Delta Cq > 5$. Użycie próbek o wartości $\Delta Cq > 5$ może zwiększyć prawdopodobieństwo niepowodzenia przygotowania biblioteki lub obniżyć wydajność oznaczenia.
- Odczynniki Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit zostały skonfigurowane i przetestowane pod kątem próbki wejściowej, reakcji wzbogacania i krotności wskazanych w poniższej tabeli.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Próbka wejściowa	Reakcje wzbogacania	Krotność wzbogacania
Zestaw na 16 próbek	Niska jakość (FFPE)	16 reakcji	1-krotność
Zestaw na 96 próbek	Wysoka jakość (np. krew pełna)	8 reakcji	12-krotność

- Przetwarzanie wejściowej próbki FFPE zostało przetestowane i jest zalecane wyłącznie w przypadku reakcji wzbogacania 1-krotnego z użyciem zestawu na 16 próbek.
- W przypadku zestawu na 96 próbek możliwe są niestandardowe krotności (2-krotność do 11-krotności), ale istnieją następujące ograniczenia:
 - Przetwarzanie próbek w reakcjach wzbogacania od 2-krotnych do 11-krotnych zmniejsza przepustowość zestawu.
 - Nie można zagwarantować optymalnych wyników. Uzyskanie odpowiedniej wydajności wzbogacania dla krotności niestandardowych może wymagać dodatkowej optymalizacji.
 - W przypadku strategii pulowania o niskiej krotności (2-krotność do 8-krotności) wymagany jest wybór adapterów indeksowanych o różnych sekwencjach, aby zoptymalizować balans kolorów w celu pomyślnego sekwencjonowania i analizy danych. Moduł DNA GenerateFASTQ Dx w aparatach MiSeqDx i NextSeq 550Dx udostępnia opcje do zbalansowanych kolorystycznie kombinacji indeksów podczas konfiguracji przebiegu. Więcej informacji na temat strategii pulowania – patrz [Metody pulowania na stronie 35](#).
- Wykorzystanie zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest ograniczone do dostarczania wzbogaconych bibliotek, które są poddawane sekwencjonowaniu wyłącznie w aparatach MiSeqDx, NextSeq 550Dx i NovaSeq 6000Dx. Użycie innych systemów sekwencjonowania wymaga pełnej walidacji wszystkich aspektów działania.
- Panele wzbogacające nie są częścią tego produktu. Wyniki badań analitycznych przedstawione w punkcie [Charakterystyka działania oznaczenia na stronie 61](#) zostały uzyskane z reprezentatywnymi panelami wzbogacającymi i są podane wyłącznie w celach informacyjnych. Charakterystyki działania analitycznego służą do zilustrowania ogólnych możliwości testu i nie określają możliwości ani przydatności w odniesieniu do jakichkolwiek określonych twierdzeń dotyczących testu. Wszystkie testy diagnostyczne opracowane do stosowania z tymi odczynnikami wymagają pełnej walidacji we wszystkich aspektach działania.

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest zgodny z panelami wzbogacającymi firmy Illumina i innych firm. Jednakże działanie z panelami wzbogacającymi innych firm, które nie spełniają wymagań tego panelu, nie jest gwarantowane. Informacje na temat wymagań panelu – patrz [Wymagania dotyczące panelu sond wzbogacających na stronie 11](#).
- Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit wymaga 2-godzinnego czasu hybrydyzacji. Zastosowanie dłuższego czasu hybrydyzacji może wpłynąć na metryki działania.
- Moduły DNA GenerateFASTQ Dx lokalnego menedżera przebiegu do aparatów MiSeqDx i NextSeq 550Dx dostarczają wyłącznie pliki FASTQ. W przypadku korzystania z tych modułów należy przeprowadzić walidację analizy wtórnej.
- Aplikacja DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application jest dostępna w systemie NovaSeq 6000Dx. Aplikacja ta obsługuje wiele procedur analizy wtórnej, w tym generowanie plików FASTQ oraz FASTQ i VCF w celu wykrycia wariantów linii zarodkowej, a także generowanie plików FASTQ i VCF do wykrywania wariantów somatycznych. W przypadku korzystania z aplikacji do generowania plików VCF nie ma potrzeby przeprowadzania walidacji analizy wtórnej.
- Informacje o ograniczeniach aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application w przypadku stosowania z aparatem NovaSeq 6000Dx – patrz *Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dx (nr dokumentu: 200025276)*.

Elementy produktu

Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit składa się z wymienionych poniżej elementów.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z zestawem UD Indexes Set A, nr kat. 20051354 (16 próbek) lub nr kat. 20051352 (96 próbek)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z zestawem UD Indexes Set B, nr kat. 20051355 (16 próbek) lub nr kat. 20051353 (96 próbek)
- Moduł DNA GenerateFASTQ Dx lokalnego menedżera przebiegu do aparatu NextSeq 550Dx, nr kat. 20063024
- Moduł DNA GenerateFASTQ Dx lokalnego menedżera przebiegu do aparatu MiSeqDx, nr kat. 20063022
- Aplikacja DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application do aparatu NovaSeq 6000Dx, nr kat. 20074609

Odczynniki dostarczane

Wykonanie protokołu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx wymaga użycia odczynników Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z zestawem UD Indexes Set A lub odczynników Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z zestawem UD Indexes Set B. Można wykonać wskazaną poniżej liczbę reakcji przygotowania biblioteki i wzbogacania przy użyciu zestawu na 16 lub 96 próbek.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Próbka wejściowa	Reakcje wzbogacania	Krotność wzbogacania
Zestaw na 16 próbek	Niska jakość (FFPE)	16 reakcji	1-krotność
Zestaw na 96 próbek	Wysoka jakość (np. krew pełna)	8 reakcji	12-krotność

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

Odczynniki Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1; przechowywać w temperaturze od 15°C do 30°C

Wymienione poniżej odczynniki są wysyłane w temperaturze pokojowej. Należy niezwłocznie umieścić odczynniki we wskazanej temperaturze przechowywania w celu zapewnienia poprawnego działania.

Nazwa odczynnika	Liczba próbek		Kolor zatycki	Objętość wypełnienia	Składniki aktywne
	16 próbek (nr kat. 20050020)	96 próbek (nr kat. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Czerwony	350 µl	Wodny roztwór detergentu.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Zielony	41 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający detergent i sól.
Kulki oczyszczające (CB)	1	Nd.*	Czerwony	10 ml	Kulki paramagnetyczne fazy stałej w buforowanym roztworze wodnym.

* W przypadku zestawów na 96 próbek kulki czyszczące są dołączone do produktu Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (nr kat. 20050030).

Kulki czyszczące Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 samples); przechowywać w temperaturze od 15°C do 30°C

W przypadku zestawów na 96 próbek kulki czyszczące są dołączone do produktu Illumina Prep Dx Cleanup Beads (nr kat. 20050030). Poniższy odczynnik jest wysyłany w temperaturze pokojowej. Należy niezwłocznie umieścić odczynniki we wskazanej temperaturze przechowywania w celu zapewnienia poprawnego działania. W przypadku zestawów na 16 próbek kulki czyszczące są dołączone do produktu Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (nr kat. 20050020).

Nazwa odczynnika	Ilość	Kolor zatyczki	Objętość wypełnienia	Składniki aktywne
Kulki oczyszczające (CB)	4	Czerwony	10 ml	Kulki paramagnetyczne fazy stałej w buforowanym roztworze wodnym.

Odczynniki Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2; przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C

Wymienione poniżej odczynniki są wysyłane w stanie schłodzonym. Należy niezwłocznie umieścić odczynniki we wskazanej temperaturze przechowywania w celu zapewnienia poprawnego działania. Probówkę z zapasem odczynnika eBLTS należy przechowywać w pozycji pionowej, tak aby kulki były zawsze zanurzone w buforze.

Nazwa odczynnika	Liczba probówek		Kolor zatyczki	Objętość wypełnienia		Składniki aktywne
	16 próbek (nr kat. 20050021)	96 próbek (nr kat. 20050026)		16 próbek	96 próbek	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Żółty	200 µl	290 µl	Kulki magnetyczne ze streptawidyną połączone z transpozonomami w buforowanym roztworze wodnym zawierającym glicerol, EDTA, ditiotreitol, sól i detergent.

Nazwa odczynnika	Liczba próbek		Kolor zatyczki	Objętość wypełnienia		Składniki aktywne
	16 próbek (nr kat. 20050021)	96 próbek (nr kat. 20050026)		16 próbek	96 próbek	
Bufor do ponownego zawieszania (RSB)	1	4	Przezroczysty	1,8 ml	1,8 ml	Buforowany roztwór wodny.

Odczynniki Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3; przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C

Wymienione poniżej odczynniki są wysyłane w stanie zamrożonym. Należy niezwłocznie umieścić odczynniki we wskazanej temperaturze przechowywania w celu zapewnienia poprawnego działania.

Nazwa odczynnika	Liczba próbek		Kolor zatyczki	Objętość wypełnienia		Składniki aktywne
	16 próbek (nr kat. 20050022)	96 próbek (nr kat. 20050027)		16 próbek	96 próbek	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Przezroczysty	290 µl	290 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający sole magnezu i dimetyloformamid.
Mieszanina Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Przezroczysty	200 µl	610 µl	Polimeraza DNA i dNTP w buforowanym roztworze wodnym.

Odczynniki Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 samples); przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C

W przypadku zestawów na 16 próbek do odczynników Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (nr kat. 20050023) dołączone są wymienione poniżej odczynniki. W przypadku zestawów na 96 próbek do odczynników Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (nr kat. 20050028) dołączone są wymienione poniżej odczynniki.

Wymienione poniżej odczynniki są wysyłane w stanie schłodzonym. Należy niezwłocznie umieścić odczynniki we wskazanej temperaturze przechowywania w celu zapewnienia poprawnego działania.

Nazwa odczynnika	Liczba próbek	Kolor zatyczki	Objętość wypełnienia	Składniki aktywne
Kulki magnetyczne ze streptawidyną (SMB3)	4	Przezroczysty	1,2 ml	Kulki magnetyczne ze streptawidyną w buforowanym roztworze wodnym zawierającym formamid, detergent i sól.
Bufor do ponownego zawieszania (RSB)	1	Przezroczysty	1,8 ml	Buforowany roztwór wodny.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Przezroczysty	200 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający detergent i sól.
Bufor Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Przezroczysty	200 µl	Buforowany roztwór wodny.

Odczynniki Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 samples); przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C

W przypadku zestawów na 96 próbek do odczynników Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (nr kat. 20050028) dołączone są wymienione poniżej odczynniki. W przypadku zestawów na 16 próbek do odczynników Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (nr kat. 20050023) dołączone są wymienione poniżej odczynniki.

Wymienione poniżej odczynniki są wysyłane w stanie schłodzonym. Należy niezwłocznie umieścić odczynniki we wskazanej temperaturze przechowywania w celu zapewnienia poprawnego działania.

Nazwa odczynnika	Liczba próbek	Kolor zatyczki	Objętość wypełnienia	Składniki aktywne
Kulki magnetyczne ze streptawidyną (SMB3)	2	Przezroczysty	1,2 ml	Kulki magnetyczne ze streptawidyną w buforowanym roztworze wodnym zawierającym formamid, detergent i sól.
Bufor do ponownego zawieszania (RSB)	4	Przezroczysty	1,8 ml	Buforowany roztwór wodny.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Przezroczysty	200 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający detergent i sól.
Bufor Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Przezroczysty	200 µl	Buforowany roztwór wodny.

Odczynniki Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2; przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C

Wymienione poniżej odczynniki są wysyłane w stanie zamrożonym. Należy niezwłocznie umieścić odczynniki we wskazanej temperaturze przechowywania w celu zapewnienia poprawnego działania.

Nazwa odczynnika	Liczba próbek		Kolor zatyczki	Objętość wypełnienia	Składniki aktywne
	16 próbek (nr kat. 20050024)	96 próbek (nr kat. 20050029)			
Bufor elucyjny Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Przezroczysty	580 µl	Wodny roztwór detergentu.
Bufor płuczący Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Pomarańczowy	4,1 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole i detergenty.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Przezroczysty	320 µl	Mieszanina starterów PCR (oligonukleotydów).
2N NaOH (HP3)	1	1	Przezroczysty	200 µl	2N Roztwór wodorotlenku sodu (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Niebieski	480 µl	Buforowany roztwór wodny z DNA Cot-1, czynnikiem zagęszczającym i formamidem.
Mieszanina Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Przezroczysty	200 µl	Polimeraza DNA i dNTP w buforowanym roztworze wodnym.

Zestaw Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B; przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C

Wymienione poniżej odczynniki są wysyłane w stanie zamrożonym. Należy niezwłocznie umieścić odczynniki we wskazanej temperaturze przechowywania w celu zapewnienia poprawnego działania. Informacje o sekwencjach adaptera indeksowanego – patrz [Załącznik: Sekwencje adapterów do indeksowania Illumina UD na stronie 64](#).

Element	Ilość
Zestaw Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Indexes), nr kat. 20050038	1
Zestaw Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 Indexes), nr kat. 20050039	1

Odczynniki niedostarczane

Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

- Odczynniki do ekstrakcji i oczyszczania DNA
- Odczynniki do ilościowego oznaczania DNA
- Etanol (absolutny, do zastosowań w biologii molekularnej)
- Woda niezawierająca nukleazy
- 1M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- Roztwór 1N NaOH, do zastosowań w biologii molekularnej
- W przypadku korzystania z systemu sekwencjonowania NextSeq 550Dx:
 - Zestaw odczynników na 300 cykli NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (nr kat. 20028871)
- W przypadku korzystania z systemu sekwencjonowania MiSeqDx:
 - Zestaw odczynników MiSeqDx Reagent Kit v3 (nr kat. 20037124)
- W przypadku korzystania z systemu sekwencjonowania NovaSeq 6000Dx:
 - Zestaw odczynników na 300 cykli NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (nr kat. 20046931)
 - Zestaw odczynników na 300 cykli NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (nr kat. 20046933)
 - Kasetka z buforem NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (nr kat. 20062292)
 - Kasetka z buforem NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (nr kat. 20062293)
 - Probówka na bibliotekę NovaSeq 6000Dx (nr kat. 20062290)
 - Probówka na bibliotekę NovaSeq 6000Dx, 24 sztuki (na kat. 20062291)

Wymagania dotyczące panelu sond wzbogacających

Odczynniki z zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit są zgodne zarówno z panelami wzbogacania oligonukleotydów DNA firmy Illumina, jak i innych firm. W przypadku korzystania z sond innych firm zawierających biotynylowane DNA (panele stałe lub niestandardowe), należy się upewnić, że spełniają one wymagane specyfikacje.

Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit został zoptymalizowany i zwalidowany przy użyciu paneli innych firm o wymienionych poniżej cechach. Porównywalnego działania nie można zagwarantować w przypadku używania paneli innych firm niezgodnych ze specyfikacją.

- Długość sondy 80 bp lub 120 bp
- Od 500 do 675 000 sond
- Jedno- lub dwuniciowe DNA
- Całkowita wejściowa wielkość sondy ≥ 3 pmol w przypadku wzbogacania od 1-krotności do 12-krotności

Przechowywanie i sposób postępowania

- Temperaturę pokojową zdefiniowano jako 15°C do 30°C.
- Odczynniki zachowują stabilność do terminu ważności podanego na etykietach zestawu pod warunkiem przechowywania zgodnie ze wskazaniem. Informacje na temat temperatury przechowywania – patrz [Odczynniki dostarczane na stronie 4](#).
- Zamrożone odczynniki są stabilne przez maksymalnie cztery cykle zamrażania-rozmrażania, do upływu określonego terminu ważności.
- Procedura Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ma następujące punkty bezpiecznego przerywania oznaczeń:
 - Po etapie [Amplifikacja tagmentowanego DNA na stronie 30](#) zamplifikowane biblioteki są stabilne do 30 dni, gdy są przechowywane w temperaturze od -25°C do -15°C.
 - Po etapie [Oczyszczanie bibliotek na stronie 32](#) oczyszczone zamplifikowane biblioteki są stabilne do 30 dni, gdy są przechowywane w temperaturze od -25°C do -15°C.
 - Po etapie [Pulowanie bibliotek przed wzbogacaniem na stronie 35](#) pulowane biblioteki są stabilne do 30 dni, gdy są przechowywane w temperaturze od -25°C do -15°C.
 - Po etapie [Amplifikacja biblioteki wzbogaconej na stronie 46](#) płytkę ze wzbogaconymi, zamplifikowanymi bibliotekami można pozostawić w termocyklerze do 24 godzin. Alternatywnie płytkę można przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C przez czas do 48 godzin.
 - Ostateczne oczyszczone i wzbogacone biblioteki są stabilne do 7 dni, gdy są przechowywane w temperaturze od -25°C do -15°C.
- Jeśli jakiegokolwiek opakowanie lub element zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest uszkodzony lub naruszony, należy skontaktować się z działem obsługi klienta firmy Illumina.

