

A SE UTILIZA LA DIAGNOSTICAREA IN VITRO. NUMAI PENTRU EXPORT.

## Utilizarea preconizată

Setul Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx este un set de reactivi și de consumabile utilizate pentru a pregăti biblioteci de probe din ADN genomic derivat din țesut și celule umane pentru a dezvolta teste de diagnosticare *in vitro*. Panourile de probe furnizate de utilizator sunt necesare pentru pregătirea bibliotecilor care vizează regiuni genomice de interes specifice. Bibliotecile de probe generate sunt destinate utilizării pe sistemele de secvențiere Illumina. Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx include un software pentru configurarea rulării de secvențiere, monitorizare și analiză.

## Principiile procedurii

Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este destinat preparării manuale a bibliotecilor de secvențiere a ADN-ului îmbogățite pentru regiuni vizate din ADN genomic derivat din celule și țesuturi umane.

Panourile de oligonucleotide biotinite furnizate de utilizator sunt necesare pentru îmbogățirea țintei. Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu o gamă largă de dimensiuni de panouri, inclusiv panouri mici (< 20.000 de sonde) până la panouri mari (> 200.000 de sonde). Bibliotecile îmbogățite generate sunt destinate secvențierii pe sistemele de secvențiere Illumina.

Procedura Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx constă din următoarele etape:

- **Etichetarea ADN-ului genomic** — Utilizează Enrichment BLT Small (eBLTS) pentru a eticheta introducerea de ADN. În timpul etichetării, ADN<sub>g</sub> este fragmentat și etichetat cu adaptoare într-un singur pas. Pentru saturarea eBLTS în reacția de etichetare este necesară o introducere minimă de ADN de 50 ng. Atunci când este saturat, eBLTS fragmentează un număr setat de molecule de ADN pentru a genera biblioteci normalizate cu distribuția dimensiunii fragmentului consecventă.
- **Curățarea post-etichetare** — Curăță ADN-ul etichetat cu adaptor de pe eBLTS pentru a fi utilizat în amplificare.
- **Amplificarea ADN-ului etichetat** — Amplifică ADN-ul etichetat utilizând un program PCR cu ciclu limitat. Indexurile unice duale (UD) sunt adăugați la capetele fragmentelor ADN, ceea ce permite aplicarea codurilor de bare duală unică pe bibliotecile de ADN și generarea de grupuri de celule în timpul secvențierii.
- **Curățarea bibliotecilor** — Utilizează o procedură de purificare a bilelor pentru a purifica și a selecta dimensiunea bibliotecilor de ADN amplificate.
- **Cumularea bibliotecilor** — Combină bibliotecile de ADN cu indexuri unice într-un singur fond de până la 12 biblioteci. Puteți cumula biblioteci în funcție de volum sau masă.
- **Hibridizarea sondelor** — Constă dintr-o reacție de hibridizare în timpul căreia bibliotecile de ADN dublu catenar sunt denaturate și un panou de sonde de ADN biotinite este hibridizat în regiuni genomice țintă.

- Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu mai multe panouri. Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu include un panou de îmbogățire. Panourile de sonde sunt furnizate de utilizator și trebuie să îndeplinească specificațiile necesare. Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Reactivii sunt compatibili atât cu panourile de oligonucleotide ADN de amplificare Illumina cât și terțe, care îndeplinesc specificațiile necesare. Pentru informații privind specificațiile necesare pentru panourile terțe, consultați [Cerințe pentru panoul sondelor de îmbogățire la pagina 11](#)
- **Capturarea sondelor hibridizate** — Utilizează Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) pentru a captura sondele hibridizate biotinite în regiunile de interes țintă.
- **Amplificarea bibliotecilor îmbogățite** — Utilizează PCR pentru a amplifica bibliotecile îmbogățite.
- **Curățarea bibliotecilor îmbogățite amplificate** — Utilizează o procedură de purificare a bilelor pentru a purifica bibliotecile îmbogățite pregătite pentru secvențiere.
- **Secvențierea** — Secvențierea bibliotecilor îmbogățite este efectuată pe sistemele de secvențiere MiSeqDx, NextSeq 550Dx sau NovaSeq 6000Dx. Pentru MiSeqDx și NextSeq 550Dx, modulul DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager integrat este utilizat pentru configurarea rulării de secvențiere, monitorizarea rulării și generarea FASTQ de la definițiile bazei. Pentru NextSeq 550Dx cu server DRAGEN și NovaSeq 6000Dx, aplicația DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este utilizată pentru configurarea rulării și analiza secundară cu mai multe fluxuri de lucru disponibile.