- Odczynnik Stop Tagment Buffer 2 (ST2) może utworzyć widoczne osady lub kryształy. Jeśli widoczne są osady, ogrzewać w temperaturze 37°C przez 10 minut, a następnie wymieszać mieszadłem wirowym, aż osad się rozpuści.
- Odczynniki Hybridization Oligos (HYB) i Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) muszą zostać wstępnie ogrzane do tej samej temperatury, co temperatura wstrzymywania hybrydyzacji obowiązująca dla typu próbki i panelu sond. Więcej informacji na temat postępowania z odczynnikiem NHB2 i EEW – patrz [Uwagi dotyczące procedury na stronie 17](#).
- W odczynnikiem Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) i HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) mogą utworzyć się kryształy i może wystąpić zmętnienie. W przypadku zaobserwowania kryształów i zmętnienia należy wymieszać mieszadłem wirowym lub wielokrotnie pipetować, aż roztwór będzie przezroczysty. Przed pipetowaniem odczynnik NHB2 należy podgrzać.
- Podczas pracy z kulkami czyszczącymi (CB) należy stosować poniższe najlepsze praktyki:
 - Nigdy nie zamrażać kulek.
 - Bezpośrednio przed użyciem wymieszać mieszadłem wirowym kulki, aż zostaną zawieszona, a ich kolor będzie jednolity.
- Podczas pracy z odczynnikiem Enrichment BLT Small (eBLTS) należy stosować poniższe najlepsze praktyki:
 - Probówkę z odczynnikiem eBLTS należy przechowywać w pozycji pionowej, tak aby kulki były zawsze zanurzone w buforze.
 - Dokładnie wymieszać mieszadłem wirowym eBLTS, aż kulki zostaną ponownie zawieszona. Aby uniknąć ponownego osadzania się kulek, nie zaleca się wirowania przed pipetowaniem.
 - Jeśli kulki przylgnęły do boku lub góry 96-dołkowej płytki, odwirować z prędkością 280 × g przez 3 sekundy, a następnie pipetować w celu ponownego zawieszenia.
- Podczas pracy z płytkami adapterów indeksowanych należy stosować poniższe najlepsze praktyki:
 - Nie dodawać próbek do płytki adapterów indeksowanych.
 - Każdy dołek płytki do indeksowania jest przeznaczony wyłącznie do jednorazowego użytku.

Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane

Oprócz zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit przed rozpoczęciem protokołu należy przygotować wymagany sprzęt i materiały.

Wyposażenie

Przed rozpoczęciem protokołu należy przygotować wymagany sprzęt.

Protokół został zoptymalizowany i zwalidowany przy użyciu elementów według wymienionej specyfikacji. Porównywalnego działania nie można zagwarantować w przypadku używania sprzętu niezgodnego ze specyfikacją.

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Niektóre elementy są wymagane tylko dla określonych procedur. Pozycje te są wyszczególnione w osobnych tabelach.

- Termocykler o następujących cechach:
 - Podgrzewana pokrywa
 - Minimalny zakres regulacji temperatury: od 10°C do 98°C
 - Minimalna dokładność temperatury: $\pm 0,25^\circ\text{C}$
 - Maksymalna objętość reakcji: 100 μl
 - Zgodność z 96-dołkowymi płytkami PCR z wysokim kołnierzem
- Inkubator do mikropróbek o następującej specyfikacji:
 - Zakres temperatury otoczenia: $+5,0^\circ\text{C}$ do $99,0^\circ\text{C}$
 - Zgodność z 96-dołkowymi płytkami MIDI
- Wkładki inkubatora do mikropróbek zgodne z 96-dołkowymi płytkami MIDI
- Szybka wytrząsarka do mikroplatek o zakresie prędkości mieszania 200–3000 obr./min
- Statyw magnetyczny zgodny z 96-dołkowymi płytkami PCR
- Statyw magnetyczny zgodny z 96-dołkowymi płytkami MIDI
- Fluorometr zgodny z wybraną metodą oznaczania ilościowego
- Analizator fragmentów DNA
- Pipety automatyczne:
 - Jedno- i wielokanałowe pipety 10 μl
 - Jedno- i wielokanałowe pipety 20 μl
 - Jedno- i wielokanałowe pipety 200 μl
 - Pipety jednokanałowe 1000 μl
 - Używać pipet automatycznych, aby zapewnić dokładne odmierzenie objętości odczynników i próbek. Można stosować pipety jedno- lub wielokanałowe, pod warunkiem że są regularnie kalibrowane i zapewniają dokładność w zakresie 5% wskazanej objętości.
- Wirówka do mikroplatek
- Mikrowirówka
- Jeden z następujących systemów sekwencjonowania firmy Illumina:
 - Aparat MiSeqDx, nr kat. DX-410-1001
 - Aparat NextSeq 550Dx Instrument, nr kat. 20005715
 - Aparat NovaSeq 6000Dx Instrument, nr kat. 20068232
- [Opcjonalnie] Koncentrator próżniowy
- [FFPE] System detekcji PCR w czasie rzeczywistym

Materiały

Przed rozpoczęciem protokołu należy przygotować wymagane materiały.

Niektóre elementy są wymagane tylko dla określonych procedur. Pozycje te są wyszczególnione w osobnych tabelach.

Protokół został zoptymalizowany i zwalidowany przy użyciu wymienionych elementów. W przypadku użycia innych materiałów nie gwarantuje się porównywalnego działania.

- Końcówki pipet z filtrem
- Stożkowe probówki wirówkowe, 15 ml lub 50 ml
- Probówki do mikrowirówki, 1,5 ml
- Wielokanałowe zbiorniki na odczynniki wolne od RNazy/DNazy, jednorazowe
- 8-probówkowe paski wolne od RNazy/DNazy i zatyczki
- Pipety serologiczne
- 96-dołkowa polipropylenowa płytka do przechowywania z głębokimi dołkami, 0,8 ml (płytki MIDI)
- 96-dołkowe płytki PCR z wysokim kołnierzem i twardą osłoną
- [FFPE] Płytki qPCR zgodne z aparatem qPCR
- Samoprzylepna folia uszczelniająca do płytek 96-dołkowych o następujących cechach:
 - Odrywalny, przezroczysty poliester
 - Odpowiednia do płytek PCR z wysokim kołnierzem
 - Mocny klej, który wytrzymuje wielokrotne zmiany temperatury w zakresie od -40°C do 110°C
 - Pozbawiona DNazy/RNazy
- Materiały eksploatacyjne z tworzyw sztucznych zgodne z wybraną metodą oznaczania ilościowego
- Fluorometryczny zestaw do ilościowego oznaczania dsDNA zgodny z wybranym systemem do oznaczania ilościowego:
 - Do ilościowego oznaczania amplifikowanych bibliotek przed wzbogaceniem można zastosować zestaw do oznaczania ilościowego o szerokim zakresie.
 - Do ilościowego oznaczania wzbogaconych bibliotek; zakres zestawu do oznaczania ilościowego zależy od użytego panelu sond.
- Zestaw do analizy fragmentów do jakościowego oznaczania bibliotek za pomocą wybranego systemu oznaczania jakościowego:
 - Do oznaczania jakościowego amplifikowanych bibliotek przed wzbogaceniem można zastosować zestaw o szerokim zakresie.
 - Do oznaczania jakościowego wzbogaconych bibliotek; zakres zestawu zależy od użytego panelu sond.
- [Opcjonalnie] Zestaw do ekstrakcji DNA z ludzkich komórek i tkanek. Można zastosować dowolną zatwierdzoną metodę ekstrakcji.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek



PRZESTROGA

Wszelkie próbki należy traktować jako potencjalnie zakaźne.

- To oznaczenie jest zgodne z genomowym DNA pochodzącym z ludzkich komórek i tkanek.
- W przypadku dostępnego na rynku oczyszczonego gDNA należy się upewnić, że próbki były transportowane we właściwych warunkach i przechowywane zgodnie z instrukcjami producenta. Należy postępować zgodnie z najlepszymi praktykami dotyczącymi cykli przechowywania i zamrażania-rozmrażania gDNA.
- W przypadku wejściowej próbki krwi pełnej należy przestrzegać wymagań dotyczących pobierania krwi, transportu i przechowywania, mających zastosowanie do wybranej metody ekstrakcji DNA. Można zastosować dowolną zatwierdzoną metodę ekstrakcji. Transport pełnej krwi musi się odbywać zgodnie z przepisami krajowymi, federalnymi, stanowymi lub lokalnymi w zakresie transportu materiałów zakaźnych.
- Do ekstrakcji DNA z tkanki FFPE można zastosować dowolną zwalidowaną metodę ekstrakcji. Postępować zgodnie z instrukcjami i zaleceniami dotyczącymi wybranej metody ekstrakcji, aby określić następujące procedury:
 - Metoda utrwalania w formalinie i zatapiania w parafinie tkanek w celu zapewnienia najlepszej jakości wyekstrahowanego DNA.
 - Przechowywanie próbek FFPE.
 - Wymagania dotyczące materiałów wyjściowych, takie jak liczba i grubość skrawków FFPE. Większość metod oczyszczania zaleca stosowanie świeżo ściętych skrawków.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Odczynniki z zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit zawierają potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednie do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i utylizować je zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi. Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki (SDS) dostępna na stronie support.illumina.com/sds.html.
- Wszystkie próbki krwi należy traktować tak, jakby były zakaźne pod kątem ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV, Human Immunodeficiency Virus), wirusa zapalenia wątroby typu B (WZW B) oraz innych patogenów przenoszonych przez krew, tj. zachowywać uniwersalne środki ostrożności.

- Należy przestrzegać środków ostrożności dotyczących rutynowych badań laboratoryjnych. Nie należy pipetować ustami. Nie należy jeść, pić ani palić tytoniu w wyznaczonych obszarach roboczych. Podczas postępowania się próbkami i odczynnikami zestawu należy nosić jednorazowe rękawice i fartuchy laboratoryjne. Po zakończeniu postępowania się próbkami i odczynnikami zestawu należy dokładnie umyć ręce.
- Aby zapobiec degradacji próbki lub odczynnika, przed rozpoczęciem protokołu należy upewnić się, że pary podchlorynu sodu z czyszczenia całkowicie się rozproszyły.
- Zanieczyszczenie próbek innymi produktami/amplikonami PCR może spowodować niedokładne i niewiarygodne wyniki. Aby uniknąć zanieczyszczenia, należy stosować następujące najlepsze praktyki:
 - Stosować odpowiednie praktyki laboratoryjne i zachowywać higienę laboratoryjną.
 - Wykonać etapy procedury w wyznaczonych obszarach przed amplifikacją lub po amplifikacji.
 - Zużyte odczynniki należy przechowywać przed czyszczeniem bibliotek w obszarze przed amplifikacją.
 - Oddzielić odczynniki przedamplifikacyjne od odczynników poamplifikacyjnych.
 - Należy się upewnić, że obszary procesu przed amplifikacją i po niej zostały wyposażone w odrębne przyrządy (np. pipety, końcówki do pipet, mieszadło wirowe i wirówkę).
- Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego. Pomiędzy kolejnymi próbkami, jak również dozowaniami odczynników, należy wymieniać końcówki do pipet na nowe. Zastosowanie końcówek z filtrem ogranicza ryzyko przeniesienia amplikonu, jak również zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami.
 - Podczas dodawania lub przenoszenia próbek lub mieszanin wejściowych odczynników należy zmieniać końcówki pomiędzy każdą próbką.
 - Podczas dodawania adapterów indeksowanych za pomocą pipety wielokanałowej należy zmieniać końcówki pomiędzy każdym rzędem lub każdą kolumną. W przypadku korzystania z pipety jednokanałowej należy zmieniać końcówki między każdą próbką.
 - Nieużywane płytki z adapterami indeksowanymi należy usunąć z obszaru roboczego.
- Należy stosować poniższe najlepsze praktyki dotyczące etapów płukania etanolem:
 - Należy zawsze przygotować świeży 80% roztwór etanolu. Etanol może pochłaniać wodę z powietrza, co może wpływać na wyniki.
 - Podczas etapów płukania należy się upewnić, że cały etanol został usunięty z dna dołków. Pozostałości etanolu mogą wpływać na wyniki.
 - Należy przestrzegać podanego czasu suszenia dla etapów z wykorzystaniem statywu magnetycznego, aby zapewnić całkowite odparowanie. Pozostałości etanolu mogą wpłynąć na wyniki kolejnych reakcji.
- Przed użyciem należy zawsze przygotowywać mieszaniny wyjściowe i nigdy nie przechowywać połączonych roztworów roboczych.
- Działania zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nie można zagwarantować, jeśli nie są przestrzegane procedury opisane w ulotce dołączonej do opakowania.
- Nie należy używać żadnego ze składników zestawu po upływie terminu ważności podanego na etykiecie zestawu.

- Nie zamieniać elementów z różnych zestawów Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Elementy zestawu można zidentyfikować na podstawie etykiety.

Uwagi dotyczące procedury

Zalecenia dotyczące wejściowego DNA

Protokół Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest zgodny z wysokiej jakości wejściowym dwuniciowym genomowym DNA (gDNA) na poziomie 50–1000 ng.

Należy się upewnić, że początkowa próbka gDNA nie zawiera > 1 mM EDTA i jest wolna od zanieczyszczeń organicznych, takich jak fenol i etanol. Te substancje mogą zakłócać reakcję tagmentacji i skutkować niepowodzeniem oznaczenia.

Wejściowy gDNA \geq 50 ng

W przypadku wejściowego gDNA w zakresie 50–1000 ng nie jest wymagane oznaczenie ilościowe ani normalizacja początkowej próbki gDNA.

Wejściowy gDNA < 50 ng

10–50 ng wejściowego DNA można użyć z następującymi modyfikacjami:

- W przypadku stosowania 10–49 ng wejściowego gDNA zaleca się oznaczenie ilościowe początkowej próbki gDNA w celu określenia liczby cykli PCR wymaganych po tagmentacji. Użyć metody opartej na fluorometrii, aby ilościowo oznaczyć wejściowe dwuniciowe gDNA. Unikać metod pomiaru całkowitego kwasu nukleinowego, takich jak NanoDrop lub innych metod pomiaru absorbancji UV.
- Ten protokół nie normalizuje ostatecznych uzysków bibliotek przed wzbogaceniem otrzymanych z 10–49 ng gDNA, a zatem wymagane jest oznaczenie ilościowe i normalizacja bibliotek przed wzbogaceniem i po nim.
- Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit został scharakteryzowany i zweryfikowany w odniesieniu do 50–1000 ng wejściowego DNA. Nie można zagwarantować równoważnego działania produktu w przypadku wejściowego gDNA na poziomie < 50 ng.

Zalecenia dotyczące próbek krwi

Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest zgodny z gDNA wyekstrahowanym z obwodowej krwi pełnej. Można zastosować dowolną zatwierdzoną metodę ekstrakcji. Podczas ekstrakcji gDNA z krwi pełnej nie jest wymagana wstępna ocena ilościowa wejściowego DNA, a zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit generuje znormalizowane uzyski biblioteki przed wzbogacaniem.

Następujące czynniki mogą niekorzystnie wpływać na ilość DNA uzyskanego z próbek krwi pełnej, a tym samym na normalizację biblioteki:

- Czas, jaki upłynął od uzyskania próbki krwi
- Warunki przechowywania
- Podstawowe schorzenia wpływające na liczbę białych krwinek

Zalecenia dotyczące wejściowych próbek tkanki FFPE

Należy zastosować następujące kryteria jakości DNA próbek FFPE, aby określić odpowiednie dane wejściowe w celu skutecznego przygotowania biblioteki:

- W przypadku próbek FFPE o wartości $\Delta Cq \leq 5$ zalecany poziom wejściowego DNA wynosi 50–1000 ng.
- Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nie jest zalecany do próbek FFPE niskiej jakości o wartości $\Delta Cq > 5$. Można co prawda użyć próbek o wartości $\Delta Cq > 5$, ale może to zwiększyć prawdopodobieństwo niepowodzenia przygotowania biblioteki lub obniżyć wydajność oznaczenia.

Ekstrakcja DNA z próbek FFPE

Należy użyć metody izolacji kwasu nukleinowego, która zapewnia wysoką wydajność odzysku, minimalizuje zużycie próbki i zachowuje jej integralność. Można zastosować dowolną zatwierdzoną metodę ekstrakcji DNA z próbek FFPE. W przypadku gDNA wyekstrahowanego z tkanki FFPE nie jest wymagana wstępna ocena ilościowa wejściowego DNA, a zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nie generuje znormalizowanych uzysków biblioteki przed wzbogaceniem.

Jakościowe oznaczenie DNA w próbkach FFPE

gDNA wyekstrahowany z tkanki FFPE wymaga oznaczenia jakościowego przed użyciem. Aby uzyskać optymalne działanie, należy ocenić jakość próbki DNA przy użyciu zwalidowanej metody ekstrakcji w celu kwalifikacji DNA wyekstrahowanego z próbek FFPE. Protokół Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jest zgodny z próbkami FFPE DNA o wartości $\Delta Cq \leq 5$. Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nie jest zalecany do próbek FFPE niskiej jakości o wartości $\Delta Cq > 5$. Można co prawda użyć próbek o wartości $\Delta Cq > 5$, ale może to zwiększyć prawdopodobieństwo niepowodzenia przygotowania biblioteki lub obniżyć wydajność oznaczenia.

[Opcjonalnie] Próbki referencyjne FFPE

Podczas wykonywania protokołu jako kontrolę dodatnią należy stosować scharakteryzowane materiały referencyjne, takie jak Horizon HD799 (DNA). Oznaczone jakościowo materiały FFPE z heteroprzeszczepów pochodzących z linii komórkowych można również stosować jako próbki referencyjne. Należy użyć metody opartej na fluorymetrii, aby ilościowo oznaczyć materiały referencyjne przed użyciem.

UWAGA Wykonanie analizy dodatkowej referencyjnej próbki kontrolnej lub kontroli ujemnej powoduje zużycie odczynników i zmniejsza łączną liczbę nieznanych próbek, które mogą zostać przetworzone.

Zalecenia dotyczące próbek wejściowych

Zalecenia dotyczące próbek wejściowych do zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit podsumowano w poniższej tabeli.

Tabela 1 Zalecenia dotyczące próbek wejściowych

Typ próbki wejściowej	Ilość próbki wejściowej	Wymagane ilościowe oznaczenie wejściowego DNA	Wymagane jakościowe oznaczenie wejściowego DNA	Znormalizowany uzysk biblioteki przed wzbogaceniem
gDNA	10–49 ng	Tak	Stosunek 260/280 w zakresie 1,8–2,0	Nie
gDNA	50–1000 ng	Nie	Stosunek 260/280 w zakresie 1,8–2,0	Tak
gDNA z krwi	50–1000 ng	Nie	Stosunek 260/280 w zakresie 1,8–2,0	Tak
gDNA z próbek FFPE	50–1000 ng	Tak	Wartość $\Delta Cq \leq 5$	Nie

Zalecane cykle PCR do programu eBLTS PCR są dostosowywane do stężenia wejściowego i jakości próbki. Więcej informacji – patrz [Amplifikacja tagmentowanego DNA na stronie 30](#).

Porady i techniki

Unikanie zanieczyszczenia krzyżowego

- Podczas dodawania lub przenoszenia próbek należy zmieniać końcówki pomiędzy *każdą próbką*.
- Podczas dodawania adapterów indeksowanych za pomocą pipety wielokanałowej należy zmieniać końcówki pomiędzy *każdym rzędem* lub *każdą kolumną*. W przypadku korzystania z pipety jednokanałowej należy zmieniać końcówki między każdą próbką.

Nakładanie folii uszczelniającej na płytkę

- 96-dołkową płytkę należy zawsze pokryć nową samoprzylepną folią uszczelniającą za pomocą wałka w celu osłonięcia płytki przed wykonaniem następujących etapów w protokole:
 - Etapy wytrząsania
 - Etapy inkubacji. Niewłaściwe uszczelnienie płytki może doprowadzić do parowania podczas inkubacji.

- Etapy wirowania
- Etapy hybrydyzacji
- Upewnić się, że krawędzie i dołki są całkowicie uszczelnione, aby zmniejszyć ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego i parowania.
 - Jeśli na folii uszczelniającej lub bokach dołków płytki zaobserwuje się jakikolwiek płyn lub kondensat, przed rozszczelnieniem należy odwirować w razie potrzeby.
- Umieścić płytkę na płaskiej powierzchni, a następnie powoli zdjąć folię uszczelniającą.

Postępowanie z odczynnikiem Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Probówkę z zapasem odczynnika eBLTS należy przechowywać w pozycji pionowej w lodówce, tak aby kulki były zawsze zanurzone w buforze.
- Bezpośrednio przed użyciem wymieszać mieszadłem wirowym probówkę z zapasem odczynnika eBLTS do momentu zawieszenia kulek. Aby uniknąć ponownego osadzania się kulek, nie zaleca się wirowania przed pipetowaniem.
- Jeśli kulki przylgnęły do boku lub góry 96-dołkowej płytki, odwirować z prędkością $280 \times g$ przez 3 sekundy, a następnie pipetować w celu ponownego zawieszenia.
- Podczas płukania odczynnika eBLTS:
 - Użyć statywu magnetycznego odpowiedniego dla płytki.
 - Pozostawić płytkę na statywie magnetycznym do momentu, w którym należy ją zdjąć zgodnie z instrukcją.
 - Jeśli kulki są zasysane do końcówek pipety, dozować je z powrotem na płytkę na statywie magnetycznym i poczekać, aż płyn stanie się klarowny (2 minuty).

Procedura Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Na poniższym schemacie przedstawiono procedurę Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Punkty bezpiecznego przzerwania oznaczeń są wskazane pomiędzy etapami. Szacunkowe czasy opierają się na przetworzeniu 12 próbek przy 12-krotnym wzbogaceniu.



Instrukcja użytkowania

W tym rozdziale opisano protokół Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Należy zapoznać się z całą planowaną procedurą sekwencjonowania, od próbki po analizę, aby zapewnić zgodność produktów i parametrów eksperymentu.
- Przed kontynuacją należy sprawdzić zawartość zestawu i upewnić się, że użytkownik posiada wymagane komponenty, sprzęt i materiały.
 - Biotynylowane sondy innych firm muszą spełniać określone wymagania. Patrz [Wymagania dotyczące panelu sond wzbogacających na stronie 11](#), aby upewnić się, że sondy innych firm spełniają wymagania.
- Należy postępować zgodnie z protokołem w podanej kolejności, stosując podane objętości i parametry inkubacji.
- O ile w protokole nie wyszczególniono punktu bezpiecznego przerwania oznaczeń, należy natychmiast przejść do następnego etapu.
- Podczas tworzenia mieszaniny wyjściowej nadmiar jest uwzględniany w dostarczonych objętościach.
- Użyć statywu magnetycznego odpowiedniego do typu płytki.

Przygotowanie do pulowania

Ten etap jest wymagany, aby zapewnić pomyślne sekwencjonowanie wzbogaconych bibliotek. Pulowanie bibliotek może nastąpić przed wzbogacaniem i przed sekwencjonowaniem.

Przed wzbogacaniem — poszczególne indeksowane amplifikowane biblioteki są pulowane razem w celu wzbogacenia wybranym panelem sond. Tworzy to multipleksowaną pulę wzbogaconych bibliotek. W przypadku wejściowej próbki FFPE przetwarzanie zostało przetestowane i jest zalecane wyłącznie do reakcji wzbogacania 1-krotnego. W przypadku wysokiej jakości gDNA przetestowano 12-krotność, ale możliwe jest wzbogacanie od 2-krotności do 11-krotności.

Przed sekwencjonowaniem — 1-krotnie wzbogacone biblioteki i/lub multipleksowane wzbogacone biblioteki są pulowane przed sekwencjonowaniem. Liczba wzbogaconych bibliotek, które można poddać sekwencjonowaniu, zależy od docelowej głębokości odczytu dla każdej próbki w posiadanym systemie sekwencjonowania.

Unikalne indeksowanie podwójne

Zestaw Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit wykorzystuje unikalne podwójne indeksy.

- Podwójnie indeksowane biblioteki dodają sekwencje indeksowe 1 (i7) oraz 2 (i5) w celu wygenerowania jednoznacznie oznakowanych bibliotek.
- Indeksy UD mają odrębne, niepowiązane sekwencje indeksów do odczytu indeksu i7 oraz i5. Indeksy mają długość 10 nukleotydów.

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Wybór adapterów indeksowanych o różnych sekwencjach dla pulowanych bibliotek optymalizuje balans kolorów w celu pomyślnego sekwencjonowania i analizy danych. Pule krotności, które są ≥ 10 -krotne, są z natury zbalansowane pod względem kolorów, dzięki czemu można użyć dowolnej kombinacji adapterów indeksowanych. Podczas sekwencjonowania moduł DNA GenerateFASTQ Dx lokalnego menedżera przebiegu udostępnia opcje do zbalansowanych kolorystycznie kombinacji indeksów i powiadamia użytkownika, jeśli nie ma wystarczającej różnorodności w wybranych kombinacjach indeksów.

Informacje na temat sekwencji adapterów indeksowanych Illumina UD i układów płytek – patrz [Załącznik: Sekwencje adapterów do indeksowania Illumina UD na stronie 64](#).

Obsługiwane krotności wzbogacania

Odczynniki z zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit są skonfigurowane i testowane w odniesieniu do 1-krotności i 12-krotności wzbogacania. Chociaż możliwe są inne krotności wzbogacania, niektóre krotności wymagają wstępnego przygotowania biblioteki przed wzbogacaniem i użycia odczynników do panelu sond wzbogacających.

Uzyskanie odpowiedniej wydajności wzbogacania dla niestandardowych krotności wzbogacania może wymagać dodatkowej optymalizacji. Nie można zagwarantować optymalnych wyników.

- **Krotność wzbogacania** – liczba bibliotek przed wzbogacaniem (1–12) pulowanych razem w jednej reakcji wzbogacania w celu hybrydyzacji z panelami sond wzbogacających. Na przykład połączenie 12 bibliotek przed wzbogacaniem tworzy razem 12-krotną pulę wzbogacania.
- **Reakcja wzbogacania** – liczba unikalnych preparatów reakcji wzbogacania, niezależnie od liczby bibliotek przed wzbogacaniem pulowanych na reakcję. Na przykład: pojedyncza reakcja wzbogacania pozwala przygotować 1-krotną lub 12-krotną pulę wzbogacania.

Aby obliczyć całkowitą liczbę bibliotek po wzbogaceniu, należy pomnożyć krotność wzbogacania na reakcję przez liczbę reakcji wzbogacania. Na przykład: pojedyncza reakcja wzbogacania 12-krotnej puli wzbogacania daje pulę 12 bibliotek po wzbogaceniu.

Podczas pulowania bibliotek przed wzbogacaniem odczynników z zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit używa się do wymienionych poniżej reakcji wzbogacania i krotności.

Odczynniki z zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Reakcje wzbogacania	Krotność wzbogacania
Zestaw na 16 próbek	16 reakcji	1-krotność
Zestaw na 96 próbek	8 reakcji	12-krotność

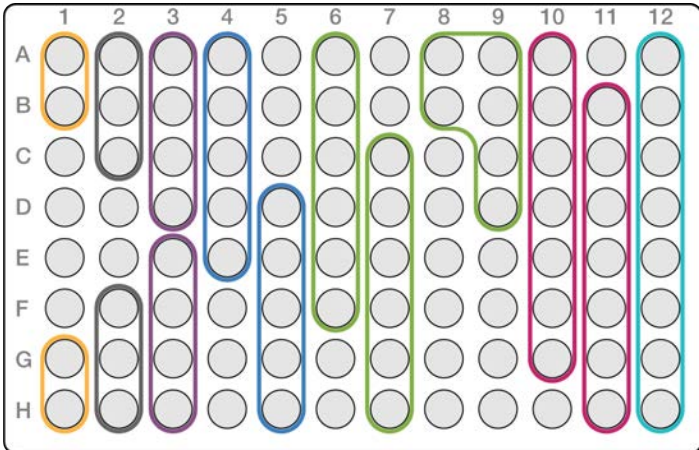
Strategie pulowania (od dwu- do ośmiokrotnej)

W poniższej tabeli przedstawiono adaptory indeksowane (dołki), które można łączyć w pulę od 2- do 8-krotnej, a każda z kombinacji została przedstawiona na rysunku oznaczonym kolorami.

Pulować dowolną krotność ≥ 2 od góry lub od dołu kolumny. Nie wykonywać pulowania w poprzek rzędu.

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina
DNA Prep with Enrichment Dx

Krotność	Kombinacje	Kolor na rysunku
2	Dwa pierwsze lub dwa ostatnie dołki w kolumnie: <ul style="list-style-type: none">• A i B• G i H Rzędy C–F nie są używane.	Pomarańczowy
3	Trzy pierwsze lub trzy ostatnie dołki w kolumnie: <ul style="list-style-type: none">• A–C• F–H Rzędy D i E nie są używane.	Szary
4	Cztery pierwsze lub cztery ostatnie dołki w kolumnie: <ul style="list-style-type: none">• A–D• E–H	Fioletowy
5	Pięć pierwszych lub pięć ostatnich dołków w kolumnie: <ul style="list-style-type: none">• A–E• D–H	Niebieski
6	[Opcja 1] Sześć pierwszych lub sześć ostatnich dołków w kolumnie: <ul style="list-style-type: none">• A–F• C–H [Opcja 2] Pierwsze dwa dołki (A i B) lub ostatnie dwa dołki (G i H) w jednej kolumnie i dowolne cztery dołki w sąsiedniej kolumnie.	Zielony
7	Siedem pierwszych lub siedem ostatnich dołków w kolumnie: <ul style="list-style-type: none">• A–G• B–H	Różowy
8	Cała kolumna.	Zielononiebieski

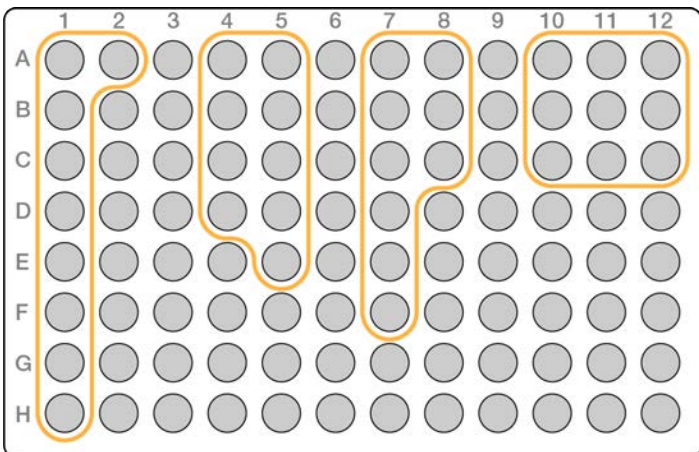


Dziewięciokrotne strategie pulowania

Użyć adapterów indeksowanych z dowolnych dołków, które optymalizują balans kolorów podczas sekwencjonowania, np.:

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

Poniższy rysunek przedstawia wszystkie cztery przykłady.



Tagmentowane genomowe DNA

Na tym etapie odbywa się tagmentacja DNA przy użyciu odczynnika Enrichment BLT Small (eBLTS), czyli proces fragmentacji i oznaczania DNA sekwencjami adaptera.

Materiały eksploatacyjne

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (żółta zatyczka)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Woda niezawierająca nukleazy
- 96-dołkowa płytką PCR
- Folia uszczelniająca
- Probówki do mikrowirówki, 1,7 ml
- Pasek z 8 probówkami
- Końcówki do pipet
 - Pipety wielokanałowe 200 µl



PRZESTROGA

Ten zestaw odczynników zawiera potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednie do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i utylizować je zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi. Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki (SDS) dostępna na stronie support.illumina.com/sds.html.

Informacje o odczynnikach

- Odczynnik eBLTS należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C. Nie używać odczynnika eBLTS, który był przechowywany w temperaturze poniżej 2°C.
- Nie wirować odczynników eBLTS.

Przygotowanie

1. Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Element	Przechowywanie	Instrukcje
eBLTS (żółta zatyczka)	od 2°C do 8° C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Wymieszać mieszadłem wirowym bezpośrednio przed użyciem. Nie wirować przed pipetowaniem.
TB1	od -25°C do -15°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Wymieszać przez worteksowanie.