## Limitări ale procedurii

- A se utiliza la diagnosticarea *in vitro*.
- Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu ADN-ul genomic derivat din celule și țesuturi umane.
- Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu introduceri de ADN dublu catenar de 50–1000 ng. Performanța nu este garantată cu cantități introduse în afara acestor praguri.
- Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu include reactivi pentru extracția ADN-ului. Rezultatele testării analitice, inclusiv testarea interferențelor, furnizate în [Caracteristici de performanță la pagina 59](#) au fost obținute cu sânge integral și FFPE ca tipuri de probe reprezentative cu seturi de extracție ADN reprezentative. Toate testele de diagnosticare dezvoltate pentru utilizarea cu reactivii Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx necesită validarea completă a tuturor aspectelor de performanță cu setul de extracție ADN ales.
- Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu este recomandat pentru probe FFPE de calitate slabă cu  $\Delta Cq > 5$ . Utilizarea probelor cu  $\Delta Cq > 5$  poate crește șansele de eroare la pregătirea bibliotecii și poate scădea performanța testului.
- Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Reactivii au fost configurați și testați pentru introducerea probei, reacțiile de îmbogățire și plexitatea indicate în tabelul următor.

Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx	Introducerea specimenului	Reacții de îmbogățire	Plexitate de îmbogățire
Set cu 16 probe	Calitate scăzută (FFPE)	16 reacții	1-plex
Set cu 96 probe	Calitate înaltă (de ex., sânge integral)	8 reacții	12 plexuri

- Procesarea intrării de FFPE a fost testată și este recomandată exclusiv pentru reacții de îmbogățire de 1-plex, cu utilizarea setului cu 16 probe.
- Pentru setul cu 96 de probe, sunt posibile plexități non-standard (de la 2 plexuri la 11 plexuri), însă au următoarele limitări:
  - Procesarea probelor în reacții de îmbogățire de la 2 plexuri la 11 plexuri reduce randamentul setului.
  - Nu sunt garantate rezultate optime. Obținerea unui randament adecvat de îmbogățire pentru plexități non-standard poate necesita o optimizare suplimentară.
  - Pentru strategiile de grupare cu plexitate scăzută (de la 2 plexuri la 8 plexuri), este necesară selectarea adaptoarelor de index cu secvențe diverse pentru a optimiza balansul de culoare pentru secvențierea și analiza datelor reușită. Modulul DNA Generate FASTQ Dx de pe MiSeqDx și NextSeq 550Dx oferă opțiuni pentru combinații de indexuri echilibrate în ceea ce privește culoarea în timpul configurării rulării. Pentru mai multe informații privind strategiile de grupare, consultați [Metode de grupare la pagina 35](#).
- Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se limitează la furnizarea de biblioteci îmbogățite care sunt secvențiate numai pe MiSeqDx, NextSeq 550Dx și NovaSeq 6000Dx. Utilizarea altor sisteme de secvențiere necesită validarea completă a tuturor aspectelor de performanță.
- Panourile de îmbogățire nu sunt incluse în cadrul acestui produs. Rezultatele testării analitice furnizate în [Caracteristici de performanță la pagina 59](#) au fost obținute cu panouri de îmbogățire reprezentative și sunt furnizate doar în scop informativ. Caracteristicile de performanță analitică servesc la exemplificarea capacităților generale ale analizei și nu stabilesc capacitățile sau adecvarea cu privire la orice afirmații specifice analizei. Toate testele de diagnosticare dezvoltate pentru utilizarea cu acești reactivi necesită validarea completă a tuturor aspectelor de performanță.
- Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil atât cu panourile de îmbogățire Illumina, cât și terțe. Cu toate acestea, performanța cu panourile de îmbogățire terțe care nu îndeplinesc cerințele privind panourile nu este garantată. Pentru informații referitoare la cerințele pentru panouri, consultați [Cerințe pentru panoul sondelor de îmbogățire la pagina 11](#).
- Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx utilizează o durată de hibridizare de 2 ore. Utilizarea unei durate de hibridizare mai lungi poate afecta parametrii de performanță.
- Modulele DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager pentru MiSeqDx și NextSeq 550Dx furnizează doar fișiere FASTQ. Dacă utilizați aceste module, trebuie să efectuați validarea analizei secundare.