2. Wymieszać mieszadłem wirowym lub pipetować DNA, a następnie krótko wirować.

3. Zapisać poniższy program TAG w termocyklerze:
 - Wybrać opcję podgrzewania pokrywy i nastawić ją na 100°C.
 - Ustawić objętość reakcji na 50 µl.
 - 55°C przez 5 minut.
 - Utrzymać w temperaturze 10°C.

Procedura

1. Dodać 2–30 µl DNA do każdego dołka 96-dołkowej płytki PCR tak, aby całkowita ilość wejściowa wynosiła 50–1000 ng.
Jeśli objętość DNA jest < 30 µl, należy dodać wodę niezawierającą nukleazy do próbek DNA, aby uzyskać objętość całkowitą wynoszącą 30 µl.
2. Dokładnie wymieszać mieszadłem wirowym eBLTS, aż kulki zostaną całkowicie ponownie zawieszono.
3. Połączyć poniższe objętości w probówce, aby przygotować mieszaninę wyjściową do tagmentacji.
Pomnożyć każdą objętość przez liczbę przetwarzanych próbek.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Nadmiar odczynnika jest uwzględniony w objętości.
4. Wielokrotnie pipetować mieszaninę wyjściową do tagmentacji w celu wymieszania.
5. Podzielić objętość mieszaniny wyjściowej do tagmentacji równo między 8 probówek tworzących pasek.
6. Za pomocą wielokanałowej pipety 200 µl przenieść 20 µl mieszaniny wyjściowej do tagmentacji do każdego dołka na płytce PCR zawierającej próbkę. Użyć nowych końcówek do każdej kolumny lub rzędu próbki.
7. Wyrzucić pasek z 8 probówkami po dozowaniu mieszaniny wyjściowej do tagmentacji.
8. Używając wielokanałowej pipety 200 µl ustawionej na 40 µl, pipetować każdą próbkę 10 razy, aby wymieszać. Użyć nowych końcówek do każdej kolumny próbki.
Alternatywnie nałożyć folię uszczelniającą na płytkę PCR i wytrząsać za pomocą wytrząsarki do płytek z prędkością 1600 obr./min przez 1 minutę.
9. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę, a następnie umieścić ją we wstępnie zaprogramowanym termocyklerze i uruchomić program TAG.
10. Odczekać, aż program TAG osiągnie temperaturę utrzymania 10°C, a następnie natychmiast usunąć płytkę.
11. Odczekać 2 minuty, aż 96-dołkowa płytkę PCR osiągnie temperaturę pokojową, a następnie przejść do następnego etapu.

Oczyszczanie po tagmentacji

Na tym etapie przed amplifikacją metodą PCR następuje płukanie DNA oznaczonego adapterem w systemie eBLTS.

Materiały eksploatacyjne

- ST2 (bufor Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (bufor Tagment Wash Buffer 2)
- Statyw magnetyczny na 96-dołkową płytkę PCR
- Folia uszczelniająca
- Pasek z 8 probówkami
- Końcówki do pipet
 - Pipety wielokanałowe 20 µl
 - Pipety wielokanałowe 200 µl
- Przygotować na potrzeby późniejszej procedury:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Płytki adapterów indeksowanych

Informacje o odczynnikach

- Użyć statywu magnetycznego odpowiedniego do płytki. Użycie statywu magnetycznego płytki MIDI do płytki PCR może zapobiec przywieraniu TWB2 do kulek.
- Pipetować TWB2 powoli, aby zminimalizować pienienie i uniknąć nieprawidłowej aspiracji objętości oraz niepełnego wymieszania.

Przygotowanie

1. Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Element	Przechowywanie	Instrukcje
EPM	od -25°C do -15°C	Rozmrażać na lodzie przez 1 godzinę. Odwrócić, aby wymieszać, a następnie krótko odwirować.
ST2	od 15°C do 30°C	Jeśli widoczne są osady, ogrzewać w temperaturze 37°C przez 10 minut, a następnie wymieszać mieszadłem wirowym, aż osad się rozpuści. Stosować w temperaturze pokojowej.
TWB2	od 15°C do 30°C	Stosować w temperaturze pokojowej.
Płytki adapterów indeksowanych	od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

Procedura

1. Dodać 10 µl ST2 do każdej reakcji tagmentacji. W przypadku używania pipety wielokanałowej pipetować ST2 na pasek 8-probówkowy, a następnie przenieść odpowiednie objętości na płytkę PCR. Użyć nowych końcówek do każdej kolumny lub rzędu próbek.
2. Za pomocą pipety 200 µl ustawionej na 50 µl powoli pipetować każdy dołek 10 razy, aby ponownie zawiesić kulki.
Alternatywnie nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1600 obr./min przez 1 minutę. Powtórzyć według potrzeb.
3. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i odwirować z prędkością 280 × g przez 10 sekund.
4. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
5. Umieścić płytkę PCR na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (3 minuty).
6. [≤ 48 próbek] Płukać trzy razy w opisany poniżej sposób.
 - a. Używając pipety wielokanałowej 200 µl ustawionej na 60 µl, usunąć i wylać nadsącz bez naruszania osadu kulek.
 - b. Zdjąć płytkę ze statywu magnetycznego.
 - c. Zaraz po tym powoli dodać 100 µl TWB2 bezpośrednio na kulki.
 - d. Pipetować powoli, aż kulki zostaną całkowicie zawieszzone. Alternatywnie nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1600 obr./min przez 1 minutę.
 - e. W razie rozprysnięcia odwirować z prędkością 280 × g przez 10 sekund.
 - f. Umieścić płytkę PCR na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (3 minuty). Pozostawić płytkę na statywie magnetycznym, a TWB2 w dołkach, aby zapobiec przesuszeniu podczas trzeciego płukania. Po przygotowaniu mieszaniny wyjściowej do PCR należy usunąć i wylać nadsącz.
 - g. Używając pipety wielokanałowej 200 µl ustawionej na 100 µl, usunąć i wylać nadsącz.
 - h. Powtórzyć czynności c–f dwukrotnie, wykonując łącznie trzy płukania.
7. [> 48 próbek] Płukać trzy razy w opisany poniżej sposób.
 - a. Wykonać czynności b i c w odstępach od 1 do 2 kolumn, aż wszystkie kolumny zostaną przetworzone, aby zapobiec przesuszeniu.
 - b. Używając pipety wielokanałowej 200 µl ustawionej na 60 µl, usunąć i wylać nadsącz.
 - c. Zdjąć płytkę ze statywu magnetycznego.
 - d. Zaraz po tym powoli dozować 100 µl TWB2 bezpośrednio na kulki.
 - e. Pipetować powoli, aż kulki zostaną całkowicie zawieszzone. Alternatywnie nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1600 obr./min przez 1 minutę.
 - f. W razie rozprysnięcia odwirować z prędkością 280 × g przez 10 sekund.
 - g. Umieścić płytkę PCR na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (3 minuty). Pozostawić płytkę na statywie magnetycznym, a TWB2 w dołkach, aby zapobiec przesuszeniu podczas trzeciego płukania. Po przygotowaniu mieszaniny wyjściowej do PCR należy usunąć i wylać nadsącz.
 - h. Używając pipety wielokanałowej 200 µl ustawionej na 100 µl, usunąć i wylać nadsącz.

- i. Zdjąć ze statywu magnetycznego i powoli dodać 100 µl TWB2 bezpośrednio na kulki.
 - j. Powtarzać czynności h oraz i co 1 lub 2 kolumny, aż wszystkie kolumny zostaną przetworzone.
 - k. Powtórzyć czynności e–h dwukrotnie, wykonując łącznie trzy płukania.
8. Pozostawić na statywie magnetycznym do etapu 4 w części *Procedura* w punkcie *Amplifikacja tagmentowanego DNA*.
TWB2 pozostanie w dołkach, aby zapobiec przesuszeniu kulek.

Amplifikacja tagmentowanego DNA

Na tym etapie następuje amplifikacja tagmentowanego DNA przy użyciu programu PCR o ograniczonym cyklu. Etap PCR dodaje adaptory indeksowane 1 (i7), adaptory indeksowane 2 (i5) oraz sekwencje wymagane do generacji klastra sekwencjonowania.

Materiały eksploatacyjne

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Płytki adapterów indeksowanych
- 96-dołkowa płytka PCR
- Woda niezawierająca nukleazy
- Folia uszczelniająca
- Probówki do mikrowirówki, 1,5 ml
- Końcówki do pipet
 - Pipety wielokanałowe 20 µl
 - Pipety wielokanałowe 200 µl

Informacje o odczynnikach

- Płytki adapterów indeksowanych
 - Dołek może zawierać > 10 µl adapterów indeksowanych.
 - Nie dodawać próbek do płytki adapterów indeksowanych.
 - Każdy dołek płytki do indeksowania jest przeznaczony wyłącznie do jednorazowego użytku.

Przygotowanie

1. Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Element	Przechowywanie	Instrukcje
EPM	od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze 4°C lub na lodzie przez 1 godzinę. Odwrócić, aby wymieszać, a następnie krótko odwirować.
Płytki adapterów indeksowanych	od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

2. Zapisać przedstawiony poniżej program eBLTS PCR w termocyklerze, używając odpowiedniej liczby cykli PCR wskazanej w tabeli poniżej.

- Wybrać opcję podgrzewania pokrywy i nastawić ją na 100°C.
- Ustawić objętość reakcji na 50 µl.
- 72°C przez 3 minuty
- 98°C przez 3 minuty
- X cykli o następujących parametrach:
 - 98°C przez 20 sekund
 - 60°C przez 30 sekund
 - 72°C przez 1 minutę
- 72°C przez 3 minuty
- Utrzymać w temperaturze 10°C

Całkowity czas przebiegu wynosi ok. 38 minut na 9 cykli i ok. 46 minut na 12 cykli.

Typ próbki wejściowej	Liczba cykli PCR (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1000 ng gDNA	9
50–1000 ng gDNA wyekstrahowanego z próbki FFPE	12
gDNA wyekstrahowane z krwi	9

Procedura

1. Połączyć poniższe, aby przygotować mieszaninę wyjściową do reakcji PCR. Pomnożyć każdą objętość przez liczbę przetwarzanych próbek.
 - EPM (23 μ l)
 - Woda niezawierająca nukleazy (23 μ l)Nadmiar odczynnika jest uwzględniony w objętości.
2. Pipetować mieszaninę wyjściową do reakcji PCR 10 razy, aby wymieszać, a następnie krótko odwirować.
3. Po umieszczeniu płytki na statywie magnetycznym użyć pipety wielokanałowej 200 μ l, aby usunąć i wylać TWB2.
Piana pozostająca na ścianach dołka nie wpływa negatywnie na bibliotekę.
4. Zdjąć płytkę ze statywu magnetycznego.
5. Natychmiast dodać 40 μ l mieszaniny wyjściowej do PCR bezpośrednio na kulki w każdym dołku.
6. Natychmiast wymieszać pipetą, aż kulki zostaną całkowicie zawieszane. Alternatywnie nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1600 obr./min przez 1 minutę.
7. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę z próbką i odwirować z prędkością 280 \times g przez 10 sekund.
8. Wirować płytkę adapterów indeksowanych z prędkością 1000 \times g przez 1 minutę.
9. Przygotować płytkę adapterów indeksowanych.
 - [$<$ 96 próbek] Przebić folię uszczelniającą na płytce adapterów indeksowanych nową końcówką pipety tylko nad dołkami odpowiadającymi liczbie przetwarzanych próbek.
 - [96 próbek] Wyrównać nową płytkę PCR z niskim kołnierzem nad płytką adapterów indeksowanych i nacisnąć, aby przebić folię uszczelniającą. Wyrzucić płytkę PCR użytą do przebicia folii uszczelniającej.
10. Używając nowej końcówki pipety, dodać 10 μ l przygotowanych adapterów indeksowanych do każdego dołka.
11. Używając pipety ustawionej na 40 μ l, pipetować 10 razy, aby wymieszać. Alternatywnie nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1600 obr./min przez 1 minutę.
12. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i odwirować z prędkością 280 \times g przez 10 sekund.
13. Umieścić w termocyklerze i uruchomić program eBLTS PCR.

PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku przerwania procedury należy przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 30 dni.

Oczyszczanie bibliotek

Ten etap wykorzystuje dwustronną procedurę oczyszczenia amplifikowanych bibliotek za pomocą kulek do usuwania dużych fragmentów, a następnie kulek do usuwania małych fragmentów bibliotek.

Materiały eksploatacyjne

- CB (kulki czyszczące)
- RSB (bufor do ponownego zawieszania)
- Świeżo przygotowany 80% etanol (EtOH)
- 96-dołkowa polipropylenowa płytka do przechowywania z głębokimi dołkami o pojemności 0,8 ml (płytką MIDI)
- 96-dołkowa płytka PCR
- Statyw magnetyczny na płytkę MIDI
- Statyw magnetyczny na płytkę PCR
- Probówki do mikrowirówki, 1,5 ml
- Woda niezawierająca nukleazy

Informacje o odczynnikach

- Kulki oczyszczające
 - Przed każdym użyciem wymieszać mieszadłem wirowym.
 - Często mieszać mieszadłem wirowym, aby się upewnić, że kulki są równomiernie rozłożone.
 - Aspirować i dozować powoli ze względu na lepkość roztworu.

Przygotowanie

1. Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Element	Przechowywanie	Instrukcje
CB	Temperatura pokojowa	Wymieszać mieszadłem wirowym i odwrócić, aby wymieszać, aż kolor płynu będzie jednorodny.
RSB	2°C do 8°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Wymieszać przez worteksowanie.

Procedura

1. Wytrząsać 96-dołkową płytkę PCR z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę, a następnie krótko wirować.
2. Umieścić płytkę PCR na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (1 minutę).
3. Wymieszać CB mieszadłem wirowym 3 razy przez 10 sekund, a następnie kilkakrotnie odwrócić w celu ponownego zawieszenia.
4. W przypadku wysokiej jakości gDNA należy wykonać poniższe czynności.
 - a. Dodać 77 µl wody niezawierającej nukleazy do każdego dołka nowej płytki MIDI.
 - b. Dodać 88 µl CB do każdego dołka płytki MIDI.
 - c. Przenieść 45 µl nadsącza z każdego dołka płytki PCR do odpowiedniego dołka na płytce MIDI.

- d. Wyrzucić płytkę PCR.
 - e. Pipetować każdy dołek 10 razy w celu wymieszania. Alternatywnie nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę.
 - f. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
 - g. Sprawdzić, czy nie ma pęcherzyków powietrza. W razie ich zaobserwowania wykonać wirowanie.
 - h. Umieścić płytkę MIDI na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (5 minut).
 - i. Podczas inkubacji dokładnie wymieszać CB mieszadłem wirowym, a następnie dodać 20 µl do każdego dołka nowej płytki MIDI.
 - j. Przenieść 200 µl nadsączu z każdego dołka pierwszej płytki MIDI do odpowiedniego dołka nowej płytki MIDI (zawierającej 20 µl CB).
 - k. Wyrzucić pierwszą płytkę MIDI.
 - l. Pipetować każdy dołek nowej płytki MIDI 10 razy w celu wymieszania. Alternatywnie nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę.
5. W przypadku wyekstrahowanych próbek FFPE należy wykonać opisane poniżej czynności.
- a. Dodać 81 µl CB do każdego dołka nowej płytki MIDI.
 - b. Przenieść 45 µl nadsączu z każdego dołka płytki PCR do odpowiedniego dołka na płytce MIDI.
 - c. Wyrzucić płytkę PCR.
 - d. Pipetować każdy dołek 10 razy w celu wymieszania. Alternatywnie nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę.
6. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
7. Sprawdzić, czy nie ma pęcherzyków powietrza. W razie ich zaobserwowania wykonać wirowanie.
8. Umieścić płytkę MIDI na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (5 minut).
9. Usunąć i wylać cały nadsącz bez naruszania kulek.
10. Przepłukać kulki zgodnie z poniższym opisem.
- a. Umieścić płytkę na statywie magnetycznym i dodać 200 µl świeżo przygotowanego 80% EtOH bez mieszania.
 - b. Inkubować przez 30 sekund.
 - c. Usunąć i wylać cały nadsącz bez naruszania kulek.
11. Przepłukać kulki po raz **drugi**.
12. Pozostawić przez 5 minut na statywie magnetycznym w celu wyschnięcia na powietrzu.
13. Susząc na powietrzu, użyć pipety 20 µl, aby usunąć i wylać pozostałości EtOH.
14. Zdjąć płytkę ze statywu magnetycznego.
15. Dodać 17 µl RSB do kulek.
16. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
17. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
18. Sprawdzić, czy nie ma pęcherzyków powietrza. W razie ich zaobserwowania wykonać wirowanie.

- Umieścić płytkę na statywie magnetycznym na płytce MIDI i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (2 minut).
- Przenieść 15 µl nadsącza do nowej 96-dołkowej płytki PCR.

PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku przerwania procedury nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 30 dni.

Pulowanie bibliotek przed wzbogaceniem

Na tym etapie biblioteki DNA są łączone z unikalnymi indeksami w jedną pulę do 12 bibliotek.

Metody pulowania

Pulowanie można przeprowadzić według objętości lub masy. Należy skorzystać z poniższej tabeli, aby określić odpowiednią metodę dla danego materiału wejściowego.

Tabela 2 Zalecane metody pulowania

Próbka wejściowa	Metoda pulowania
10–49 ng gDNA	Masa
50–1000 ng gDNA	Objętość
gDNA wyekstrahowane z próbek FFPE	Masa
gDNA wyekstrahowane z krwi	Objętość

- Jednokrotne wzbogacenie nie wymaga pulowania bibliotek przed wzbogaceniem. Jednakże konieczne może być dodanie RSB.
- Po kwantyfikacji biblioteki przed wzbogaceniem wszystkie typy próbek wejściowych mogą być pulowane według masy w celu uzyskania optymalnego balansu indeksu.
- Ostateczny uzysk bibliotek przed wzbogaceniem wygenerowanych w oddzielnych preparatach eksperymentalnych może się różnić. Dlatego zaleca się pulowanie według masy w celu uzyskania optymalnego balansu indeksu.
- Wzbogacenie 1-krotne należy stosować we wskazanych poniżej sytuacjach.
 - 10–49 ng gDNA
 - 50–1000 ng gDNA wyekstrahowanego z próbki FFPE
 - Wykrywanie niskiej częstotliwości alleli mniejszych do wykrycia wariantu somatycznego.

Pulowanie według masy

We wskazanych poniżej sytuacjach biblioteki należy kwantyfikować, aby użyć masy DNA na bibliotekę do wzbogacenia określonej w punkcie [Pulowanie bibliotek przed wzbogaceniem o równym stężeniu na stronie 36](#).

- 10–49 ng wejściowej próbki gDNA
- 50–1000 ng gDNA wyekstrahowanego z wejściowej próbki FFPE
- Wykrywanie niskiej częstotliwości alleli mniejszych do wykrycia wariantu somatycznego
- gDNA wyekstrahowane z krwi do optymalnego balansu indeksu

Kwantyfikacja bibliotek przed wzbogaceniem

1. Wykonać analizę 1 μ l bibliotek przed wzbogaceniem przy użyciu preferowanej metody oznaczania ilościowego opartej na fluorescencji, która wykorzystuje barwnik interkalujący dsDNA.
 - W przypadku 50–1000 ng wysokiej jakości gDNA należy oczekiwać \geq 500 ng uzysku biblioteki przed wzbogaceniem.
 - W przypadku 50–1000 ng gDNA wyekstrahowanego z próbek FFPE należy oczekiwać 500–6000 ng uzysku biblioteki przed wzbogaceniem, w zależności od jakości próbki początkowej.

UWAGA W przypadku metod oznaczania ilościowego z różnymi odchyleniami należy zakwalifikować metodę oznaczania ilościowego dla tej procedury. Wyniki zateżnienia mogą się różnić w zależności od zastosowanej metody.

Pulowanie bibliotek przed wzbogaceniem o równym stężeniu

Należy użyć poniższej tabeli, aby określić masę DNA na bibliotekę wymaganą do wzbogacenia, zgodnie z typem próbki i krotnością wzbogacania. Optymalne uzyski wzbogacania i działanie testu nie są gwarantowane w przypadku użycia niższych niż zalecane uzysków bibliotek przed wzbogaceniem.

Całkowita masa DNA w reakcji wzbogacania nie powinna przekraczać 6000 ng.

Próbka wejściowa	Krotność wzbogacania	Masa DNA na bibliotekę (ng)	Całkowita masa bibliotek DNA (ng)
Wysokiej jakości gDNA	12	250–500	3000–6000
gDNA wyekstrahowane z próbek FFPE	1	200	200

1. Zapisać indeksy bibliotek, które użytkownik planuje pulować na tym etapie.
2. Na podstawie stężenia każdej biblioteki obliczyć objętość, którą należy dodać do reakcji wzbogacania, aby uzyskać wymaganą masę DNA.
 - Wysokiej jakości gDNA: należy obliczyć objętość biblioteki potrzebnej na 250–500 ng materiału wejściowego.
 - gDNA wyekstrahowane z próbek FFPE: należy obliczyć objętość biblioteki potrzebnej na 200 ng materiału wejściowego.

3. Dodać obliczoną objętość dla każdej biblioteki do tego samego dołka płytki PCR.
4. W przypadku wykorzystywania wysokiej jakości gDNA wykonać jedną z poniższych czynności w oparciu o łączną objętość puli bibliotek przed wzbogaceniem:
 - Jeśli objętość biblioteki przed wzbogaceniem = 30 µl, przejść do punktu [Sondy do hybrydyzacji na stronie 38](#).
 - Jeśli objętość biblioteki przed wzbogaceniem jest < 30 µl, dodać RSB, aby uzyskać objętość całkowitą 30 µl.
 - Jeśli objętość biblioteki przed wzbogaceniem jest > 30 µl, należy użyć metody opartej na kulkach lub koncentratora próżniowego, aby zwiększyć stężenie spulowanej próbki. Dodać RSB do zatężonej spulowanej próbki, aby uzyskać całkowitą objętość 30 µl.
5. W przypadku wykorzystywania gDNA wyekstrahowanego z próbek FFPE wykonać jedną z poniższych czynności w oparciu o łączną objętość puli bibliotek przed wzbogaceniem.
 - Jeśli objętość biblioteki przed wzbogaceniem = 7,5 µl, przejść do punktu [Sondy do hybrydyzacji na stronie 38](#).
 - Jeśli objętość biblioteki przed wzbogaceniem jest < 7,5 µl, dodać RSB, aby osiągnąć objętość całkowitą 7,5 µl.

PUNKT BEZPIECZNEGO ZATRZYMANIA

W przypadku przerwania procedury nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 30 dni.

Pulowanie według objętości

Jeżeli wartość wejściowego gDNA wynosi 50–1000 ng, nie jest wymagana kwantyfikacja ani normalizacja poszczególnych bibliotek wygenerowanych w tym samym eksperymencie.

Aby osiągnąć optymalne działanie, należy pulować tylko próbki biblioteki przed wzbogaceniem przygotowane przez tego samego użytkownika, z użyciem tej samej partii odczynnika i tej samej płytki adapterów indeksowanych.

1. Zapisać indeksy bibliotek, które użytkownik planuje pulować na tym etapie.
2. Połączyć opisaną poniżej bibliotekę przed wzbogaceniem i objętości RSB w przypadku danej krotności wzbogacenia w tym samym dołku nowej płytki PCR.
Uzyskana objętość wynosi 30 µl.

Krotność wzbogacania*	Objętość każdej biblioteki przed wzbogaceniem (µl)	Objętość bufora RSB (µl)
1-krotność	14	16
2-krotność	14	2
3-krotność	10	0

Krotność wzbogacania*	Objętość każdej biblioteki przed wzbogaceniem (µl)	Objętość bufora RSB (µl)
4-krotność	7,5	0
5-krotność	6	0
6-krotność	5	0
7-krotność	4,2	0,6
8-krotność	3,7	0,4
9-krotność	3,3	0,3
10-krotność	3	0
11-krotność	2,7	0,3
12-krotność	2,5	0

* Informacje na temat niestandardowych krotności (od 2- do 11-krotności) – patrz [Ograniczenia dotyczące procedury na stronie 2](#).

PUNKT BEZPIECZNEGO ZATRZYMANIA

W przypadku przerwania procedury nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 30 dni.

[Opcjonalnie] Kwalifikacja bibliotek przed wzbogaceniem

W przypadku pulowania według objętości do kwantyfikacji bibliotek przed wzbogaceniem należy zastosować metodę opartą na fluorometrii, która wykorzystuje barwnik interkalujący dsDNA. Aby zakwalifikować biblioteki przed wzbogaceniem, należy użyć analizatora fragmentów DNA z odpowiednim zestawem do analizy fragmentów.

Do kwalifikacji biblioteki należy użyć łącznie 1 µl. Biblioteki przed wzbogaceniem są wystarczająco stężone, aby umożliwić małe rozcieńczenia do kwantyfikacji lub analizy fragmentów.

Sondy do hybrydyzacji

Na tym etapie następuje wiązanie docelowych regionów DNA, z sondami wychwytyjącymi.

Odczynniki z zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit są zgodne zarówno z panelami wzbogacania oligonukleotydów DNA firmy Illumina, jak i innych firm. Informacje na temat wymaganych specyfikacji paneli innych firm – patrz [Wymagania dotyczące panelu sond wzbogacających na stronie 11](#).

Materiały eksploatacyjne

- EHB2 (bufor hydrydyzacyjny Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (bufor HYB Buffer 2 + blokery IDT NXT Blockers) (niebieska zatyczka)

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

- Panel sond wzbogacających
- 96-dołkowa płytko PCR
- Folia uszczelniająca
- Przygotować na potrzeby późniejszej procedury:
 - SMB3 (kulki magnetyczne ze streptawidyną)
 - EEW (bufor płuczący Enhanced Enrichment Wash Buffer) (pomarańczowa zatyczka)

Informacje o odczynnikach

- NHB2 tworzy osad i ulega oddzieleniu podczas przechowywania.
- Panel sond wzbogacających odnosi się do wybranego panelu wzbogacania oligonukleotydów firmy Illumina.

Przygotowanie

1. Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Element	Przechowywanie	Instrukcje
EHB2	od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Wymieszać przez worteksowanie. W przypadku zaobserwowania kryształów i zmętnienia należy powtórzyć mieszanie mieszadłem wirowym lub wielokrotnie pipetować, aż roztwór będzie przezroczysty.
Panel sond wzbogacających (Illumina)	od -25°C do -15°C	Panele firmy Illumina i innych firm należy doprowadzić do temperatury pokojowej. Wymieszać przez worteksowanie.

Element	Przechowywanie	Instrukcje
NHB2 (niebieska zatyczka)	od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. W temperaturze pokojowej podgrzewać wstępnie w inkubatorze do mikropróbek do tej samej temperatury, co używana sonda, przez 5 minut. Wymieszać mieszadłem wirowym z maksymalną prędkością 3 razy po 10 sekund w celu ponownego zawieszenia. Krótco odwirować. Pipetować wielokrotnie od dna próbki. W przypadku zaobserwowania kryształów i zmętnienia należy powtórzyć mieszanie mieszadłem wirowym lub wielokrotnie pipetować, aż roztwór będzie przezroczysty. Stosować na ciepło, aby uniknąć ponownego utworzenia się osadów.
SMB3*	od 2°C do 8°C	Jeśli użytkownik przechodzi do następnej procedury bezpośrednio po 90-minutowym zatrzymaniu w programie HYB, należy doprowadzić do temperatury pokojowej co najmniej 2 godziny przed rozpoczęciem programu HYB.
EEW* (pomarańczowa próbka)	od -25°C do -15°C	Jeśli użytkownik przechodzi do następnej procedury bezpośrednio po 90-minutowym zatrzymaniu w programie HYB, należy doprowadzić do temperatury pokojowej co najmniej 2 godziny przed rozpoczęciem programu HYB. W temperaturze pokojowej podgrzewać wstępnie w inkubatorze do mikropróbek do odpowiedniej temperatury hybrydyzacji i wychwytywania przez 30 minut przed zakończeniem programu HYB.

* Jeśli użytkownik przerwie pracę przed następną procedurą, należy opóźnić przygotowanie tego odczynnika do momentu wykonania tej procedury.

2. Zapisać przedstawiony poniżej program HYB w termocyklerze, używając odpowiedniej liczby cykli wskazanej w [Tabela 3](#).
 - Wybrać opcję podgrzewania pokrywy i nastawić ją na 100°C.
 - Ustawić objętość reakcji
 - [Wysokiej jakości gDNA] 100 µl
 - [gDNA wyekstrahowane z próbek FFPE] 25 µl
 - 98°C przez 5 minut
 - X cykli po 1 minutę każdy, począwszy od temperatury 98°C przez pierwszy cykl, a następnie zmniejszając temperaturę o 2°C na cykl
 - Wstrzymać przez 90 minut w odpowiedniej temperaturze:
 - [gDNA wyekstrahowane z próbek FFPE] 58°C
 - [80 merów na panele sond] 58°C
 - [Rozpoznawanie wariantów somatycznych] 58°C
 - [Wszystkie inne] 62°C

Całkowity czas przebiegu to ok. 115 minut.

Tabela 3 Liczba cykli na próbkę lub panel

Typ próbki i panelu	Liczba cykli (X)
gDNA wyekstrahowane z próbek FFPE (niezależnie od typu panelu)	20
80 merów na panele sond (niezależnie od rodzaju próbki)	20
Rozpoznawanie wariantów somatycznych	20
Wszystkie inne próbki i panele	18

Procedura

1. [Wysokiej jakości gDNA] Dodać wymienione poniżej odczynniki *w podanej kolejności* do każdej pulowanej biblioteki na płytce PCR.
Nie tworzyć mieszaniny wyjściowej. Tworzenie mieszaniny wyjściowej NHB2 i EHB2 wpływa negatywnie na skuteczność wzbogacania.
 - NHB2 (niebieska zatyczka) (50 µl)
 - Panel sond wzbogacających (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. [Wysokiej jakości gDNA] Za pomocą pipety ustawionej na 90 µl pipetować każdy dołek 10 razy w celu wymieszania.
3. [DNA wyekstrahowane z próbek FFPE] Dodać następujące odczynniki *w podanej kolejności* do każdej pulowanej biblioteki na płytce PCR.

Nie tworzyć mieszaniny wyjściowej. Tworzenie mieszaniny wyjściowej NHB2 i EHB2 wpływa negatywnie na skuteczność wzbogacania.

- NHB2 (niebieska zatyczka) (12,5 µl)
 - Panel sond wzbogacających (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[gDNA wyekstrahowane z próbek FFPE]** Za pomocą pipety ustawionej na 20 µl pipetować każdy dołek 10 razy w celu wymieszania.
 5. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i odwirować z prędkością 280 × g przez 10 sekund.
 6. Umieścić płytkę z próbką na wstępnie zaprogramowanym termocyklerze i uruchomić program HYB.
 7. Przejść natychmiast do następnej procedury po zakończeniu czasu utrzymywania temperatury w programie HYB.



PRZESTROGA

Strącanie występuje, gdy temperatura reakcji hybrydyzacji spada poniżej temperatury pokojowej.

Wychwytywanie sond do hybrydyzacji

Podczas tego etapu kulki magnetyczne ze streptawidyną (SMB3) są wykorzystywane do wychwytywania sond, które uległy hybrydyzacji do docelowych regionów będących przedmiotem zainteresowania.

Materiały eksploatacyjne

- EEW (bufor płuczący Enhanced Enrichment Wash Buffer) (pomarańczowa zatyczka)
- EE1 (bufor elucyjny Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (bufor elucyjny Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (kulki magnetyczne ze streptawidyną)
- Probówka do mikrowirówki; 1,5 ml
- 96-dołkowa płytkę MIDI
- 96-dołkowa płytkę PCR
- Folia uszczelniająca
- Statyw magnetyczny na płytkę MIDI
- Przygotować na potrzeby późniejszej procedury:
 - Mieszanina Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Informacje o odczynnikach

- EEW
 - Upewnić się, że odczynnik EEW był rozmrażany w temperaturze pokojowej przez co najmniej 2 godziny przed wstępnym podgrzaniem w inkubatorze do mikropróbek.
 - Upewnić się, że odczynnik EEW był podgrzewany w inkubatorze do mikropróbek przez 30 minut przed zakończeniem programu HYB.
 - Pozostawić odczynnik EEW w inkubatorze do mikropróbek, gdy nie jest używany. Odczynnik EEW powinien być ogrzewany przez cały protokół.
 - Może być mętny po osiągnięciu temperatury pokojowej.
 - Może zmienić kolor na żółty.
- SMB3
 - Odczynnik SMB3 musi osiągnąć temperaturę pokojową przed użyciem.

Przygotowanie

1. Przygotować wymienione poniżej materiały eksploatacyjne.

Element	Przechowywanie	Instrukcje
SMB3	od 2°C do 8°C	Odstawić na 2 godziny w celu doprowadzenia do temperatury pokojowej. Odwrócić, a następnie wymieszać mieszadłem wirowym aż do całkowitego zawieszenia.
EEW (pomarańczowa probówka)	od -25°C do -15°C	Po 2 godzinach inkubacji w temperaturze pokojowej podgrzewać wstępnie w inkubatorze do mikropróbek do odpowiedniej temperatury hybrydyzacji i wychwytywania przez 30 minut przed zakończeniem programu HYB.
EE1	od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej, a następnie wymieszać mieszadłem wirowym.
HP3	od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej, a następnie wymieszać mieszadłem wirowym.
ET2	od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Wymieszać przez worteksowanie.
EPM	od -25°C do -15°C	Rozmrażać na lodzie przez 1 godzinę. Odwrócić, aby wymieszać, a następnie krótko odwirować. Odłożyć na lód.
PPC	od -25°C do -15°C	Rozmrażać na lodzie przez 1 godzinę. Wymieszać mieszadłem wirowym, następnie krótko wirować. Odłożyć na lód.

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

2. Podgrzać wstępnie jeden inkubator do mikropróbek z wkładką bloku grzejnego MIDI, aby inkubować płytkę na próbki do jednej z wymienionych poniżej temperatur. Do wstępnego podgrzania bufora EEW można użyć opcjonalnego drugiego inkubatora do mikropróbek. Ustawić bufor EEW na górze wkładki bloku grzejnego MIDI.
 - [FFPE] 58°C
 - [80 merów na panele sond] 58°C
 - [Rozpoznawanie wariantów somatycznych] 58°C
 - [Wszystkie inne] 62°C

Procedura

Wychwytywanie

1. Dodać SMB3 do odpowiedniego dołka nowej płytki MIDI w opisany poniżej sposób.
 - [Wysokiej jakości gDNA] Dodać 250 µl SMB3.
 - [gDNA wyekstrahowane z próbek FFPE] Dodać 62,5 µl SMB3.
2. Używając pipety ustawionej na 100 µl w przypadku wysokiej jakości gDNA lub na 25 µl w przypadku próbek FFPE, przenieść każdą pulowaną bibliotekę z 96-dołkowej płytki PCR do odpowiedniego dołka nowej płytki MIDI.
3. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 4 minuty.
4. W przypadku rozpryskania należy krótko odwirować płytkę.
5. Umieścić płytkę pulowanych bibliotek na wkładce bloku grzejnego MIDI w inkubatorze do mikropróbek, pod probówką z buforem EEW, zamknąć pokrywę, a następnie inkubować przez 15 minut w odpowiedniej temperaturze:
 - [FFPE] 58°C
 - [80 merów na panel sond] 58°C
 - [Rozpoznawanie wariantów somatycznych] 58°C
 - [Wszystkie inne] 62°C
6. Wyjąć płytkę pulowanych bibliotek i wirować z prędkością 280 × g przez 30 sekund.
7. Umieścić płytkę MIDI na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (2 minuty).
8. [Wysokiej jakości gDNA] Użyć pipety ustawionej na objętość 200 µl, aby usunąć i wylać cały nadsącz z każdego dołka bez naruszania osadu kulek.
9. [gDNA wyekstrahowane z próbek FFPE] Użyć pipety ustawionej na objętość 90 µl, aby usunąć i wylać cały nadsącz z każdego dołka bez naruszania osadu kulek.
10. Usunąć pozostały nadsącz i wylać go.

Płukanie

1. Zdjąć płytkę ze statywu magnetycznego.
2. **[Wysokiej jakości gDNA]** Szybko usunąć EEW z inkubatora do mikropróbek i dodać 200 µl do każdego dołka.
3. **[gDNA wyekstrahowane z próbek FFPE]** Szybko usunąć EEW z inkubatora do mikropróbek i dodać 50 µl do każdego dołka.
4. Niewykorzystany EEW należy umieścić w inkubatorze do mikropróbek i ogrzewać.
5. Nałożyć folię uszczelniającą i wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 4 minuty.
6. Umieścić płytkę na próbki na wkładce bloku grzejnego MIDI w inkubatorze do mikropróbek, pod probówką z buforem EEW, zamknąć pokrywę, a następnie inkubować przez 5 minut w odpowiedniej temperaturze:
 - [FFPE] 58°C
 - [80 merów na panele sond] 58°C
 - [Rozpoznawanie wariantów somatycznych] 58°C
 - [Wszystkie inne panele] 62°C
7. Umieścić płytkę MIDI na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (2 minuty).
8. Za pomocą pipety ustawionej na 200 µl w przypadku wysokiej jakości gDNA lub 50 µl w przypadku FFPE usunąć i wylać cały nadsącz z każdego dołka.
9. Powtórzyć czynności 1–8 dwukrotnie, wykonując łącznie trzy płukania.

Płukanie podczas przenoszenia

1. Zdjąć płytkę ze statywu magnetycznego.
2. **[Wysokiej jakości gDNA]** Szybko usunąć EEW z inkubatora do mikropróbek i dodać 200 µl do każdego dołka.
3. **[gDNA wyekstrahowane z próbek FFPE]** Szybko usunąć EEW z inkubatora do mikropróbek i dodać 50 µl do każdego dołka.
4. Nałożyć folię uszczelniającą i wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 4 minuty. W przypadku rozpryskiwania należy zmniejszyć prędkość do 1600 obr./min.
5. Przenieść roztwór zawieszonych kulek do nowej płytki MIDI.
Pewna ilość próbki może pozostać w dołkach.



PRZESTROGA

Przeniesienie odczynnika minimalizuje przenoszenie pozostałych odczynników, które mogą hamować dalszy proces PCR.

6. Umieścić płytkę z próbką na wkładce bloku grzejnego MIDI w inkubatorze do mikropróbek, zamknąć pokrywę, a następnie inkubować przez 5 minut w odpowiedniej temperaturze:
 - [FFPE] 58°C

- [80 merów na panele sond] 58°C
 - [Rozpoznawanie wariantów somatycznych] 58°C
 - [Wszystkie inne] 62°C
7. Umieścić płytkę MIDI na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (2 minuty).
 8. Za pomocą pipety ustawionej na 200 µl w przypadku wysokiej jakości gDNA lub 50 µl w przypadku FFPE usunąć i wyłączyć cały nadsącz z każdego dołka.
 9. Odwirować płytkę z prędkością 280 × g przez 30 sekund.
 10. Umieścić na statywie magnetycznym na płytce MIDI na 10 sekund.
 11. Użyć pipety 20 µl, aby usunąć i wyłączyć pozostałości płynu z każdego dołka.
 12. Natychmiast przejść do punktu [Elucja na stronie 46](#), aby zapobiec nadmiernemu wysuszeniu kulek i utracie uzysku biblioteki.

Elucja

1. Aby przygotować mieszaninę wyjściową do elucji, należy przygotować wymienione poniżej objętości. Pomnożyć każdą objętość przez liczbę przetwarzanych bibliotek pulowanych.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Dodatkowy nadmiar odczynnika jest uwzględniony w objętości.
2. Wymieszać mieszałem wirowym, a następnie krótko odwirować.
3. Zdjąć płytkę MIDI ze statywu magnetycznego.
4. Dodać 23 µl mieszaniny wyjściowej do elucji do każdego dołka.
5. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
6. Inkubować płytkę w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
7. Wirować z prędkością 280 × g przez 30 sekund.
8. Umieścić płytkę MIDI na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (2 minuty).
9. Przenieść 21 µl nadsączu z płytki MIDI do odpowiedniego dołka nowej 96-dołkowej płytki PCR.
10. Wyrzucić płytkę MIDI.
11. Dodać 4 µl ET2 do każdego dołka zawierającego 21 µl nadsączu.
12. Ustawić pipetę na 20 µl i powoli pipetować każdy dołek 10 razy, aby wymieszać.
13. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wirować z prędkością 280 × g przez 10 sekund.
14. Inkubować płytkę w temperaturze pokojowej przez 1 minutę.

Amplifikacja biblioteki wzbogaconej

Ten etap wykorzystuje metodę PCR do amplifikacji wzbogaconej biblioteki.

Materiały eksploatacyjne

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Folia uszczelniająca

Przygotowanie

1. Przygotować następujące materiały eksploatacyjne:

Element	Przechowywanie	Instrukcje
EPM	od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze 4°C lub na lodzie przez 1 godzinę. Odwrócić, aby wymieszać, a następnie krótko odwirować. Odłożyć na lód.
PPC	od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze 4°C na lodzie przez 1 godzinę. Wymieszać mieszadłem wirowym, następnie krótko wirować. Odłożyć na lód.

2. Zapisać przedstawiony poniżej program AMP w termocyklerze, używając odpowiedniej liczby cykli PCR wskazanej w tabeli poniżej.

- Wybrać opcję podgrzewania pokrywy i nastawić ją na 100°C.
- Ustawić objętość reakcji na 50 µl.
- 98°C przez 45 sekund
- (X) cykli o następujących parametrach:
 - 98°C przez 30 sekund
 - 60°C przez 30 sekund
 - 72°C przez 30 sekund
- 72°C przez 5 minut
- Utrzymać w temperaturze 10°C

Całkowity czas przebiegu to ok. 35 minut.

Typ próbki i panelu	(X) cykli
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) do wysokiej jakości gDNA	10
Illumina Exome Panel (CEX) do próbek FFPE	12
Wszystkie inne próbki i panele	12 ¹²³⁴

¹ Można dostosować do 15 cykli w przypadku małych paneli innych firm poprzez późniejszą optymalizację. W przypadku korzystania z próbek FFPE liczbę cykli można dostosować do 17.

² Można dostosować do 17 cykli w przypadku paneli innych firm, które mają tylko 500 sond. W przypadku korzystania z próbek FFPE liczbę cykli można dostosować do 19.

³ Można dostosować do 14 cykli w przypadku próbek FFPE.

⁴ Zwiększenie liczby cykli PCR może skutkować wyższym współczynnikiem duplikacji i mniejszymi rozmiarami fragmentów w przypadku próbek FFPE.

Procedura

1. Dodać 5 µl PPC do każdego dołka.
2. Dodać 20 µl EPM do każdego dołka.
3. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 1 minutę.
4. Wirować płytkę z prędkością 280 × g przez 10 sekund.
5. Umieścić na wstępnie zaprogramowanym termocyklerze i uruchomić program AMP.

PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

Na czas przerwy w wykonywaniu testów należy przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C nie dłużej niż przez dwa dni. Alternatywnie pozostawić na termocyklerze przez czas do 24 godzin.

Oczyszczanie amplifikowanej biblioteki wzbogaconej

Ten etap wykorzystuje kulki oczyszczające do oczyszczenia wzbogaconej biblioteki i usunięcia niepożądanych produktów.

Materiały eksploatacyjne

- CB (kulki czyszczące)
- RSB (bufor do ponownego zawieszania)
- Świeżo przygotowany 80% etanol (EtOH)
- Folie uszczelniające
- 96-dołkowa płytkę MIDI
- 96-dołkowa płytkę PCR
- Statyw magnetyczny na płytkę MIDI

Informacje o odczynnikach

- Kulki oczyszczające
 - Przed każdym użyciem wymieszać mieszadłem wirowym.
 - Często mieszać mieszadłem wirowym, aby się upewnić, że kulki są równomiernie rozłożone.
 - Aspirować i dozować powoli ze względu na lepkość roztworu.

Przygotowanie

1. Przygotować wymienione poniżej materiały eksploatacyjne.

Element	Przechowywanie	Instrukcje
CB	Temperatura pokojowa	Wymieszać mieszadłem wirowym i odwrócić, aby wymieszać, aż kolor płynu będzie jednorodny.
RSB	od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej. Wymieszać przez worteksowanie.

2. Przygotować świeży 80% roztwór EtOH z absolutnego etanolu.

Procedura

1. Wirować płytkę PCR z prędkością 280 × g przez 10 sekund.
2. Wymieszać mieszadłem wirowym CB 3 razy przez 10 sekund, a następnie odwrócić.
3. Dodać 40,5 µl CB do każdego dołka lub nowej płytki **MIDI**.
4. Przenieść 45 µl z każdego dołka płytki PCR do odpowiedniego dołka na płytce MIDI.
5. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę.
6. Inkubować płytkę MIDI w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
7. Wirować z prędkością 280 × g przez 10 sekund.
8. Umieścić płytkę MIDI na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (5 minut).
9. Za pomocą pipety ustawionej na 95 µl z każdego dołka usunąć cały nadsącz i wylać go.
10. Płukać dwa razy w opisany poniżej sposób.
 - a. Umieścić płytkę na statywie magnetycznym i dodać 200 µl świeżo przygotowanego 80% EtOH bez mieszania.
 - b. Inkubować przez 30 sekund.
 - c. Usunąć i wylać cały nadsącz bez naruszania kulek.
11. Pozostawić przez 5 minut na statywie magnetycznym w celu wyschnięcia na powietrzu.
12. Susząc na powietrzu, użyć pipety 20 µl, aby usunąć i wylać pozostałości EtOH z każdego dołka.
13. Zdjąć ze statywu magnetycznego i dodać 32 µl RSB do każdego dołka.
14. Nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 1 minutę.
15. Inkubować płytkę w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
16. Wirować z prędkością 280 × g przez 10 sekund.
17. Umieścić płytkę MIDI na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się przejrzysta (2 minuty).
18. Przenieść 30 µl nadsączu z 96-dołkowej płytki MIDI do odpowiedniego dołka nowej płytki PCR.
19. Wyrzucić płytkę MIDI.

PUNKT BEZPIECZNEGO PRZERWANIA OZNACZEŃ

W przypadku przerwania procedury nałożyć folię uszczelniającą na płytkę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C nie dłużej niż przez 7 dni.

Sprawdzanie bibliotek wzbogaconych

Aby oznaczyć ilościowo wejściowy dwuniciowy gDNA, należy użyć metody opartej na fluorescencji, która wykorzystuje barwnik interkalujący. Unikać metod pomiaru całkowitego kwasu nukleinowego, takich jak NanoDrop lub innych metod pomiaru absorbancji UV.

1. Przeanalizować 1 µl wzbogaconych bibliotek, używając własnej metody kwantyfikacji.

UWAGA Całkowita molarność sondy wpływa proporcjonalnie na uzysk biblioteki po wzbogaceniu.

Należy spodziewać się średniej wielkości fragmentu 125–235 bp i rozkładu fragmentów DNA w zakresie wielkości od ok. 200 bp do ok. 1000 bp.

Rozcieńczanie bibliotek do stężenia początkowego

Ten etap polega na rozcieńczaniu bibliotek do stężenia początkowego dla posiadanego systemu sekwencjonowania i jest pierwszym krokiem w rozcieńczeniu seryjnym. Po rozcieńczeniu do stężenia początkowego biblioteki są gotowe do denaturacji i rozcieńczenia do końcowego stężenia ładowania.

Do sekwencjonowania, niezależnie od używanego panelu sond wzbogacających, firma Illumina zaleca skonfigurowanie przebiegu w trybie sparowanych końców ze 151 cyklami na odczyt (2 × 151) i 10 cyklami na odczyt indeksowy. Jeśli użytkownik chce uzyskać mniej nakładających się odczytów lub mniej nieprzetworzonego pokrycia, można ograniczyć sekwencjonowanie do 2 × 126 lub 2 × 101.

1. Wartość molarną biblioteki lub pulowanych bibliotek należy obliczyć, korzystając z podanego poniżej wzoru.
 - W przypadku bibliotek zakwalifikowanych na analizatorze fragmentów DNA należy użyć wielkości średniej otrzymanej dla biblioteki.
 - W przypadku wszystkich innych metod kwalifikacji należy użyć 350 bp jako wielkości średniej biblioteki.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{średnia wielkość biblioteki (bp)}} = \text{Molarność (nM)}$$

Na przykład: jeśli stężenie biblioteki wynosi 20 ng/µl, a wielkość średnia wynosi 350 bp, wynikowa wartość molarności wynosi 86,58 nM.

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

2. Używając wartości molarności, należy obliczyć objętości RSB i biblioteki potrzebne do rozcieńczenia bibliotek do stężenia początkowego dla danego systemu.

System sekwencjonowania	Minimalna wymagana objętość biblioteki (µl)	Stężenie początkowe (nM)	Ostateczne stężenie ładowania (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) lub 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM to stężenie początkowe w odniesieniu do ostatecznego stężenia ładowania 350 pM. W razie potrzeby dostosować ostateczne stężenie ładowania zgodnie z poniższą tabelą.

Ostateczne stężenie ładowania (pM)	Stężenie spulowanej biblioteki (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

- Rozcieńczyć biblioteki za pomocą RSB:
 - Biblioteki oznaczone ilościowo jako multipleksowana pula bibliotek** — rozcieńczyć pulę do stężenia początkowego dla danego systemu.
 - Biblioteki oznaczone ilościowo indywidualnie** — rozcieńczyć każdą bibliotekę do stężenia początkowego dla danego systemu. Dodać 10 µl każdej rozcieńczonej biblioteki do próbki, aby utworzyć multipleksowaną pulę bibliotek.
- Postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi denaturacji i rozcieńczania dla danego systemu, aby rozcieńczyć do ostatecznego stężenia ładowania.
 - Informacje na temat systemu NextSeq 550Dx – patrz [Przygotowanie sekwencjonowania w systemie NextSeq 550Dx na stronie 52](#).
 - Informacje na temat systemu MiSeqDx można znaleźć w części [Przygotowanie sekwencjonowania MiSeqDx na stronie 54](#).
 - Informacje na temat systemu NovaSeq 6000Dx można znaleźć w części [Przygotowanie sekwencjonowania w systemie NovaSeq 6000Dx na stronie 55](#).

Ostateczne stężenie ładowania jest punktem wyjścia i stanowi ogólną wytyczną. Należy zoptymalizować stężenia pod kątem procedury i metody oznaczania ilościowego w kolejnych przebiegach sekwencjonowania lub przez miareczkowanie komory przepływowej.

Przygotowanie sekwencjonowania w systemie NextSeq 550Dx

Należy skorzystać z poniższych instrukcji dotyczących denaturacji i rozcieńczania bibliotek do sekwencjonowania w systemie sekwencjonowania NextSeq 550Dx.

Materiały eksploatacyjne

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

Przygotowanie

Przygotować *świeży* roztwór 0,2N NaOH do denaturacji bibliotek do sekwencjonowania. Przygotowuje się dodatkową objętość, aby niewielkie błędy pipetowania nie miały wpływu na ostateczne stężenie NaOH.



PRZESTROGA

Świeżo rozcieńczony 0,2N NaOH jest niezbędny w procesie denaturacji. Nieprawidłowa denaturacja może zmniejszyć wydajność.

1. W probówce do mikrowirówki wymieszać podane poniżej objętości, aby rozcieńczyć 1N NaOH do 0,2N NaOH:
1. Przygotować wymienione poniżej materiały eksploatacyjne.

Element	Przechowywanie	Instrukcje
HT1	od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. Przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C. Wyjąć z lodówki tuż przed rozcieńczeniem zdenaturowanych bibliotek.

2. W celu przygotowania świeżego rozcieńczenia NaOH należy wymieszać w probówce do mikrowirówki podane poniżej objętości:
 - Woda o jakości laboratoryjnej (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)W wyniku tego uzyskuje się 1 ml 0,2N NaOH.
3. Odwrócić probówkę kilkakrotnie w celu zmieszania.

4. W celu przygotowania 200 mM Tris-HCl o pH 7,0 należy wymieszać w probówce do mikrowirówki podane poniżej objętości.

- woda o jakości laboratoryjnej (800 µl)
- 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

W wyniku tego uzyskuje się 1 ml 200 mM Tris-HCl o pH 7,0.

UWAGA Probówka powinna być zamknięta zatyczką. Użyć świeżego rozcieńczenia w ciągu **12 godzin**.

Denaturacja bibliotek

1. W probówce do mikrowirówki należy wymieszać podane poniżej objętości biblioteki i świeżo rozcieńczonego 0,2N NaOH.

- 10 µl biblioteki
- 10 µl 0,2N NaOH

2. Krótco wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę.

3. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.

4. Dodać 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Rozcieńczanie zdenaturowanych bibliotek do stężenia 20 pM

1. Dodać 970 µl wstępnie schłodzonego HT1 do probówki zawierającej zdenaturowane biblioteki. W wyniku tego uzyskuje się zdenaturowaną bibliotekę 20 pM.

2. Krótco wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę.

3. Umieścić biblioteki o stężeniu 20 pM na lodzie do momentu uzyskania gotowości do przejścia do końcowego rozcieńczania.

Rozcieńczanie bibliotek do stężenia ładowania

1. Dodać podane poniżej objętości, aby rozcieńczyć zdenaturowany roztwór biblioteki o stężeniu 20 pM do stężenia 1,2 pM.

- Zdenaturowany roztwór biblioteki (78 µl)
- Wstępnie schłodzony HT1 (1222 µl)

Całkowita objętość wynosi 1,3 ml przy stężeniu 1,2 pM.

2. Odwrócić, aby wymieszać, a następnie odwirować pulsacyjnie.

3. Przejść do sekwencjonowania. Patrz *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx (nr dokumentu: 1000000009513)*.

Przygotowanie sekwencjonowania MiSeqDx

Należy skorzystać z poniższych instrukcji dotyczących denaturacji i rozcieńczania bibliotek do sekwencjonowania w systemie sekwencjonowania MiSeqDx.

Materiały eksploatacyjne

- HT1 (bufor hybrydacyjny)
- 1N NaOH

Przygotowanie

Przygotować *świeży* roztwór 0,2N NaOH do denaturacji bibliotek do sekwencjonowania. Przygotowuje się dodatkową objętość, aby niewielkie błędy pipetowania nie miały wpływu na ostateczne stężenie NaOH.



PRZESTROGA

Świeżo rozcieńczony 0,2N NaOH jest niezbędny w procesie denaturacji. Nieprawidłowa denaturacja może zmniejszyć wydajność.

1. W probówce do mikrowirówki wymieszać podane poniżej objętości, aby rozcieńczyć 1N NaOH do 0,2N NaOH:
1. Przygotować wymienione poniżej materiały eksploatacyjne.

Element	Przechowywanie	Instrukcje
HT1	od -25°C do -15°C	Rozmrażać w temperaturze pokojowej. Przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C. Wyjąć z lodówki tuż przed rozcieńczeniem zdenaturowanych bibliotek.

2. W celu przygotowania świeżego rozcieńczenia NaOH należy wymieszać w probówce do mikrowirówki podane poniżej objętości:
 - Woda o jakości laboratoryjnej (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)

W wyniku tego uzyskuje się 1 ml 0,2N NaOH.

UWAGA Probówka powinna być zamknięta zatyczką. Użyć świeżego rozcieńczenia w ciągu **12 godzin**.

Denaturacja biblioteki 4 nM

1. W probówce do mikrowirówki należy wymieszać podane poniżej objętości.
 - Biblioteka 4 nM (5 µl)
 - 0,2N NaOH (5 µl)
2. Krótco wymieszać mieszadłem wirowym, a następnie wirować z prędkością 280 × g przez 1 minutę.
3. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
4. Dodać 990 µl wstępnie schłodzonego HT1 do próbki zawierającej zdenaturowaną bibliotekę.
W wyniku tego uzyskuje się 1 ml zdenaturowanej biblioteki 20 pM.

Rozcieńczanie zdenaturowanej biblioteki do stężenia 20 pM

1. Rozcieńczyć do żądanego stężenia, używając wymienionych poniżej objętości.

Stężenie	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Biblioteka 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Wstępnie schłodzony HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Odwrócić, aby wymieszać, a następnie odwirować pulsacyjnie.
3. Prześć do sekwencjonowania. Instrukcje – patrz *Instrukcja obsługi aparatu MiSeqDx z oprogramowaniem MOS w ver. 4 (nr dokumentu: 1000000157953)*.

Przygotowanie sekwencjonowania w systemie NovaSeq 6000Dx

Należy skorzystać z poniższych instrukcji dotyczących denaturacji i rozcieńczania bibliotek do sekwencjonowania w systemie sekwencjonowania NovaSeq 6000Dx.

Materiały eksploatacyjne

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (bufor do ponownego zawieszania)
- 1N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- Probówka na bibliotekę NovaSeq 6000Dx

Przygotowanie

Przygotować *świeży* roztwór 0,2N NaOH do denaturacji bibliotek do sekwencjonowania. Przygotowuje się dodatkową objętość, aby niewielkie błędy pipetowania nie miały wpływu na ostateczne stężenie NaOH.



PRZESTROGA

Świeżo rozcieńczony 0,2N NaOH jest niezbędny w procesie denaturacji. Nieprawidłowa denaturacja może zmniejszyć wydajność.

1. W probówce do mikrowirówki wymieszać podane poniżej objętości, aby rozcieńczyć 1N NaOH do 0,2N NaOH:

Tabela 4 Tryb S2

Odczynnik	Objętość w jednej komorze przepływowej (µl)	Objętość w dwóch komorach przepływowych (µl)
Woda o jakości laboratoryjnej	40	80
Roztwór podstawowy 1N NaOH	10	20

Z tych objętości uzyskuje się 50 µl 0,2N NaOH do jednej komory przepływowej oraz 100 µl 0,2N NaOH do dwóch komór przepływowych.

Tabela 5 Tryb S4

Odczynnik	Objętość w jednej komorze przepływowej (µl)	Objętość w dwóch komorach przepływowych (µl)
Woda o jakości laboratoryjnej	80	160
Roztwór podstawowy 1N NaOH	20	40

Z tych objętości uzyskuje się 100 µl 0,2N NaOH do jednej komory przepływowej oraz 200 µl 0,2N NaOH do dwóch komór przepływowych.

2. Odwrócić kilka razy, aby wymieszać, lub dokładnie wymieszać mieszadłem wirowym.

UWAGA Probówka powinna być zamknięta zatyczką. Użyć świeżego rozcieńczenia w ciągu **12 godzin**.

Tworzenie puli znormalizowanych bibliotek

Stężenie ładowania może się różnić w zależności od metody przygotowania, kwantyfikacji i normalizacji biblioteki.

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Poniższe instrukcje dotyczą normalizacji bibliotek do odpowiedniego stężenia, a następnie pulowania bibliotek. Biblioteki sekwencjonowane w tej samej komorze przepływowej muszą zostać połączone w jedną znormalizowaną pulę.

UWAGA Maksymalna liczba próbek, które można umieścić na jednym pasie w przebiegu z użyciem zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, wynosi 192. To ograniczenie wynika z całkowitej liczby indeksów UD w zestawach A i B.

Normalizacja bibliotek do pulowania

1. Określić wymagane stężenie pulowanej biblioteki w zależności od docelowego ostatecznego stężenia ładowania.
 - Jeżeli ostateczne stężenie ładowania wynosi 350 pM, wymagane stężenie spulowanej biblioteki wynosi 1,75 nM.
 - Aby określić stężenie spulowanej biblioteki w odniesieniu do odmiennego ostatecznego stężenia ładowania – patrz [Rozcieńczenie bibliotek do stężenia początkowego na stronie 50](#).
2. Znormalizować biblioteki do docelowego stężenia spulowanej biblioteki przy użyciu 10 mM Tris-HCl (pH = 8,5).
Informacje o rozcieńczaniu bibliotek do odpowiedniego stężenia – patrz [Kalkulator pulowania](#) na stronie internetowej firmy Illumina.

Zalecane stężenia ładowania

Optymalne stężenie ładowania DNA zależy od typu biblioteki i rozmiaru insertu. W przypadku bibliotek > 450 bp konieczne może być zastosowanie wyższych stężeń ładowania.

Pulowanie znormalizowanych bibliotek i dodawanie opcjonalnej kontroli PhiX

1. Połączyć odpowiednią objętość każdej znormalizowanej biblioteki w nowej probówce do mikrowirówki, aby uzyskać jedną z następujących objętości ostatecznych:

Tryb	Objętość ostateczna (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Opcjonalnie]** Dodać 1% niedenaturowanej kontroli PhiX> typu spike-in w opisany poniżej sposób.
 - a. Rozcieńczyć kontrolę PhiX o stężeniu 10 nM do 2,5 nM przy użyciu 10 mM Tris-HCl (pH = 8,5).
 - b. Dodać do próbki z pulą niedenaturowanych bibliotek odpowiednią objętość niedenaturowanej kontroli PhiX o stężeniu 2,5 nM.

Tryb	Niedenaturowana kontrola PhiX o stężeniu 2,5 nM (µl)	Pula niedenaturowanych bibliotek (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Podczas dodawania kontroli PhiX zaleca się stosować ilość równą 1%, aby uzyskać odpowiednio zbalansowane biblioteki. W przypadku bibliotek o niskiej różnorodności może być wymagana większa ilość. Aby użyć kontroli PhiX z bibliotekami o niskiej różnorodności, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina w celu uzyskania wskazówek.

Denaturacja puli bibliotek i opcjonalnej kontroli PhiX

1. Dodać 0,2N NaOH do próbki puli niedenaturowanych bibliotek i opcjonalnej kontroli PhiX w opisany poniżej sposób.

Komora przepływowa	0,2N NaOH	Pula niedenaturowanych bibliotek (µl)	Uzyskana objętość
S2	37	150	187 µl lub 187,9 µl z kontrolą PhiX
S4	77	310	387 µl lub 388,9 µl z kontrolą PhiX

2. Zamknąć, a następnie krótko wymieszać mieszadłem wirowym.
3. Wirować z prędkością 280 × g przez maksymalnie 1 minutę.
4. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 8 minut w celu denaturacji.
5. W celu neutralizacji dodać 400 mM Tris-HCl (pH = 8,0) w opisany poniżej sposób.

Tryb	400 mM Tris-HCl; pH 8,0 (µl)	Uzyskana objętość
S2	38	225 µl lub 225,9 µl z kontrolą PhiX
S4	78	465 µl lub 466,9 µl z kontrolą PhiX

6. Zamknąć, a następnie krótko wymieszać mieszadłem wirowym.
7. Wirować z prędkością 280 × g przez maksymalnie 1 minutę.
8. Przenieść całą objętość zdenaturowanej biblioteki lub zdenaturowanej biblioteki i kontroli PhiX do próbki na bibliotekę NovaSeq 6000Dx.
9. Przejsć do sekwencjonowania. Instrukcje – patrz *NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation* (Dokumentacja dotycząca aparatu NovaSeq 6000Dx) (nr dokumentu: 200010105).

Rozwiązywanie problemów

Aby rozwiązać problemy występujące podczas procedury, należy skorzystać z poniższej tabeli. Jeśli przebieg sekwencjonowania lub przygotowanie biblioteki dla próbki dwukrotnie zakończy się niepowodzeniem, do rozwiązania problemu mogą być konieczne dodatkowe czynności. Skontaktować się z pomocą techniczną firmy Illumina.

Obserwacja	Możliwa przyczyna	Zalecane działanie
Przebieg sekwencjonowania nie spełnia specyfikacji kontroli jakości przebiegu	Błąd w procedurze testu związany z działaniem użytkownika lub wyposażeniem laboratoryjnym	Należy przeprowadzić kwalifikację wzbogaconych biblioteki, aby zapewnić odpowiedni uzysk biblioteki i dystrybucję wielkości fragmentów. Powtórzyć przygotowanie biblioteki począwszy od jednej z poniższych czynności, w zależności od tego, w którym miejscu wystąpił błąd związany ze sposobem użycia lub wyposażeniem. Jeśli wystąpił nieznan błąd lub inne błędy, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina, aby rozwiązać problem związany z przebiegiem. <ul style="list-style-type: none">• Ponowne sekwencjonowanie bibliotek. Patrz Przygotowanie sekwencjonowania w systemie NextSeq 550Dx na stronie 52, Przygotowanie sekwencjonowania MiSeqDx na stronie 54 lub Przygotowanie sekwencjonowania w systemie NovaSeq 6000Dx na stronie 55.• Ponowne wzbogacanie bibliotek. Patrz Sondy do hybrydyzacji na stronie 38.• Rozpocząć przygotowanie biblioteki od początku procedury. Patrz Instrukcja użytkownika na stronie 22.
	Problem związany z aparatem	Skontaktować się z pomocą techniczną firmy Illumina.

Obserwacja	Możliwa przyczyna	Zalecane działanie
Błąd związany z generowaniem pliku FASTQ lub ogólny błąd systemu sekwencjonowania (np. błąd sieci, błędy ładowania/rozładowywania odczytników itp.)	Problem związany z oprogramowaniem lub aparatem	Patrz <i>Instrukcja obsługi oprogramowania lokalnego menedżera przebiegu</i> (nr dokumentu: 100000002702), aby uzyskać pomoc w generowaniu plików FASTQ, lub <i>Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx</i> (nr dokumentu: 1000000009513), <i>Instrukcja obsługi aparatu MiSeqDx z oprogramowaniem MOS w ver. 4</i> (nr dokumentu: 1000000157953) lub <i>NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation (Dokumentacja dotycząca aparatu NovaSeq 6000Dx)</i> (nr dokumentu: 200010105). Aby uzyskać dodatkową pomoc, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina.
Biblioteka DNA nie generuje wystarczającego uzysku do ładowania sekwencjonowania	Wymagania dotyczące poziomu wejściowego próbki nie zostały spełnione	Zapewnić odpowiedni poziom wejściowy próbki i powtórzyć przygotowanie biblioteki. Patrz Zalecenia dotyczące próbek wejściowych na stronie 19 .
	Błąd w procedurze testu związany ze sposobem użycia lub wyposażeniem	Powtórzyć przygotowanie biblioteki poczynawszy od jednej z poniższych czynności, w zależności od tego, w którym miejscu wystąpił błąd związany ze sposobem użycia lub wyposażeniem. Jeśli wystąpił nieznan błąd lub inne błędy, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina, aby rozwiązać problem związany z przebiegiem. <ul style="list-style-type: none"> • Ponowne sekwencjonowanie bibliotek. Patrz Przygotowanie sekwencjonowania w systemie NextSeq 550Dx na stronie 52, Przygotowanie sekwencjonowania MiSeqDx na stronie 54 lub Przygotowanie sekwencjonowania w systemie NovaSeq 6000Dx na stronie 55. • Ponowne wzbogacanie bibliotek. Patrz Sondy do hybrydyzacji na stronie 38. • Rozpocząć przygotowanie biblioteki od początku procedury. Patrz Instrukcja użytkownika na stronie 22.
	Wymagania dotyczące panelu sond wzbogacających nie zostały spełnione	Zapewnić odpowiedni panel sond wzbogacających i powtórzyć przygotowanie biblioteki. Patrz Wymagania dotyczące panelu sond wzbogacających na stronie 11 .

Charakterystyka działania oznaczenia

Informacje o charakterystyce działania aplikacji DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application w przypadku stosowania z aparatem NovaSeq 6000Dx – patrz *Ulotka dołączona do opakowania aparatu NovaSeq 6000Dx (nr dokumentu: 200025276)*.

Działanie z panelami całego egzomu

Działanie panelu egzomu przetestowano przy użyciu najniższego (50 ng) i najwyższego (1000 ng) zalecanego wejściowego Coriell Cell Line gDNA NA12878, ze sprawdzonym zestawem do wykrywania wariantów linii zarodkowej (genom Coriell platinum). Jako reprezentatywnych paneli użyto panelu egzomu 1 (45 Mb) i panelu egzomu 2 (36,8 Mb). Przetestowano 24 powtórzeń technicznych za pomocą testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx przy użyciu panelu egzomu 1 (45 Mb) w dwóch 12-krotnych reakcjach wzbogacania. Przetestowano 12 powtórzeń technicznych za pomocą testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx przy użyciu panelu egzomu 2 (36,8 Mb) w jednej 12-krotnej reakcji wzbogacania. Wzbogacone biblioteki poddano sekwencjonowaniu w systemie sekwencjonowania NextSeq 550Dx z modułem DNA GenerateFASTQ Dx lokalnego menedżera przebiegu.

W poniższej tabeli przedstawiono średnie wartości metryk wydajności sekwencjonowania wtórnego i wykrywania wariantów dla powtórzeń technicznych testowanych z każdym panelem.

Tabela 6 Działanie testu z dwoma panelami całego egzomu

Panel	Wzbogacenie dopełnianych unikalnych odczytów	Jednorodność pokrycia	Mediana długości fragmentów	Wykrywanie SNV ¹	Precyzja SNV ²	Wykrywanie polimorfizmów typu indel ¹	Precyzja polimorfizmów typu indel ²
Panel egzomu 1 (45 Mb)	80%	96%	186 bp	96%	99%	90%	89%
Panel egzomu 2 (36,8 Mb)	93%	98%	188 bp	96%	99%	92%	93%

¹ Wykrycie = dodatnie/(prawdziwie dodatnie + fałszywie ujemne)

² Precyzja = prawdziwie dodatnie/(prawdziwie dodatnie + fałszywie dodatnie)

Granica wykrywalności

Do zbadania granicy wykrywalności użyto wzorca referencyjnego DNA Horizon HD799. HD799 składa się z umiarkowanie uszkodzonego DNA poddanego działaniu formaliny ze znanymi wartościami SNV o częstości alleli w zakresie 1–24,5%. Wykorzystano najniższą zalecaną wartość wejściowego DNA (50 ng) i oceniono częstotliwość wykrywania wariantów SNV na poziomie $\geq 5,0\%$ częstości allelu wariantu (VAF). Przetestowano 16 powtórzeń technicznych za pomocą testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z użyciem procedury FFPE, wzbogaconego nowotworowym panelem wzbogacającym (1,94 Mb) w 16 wzbogaceniach (1-krotnych), a następnie poddano sekwencjonowaniu w aparacie NextSeq 550Dx z modułem DNA GenerateFASTQ Dx.

Wszystkie próbki spełniły swoje dla panelu warunki wymagane do poprawnego działania testu, jak pokazano w poniższej tabeli.

Tabela 7 Wymagania dotyczące próbki w kontekście granicy wykrywalności

Panel	Częstotliwość wykrywania wariantów SNV na poziomie $\geq 5,0\%$ VAF	Średnia Jednorodność pokrycia
Nowotworowy panel wzbogacający (1,94 Mb, 523 geny)	100%	99%

Substancje zakłócające

Wpływ substancji potencjalnie zakłócających oceniono za pomocą zestawu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na podstawie wyników oznaczeń uzyskanych w obecności substancji zakłócających.

Zakłócenia z krwią pełną

Acetaminofen (związek egzogeny, lek), kreatynina i trójglicerydy (endogenne metabolity) były testowane przez dodanie ich do próbek krwi ludzkiej przed ekstrakcją DNA. Aby ocenić zakłócenia wynikające z pobierania krwi (krótkie pobieranie), do próbek krwi pełnej dodano również EDTA. Dodatkowo, aby ocenić zakłócenia wynikające z przygotowania próbki, do DNA wyekstrahowanego z krwi pełnej dodano etanol o czystości molekularnej.

W poniższej tabeli przedstawiono stężenia testowe według czynnika zakłócającego.

Tabela 8 Potencjalnie zakłócające substancje i stężenia badane we krwi pełnej

Substancja testowana	Testowane stężenie
Acetaminofen	15,6 mg/dl* Trzykrotność najwyższego stężenia oczekiwanego po podaniu dawki terapeutycznej leku.

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Substancja testowana	Testowane stężenie
Kreatynina	15 mg/dl* Najwyższe obserwowane stężenie w populacji.
Trójglicerydy	1,5 g/dl* Najwyższe obserwowane stężenie w populacji.
EDTA	6 mg/ml Trzykrotność stężenia oczekiwanego we krwi pobranej do próbek z EDTA.
Etanol o czystości molekularnej	15% v/v W eluacie po ekstrakcji DNA.

* Zgodnie z CLSI EP37-ED1:2018

Na substancję zakłócającą przetestowano 12 powtórzeń technicznych za pomocą testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, wzbogaconego panelem egzomu 1 (45 Mb) w pojedynczym (12-krotnym) wzbogaceniu, a następnie poddano sekwencjonowaniu w aparacie NextSeq 550Dx z modułem DNA GenerateFASTQ Dx.

W przypadku badanych substancji wszystkie 12 próbek spełniały warunki wymagane do kontroli poprawnego działania testu i nie zaobserwowano żadnych zakłóceń w działaniu testu.

Zakłócenia z tkanką FFPE

Dwie próbki FFPE jelita grubego badano w obecności i przy braku hemoglobiny w ilości 0,1 mg na skrawek FFPE o grubości 10 µm, aby zasymulować najgorszy scenariusz zanieczyszczenia 50% próbki tkanki FFPE krwią o wysokim stężeniu hemoglobiny. Probki badano za pomocą testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx przy zastosowaniu techniki nowotworowego panelu wzbogacającego 1 (1,94 Mb) jako panelu reprezentatywnego we wzbogaceniach pojedynczych. Wzbogacone biblioteki poddano następnie sekwencjonowaniu w aparacie NextSeq 550Dx z modułem DNA GenerateFASTQ Dx. Wszystkie próbki spełniały warunki wymagane do kontroli poprawnego działania testu i wykazano, że hemoglobina nie zakłóca wyników testu.

Aby ocenić zakłócenia wynikające ze sposobu przygotowania próbki, do DNA wyekstrahowanego z próbki FFPE tkanki raka pęcherza moczowego dodano dwa związki egzogenne. Testowane substancje egzogenne są roztworami do ekstrakcji powszechnie używanymi podczas procesu ekstrakcji DNA i są wymienione wraz z testowanymi ilościami w poniższej tabeli.

Roztwory testowanych substancji są dostępne w handlu w zestawach do izolacji DNA metodą kolumnkową.

Tabela 9 Potencjalnie zakłócające substancje egzogenne i stężenia badane w próbkach FFPE

Substancja testowana	Testowane stężenie (µl/30 µl eluatu)
Roztwór do deparafinizacji	113×10^{-6}
Bufor płuczający AW2	0,417

Na substancję zakłócającą przetestowano osiem powtórzeń technicznych za pomocą testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, wzbogaconego nowotworowym panelem wzbogacającym (1,94 Mb) we wzbogaceniach pojedynczych, a następnie poddano sekwencjonowaniu w aparacie NextSeq 550Dx z modułem DNA GenerateFASTQ Dx.

W przypadku obu badanych substancji wszystkie osiem próbek spełniało warunki wymagane do kontroli poprawnego działania testu i nie zaobserwowano żadnych zakłóceń w działaniu testu.

Skażenie krzyżowe

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (żeńskie, 10 próbek), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (męskie, 12 próbek) i kontrole ujemne (NTC, 2 próbki) przetestowano za pomocą testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx w naprzemiennym układzie płytki. We wszystkich próbkach zastosowano najwyższe (1000 ng) zalecenie dotyczące wejściowego gDNA jako najbardziej rygorystyczny warunek oceny zanieczyszczenia krzyżowego próbki. Testy zostały przeprowadzone dwukrotnie przez dwóch niezależnych operatorów. Panel egzomu 1 (45 Mb) zastosowano w reakcjach wzbogacania 12-krotnego. Wzbogacone biblioteki poddano sekwencjonowaniu w aparacie NextSeq 550Dx z modułem DNA GenerateFASTQ Dx. Ocenę przeprowadzono, analizując pokrycie chromosomu Y swoistego dla mężczyzn w próbkach pochodzących od kobiet przez porównanie z poziomami tła pełnej płytki próbek pobranych od kobiet, jak również z odwzorowaniem indeksu próbek NTC.

Tabela 10 Wyniki dotyczące zanieczyszczenia krzyżowego

Próbki pochodzące od kobiet z pokryciem męskiego chromosomu Y < 3-krotności szumu bazowego	Odwzorowanie indeksów w próbkach NTC
100%	< 0,0005%

Załącznik: Sekwencje adapterów do indeksowania Illumina UD

Te unikalne podwójne (UD) adaptory indeksowane są umieszczone na płytce w celu wymuszenia zalecanej strategii parowania. Adaptory indeksowane mają długość 10 nukleotydów, zamiast typowych ośmiu nukleotydów.

Adaptory do indeksowania 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Adaptory do indeksowania 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Poniższa sekwencja jest używana do przycinania adaptera odczytu 1 i odczytu 2.

CTGTCTCTTATACACATCT

Adaptery indeksowane płytki A/zestawu 1

Nazwa indeksu	i7, zasady w adapterze	i5, zasady w adapterze
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTTCGTGGT	TCGTATGCGG

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina
DNA Prep with Enrichment Dx

Nazwa indeksu	i7, zasady w adapterze	i5, zasady w adapterze
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina
DNA Prep with Enrichment Dx

Nazwa indeksu	i7, zasady w adapterze	i5, zasady w adapterze
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
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	GGATAACCAGA	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

Nazwa indeksu	i7, zasady w adapterze	i5, zasady w adapterze
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGAAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Adaptory indeksowane płytki B/zestawu 2

Nazwa indeksu	i7, zasady w adapterze	i5, zasady w adapterze
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina
DNA Prep with Enrichment Dx

Nazwa indeksu	i7, zasady w adapterze	i5, zasady w adapterze
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCTT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	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

Ulotka dołączona do opakowania testu Illumina
DNA Prep with Enrichment Dx

illumina®

Nazwa indeksu	i7, zasady w adapterze	i5, zasady w adapterze
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCC
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCCTATTG
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	TTGCTTGAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA

Nazwa indeksu	i7, zasady w adapterze	i5, zasady w adapterze
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Historia wersji

Dokument	Data	Opis zmiany
Nr dokumentu: 200019584 wer. 02	Wrzesień 2022 r.	Dodano informacje dotyczące obsługi sekwencjonowania w aparacie NovaSeq 6000Dx.
Nr dokumentu: 200019584, wer. 01	Maj 2022 r.	Dodano nazwy i numery katalogowe systemów sekwencjonowania. Usunięto informacje o unikalnym podwójnym indeksowaniu w odniesieniu do bibliotek z pojedynczym indeksowaniem.
Nr dokumentu: 200019584, wer. 00	Maj 2022 r.	Pierwsze wydanie.

Patenty i znaki towarowe

Niniejszy dokument oraz jego treść stanowią własność firmy Illumina, Inc. oraz jej podmiotów zależnych („Illumina”) i są przeznaczone wyłącznie do użytku zgodnego z umową przez klienta firmy w związku z użytkowaniem produktów opisanych w niniejszym dokumencie, z wyłączeniem innych celów. Niniejszy dokument oraz jego treść nie będą wykorzystywane ani rozpowszechniane do innych celów i/lub publikowane w inny sposób, ujawniane ani kopiowane bez pisemnej zgody firmy Illumina. Firma Illumina na podstawie niniejszego dokumentu nie przenosi żadnych licencji podlegających przepisom w zakresie patentów, znaków towarowych czy praw autorskich ani prawu powszechnemu lub prawom pokrewnym osób trzecich.

W celu zapewnienia właściwego i bezpiecznego użytkowania produktów opisanych w niniejszym dokumencie podane instrukcje powinny być ściśle przestrzegane przez wykwalifikowany i właściwie przeszkolony personel. Przed rozpoczęciem użytkowania tych produktów należy zapoznać się z całą treścią niniejszego dokumentu.

NIEZAPOZNANIE SIĘ LUB NIEDOKŁADNE PRZESTRZEGANIE WSZYSTKICH INSTRUKCJI PODANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE MOŻE SPOWODOWAĆ USZKODZENIE PRODUKTÓW LUB OBRAŻENIA CIAŁA UŻYTKOWNIKÓW LUB INNYCH OSÓB ORAZ USZKODZENIE INNEGO MIENIA, A TAKŻE SPOWODUJE UNIEWAŻNIENIE WSZELKICH GWARANCJI DOTYCZĄCYCH PRODUKTÓW.

FIRMA ILLUMINA NIE PONOSI ODPOWIEDZIALNOŚCI ZA NIEWŁAŚCIWE UŻYTKOWANIE PRODUKTÓW (W TYM ICH CZĘŚCI I OPROGRAMOWANIA) OPISANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE.

© 2022 Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Wszystkie znaki towarowe są własnością firmy Illumina, Inc. lub ich odpowiednich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych można znaleźć na stronie www.illumina.com/company/legal.html.

Informacje kontaktowe



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122, USA

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (poza Ameryką Północną)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Holandia

Sponsor australijski

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Australia

Etykiety produktu

Objaśnienia symboli zamieszczonych na opakowaniu i samym produkcie znajdują się w kluczu symboli dostępnym na stronie support.illumina.com, na karcie *Documentation* (Dokumentacja) dla danego zestawu.