- Aplicația DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este disponibilă pe NextSeq 550Dx cu serverul DRAGEN și NovaSeq 6000Dx. Aplicația acceptă multiple fluxuri de lucru de analiză secundară, inclusiv generarea FASTQ, generarea FASTQ și VCF pentru detectarea variantelor de linie germinală și generarea FASTQ și VCF pentru detectarea variantelor somatice. Dacă utilizați aplicația pentru generarea VCF, nu trebuie să efectuați validarea analizei secundare. Limitările cererii includ următoarele:
  - Inserțiile cu lungimea > 18 bp și delețiile cu lungimea > 21 bp nu au fost validate.
  - Variantele mari, incluzând variantele de multinucleotide (MNV-uri) și indelii mari, pot fi raportate sub formă de variante separate mai mici în fișierul cu rezultate VCF.
  - MNV-urile mici sunt raportate ca variante separate în fișierul cu rezultate VCF.
  - Delețiile sunt raportate în fișierul VCF la coordonata bazei precedente conform formatului VCF. Prin urmare, luați în considerare variantele adiacente înainte de a raporta că o definiție de bază individuală este o referință homozigotă.
  - Limitări specifice pentru linia germinală:
    - Fluxul de lucru pentru analiză de generare Germline FASTQ și VCF din Aplicația DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este conceput pentru a furniza rezultate calitative pentru definirea variantelor de linie germinală (de ex., homozigotă, heterozigotă, de tip sălbatic).
    - Variația numărului de copii poate afecta identificarea unei variante drept homozigotă sau heterozigotă.
    - Sistemul nu va raporta mai mult de două variante într-un singur locus, chiar și în prezența variației numărului de copii.
  - Limitări specifice pentru Somatic:
    - Fluxul de lucru pentru analiză de generare Somatic FASTQ și VCF din Aplicația DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este conceput pentru a furniza rezultate calitative pentru definirea variantelor somatice (și anume, prezența unei variante somatice).
    - Fluxul de lucru pentru analiză de generare Somatic FASTQ și VCF nu poate face diferența între variantele de linie germinală și somatice. Fluxul de lucru este conceput să detecteze variante pentru o gamă de frecvențe de variante, dar frecvența variantei nu poate fi utilizată pentru a diferenția variantele somatice de variantele de linie germinală.
    - Țesutul normal din cadrul specimenului influențează detectarea variantelor. Limita raportată a detecției se bazează pe o frecvență a variantei relativ la ADN total extras atât din țesutul tumoral, cât și din cel normal.
    - Dacă se definește mai mult de o alelă a variantei în același locus, niciuna dintre alele nu va fi raportată ca variante care trec. În schimb, setul complet de alele va fi raportat, însă filtrat prin intermediul etichetei multialelice.

## Componentele produsului

Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este alcătuit din următoarele componente:

- DNA Prep with Enrichment Dx Illumina cu indexuri UD Setul A, nr. catalog 20051354 (16 probe) sau nr. 20051352 (96 probe)
- DNA Prep with Enrichment Dx Illumina cu indexuri UD Setul B, nr. catalog 20051355 (16 probe) sau nr. 20051353 (96 probe)
- Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Modul pentru NextSeq 550Dx, nr. catalog 20063024
- Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Modul pentru MiSeqDx, nr. catalog 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Aplicație pentru NovaSeq 6000Dx, nr. catalog 20074609
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Aplicație pentru NextSeq 550Dx, nr. catalog 20074730

## Reactivi furnizați

Completarea Illumina DNA Prep with Enrichment Dx necesită DNA Prep with Enrichment Dx Illumina cu indexuri UD Setul A sau DNA Prep with Enrichment Dx Illumina cu indexuri UD Setul B. Puteți realiza următorul număr de reacții de pregătire a bibliotecii și de îmbogățire utilizând un set de 16 probe sau 96 probe.

<b>Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx</b>	<b>Introducerea specimenului</b>	<b>Reacții de îmbogățire</b>	<b>Plexitate de îmbogățire</b>
Set cu 16 probe	Calitate scăzută (FFPE)	16 reacții	1-plex
Set cu 96 probe	Calitate înaltă (de ex., sânge integral)	8 reacții	12 plexuri

## Illumina DNA Prep with Enrichment Dx cu indexuri UD Setul A/B

### Reactivi de etichetare 1 Prep Dx Illumina, depozitați la o temperatură între 15 °C și 30 °C

Următorii reactivi se livrează la temperatura camerei. Depozitați în mod prompt reactivii la temperatura de depozitare indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare.

Nume reactiv	Cantitatea de eprubete		Culoare capac	Volum de umplere	Ingrediente active
	16 probe (nr. 20050020)	96 probe (nr. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Roșu	350 μl	Soluție de detergent în apă.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Verde	41 ml	Soluție apoasă tamponată cu detergent și sare.
Cleanup Beads (CB)	1	Nu se aplică*	Roșu	10 ml	Bile paramagnetice în fază solidă în soluție apoasă tamponată.

\* Cleanup Beads pentru 96 de probe sunt incluse în Cleanup Beads Prep Dx Illumina pentru 96 de probe (nr. 20050030).

### Cleanup Beads Prep Dx Illumina (96 de probe), a se depozita la temperaturi între 15 °C și 30 °C

Pentru seturile cu 96 de probe, Cleanup Beads sunt incluse în Cleanup Beads Prep Dx Illumina (nr. 20050030). Următorul reactiv se livrează la temperatura camerei. Depozitați în mod prompt reactivii la temperatura de depozitare indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare. Pentru seturile cu 16 probe, Cleanup Beads sunt incluse în Reactivii de etichetare 1 Prep Dx Illumina (nr. catalog 20050020).

Nume reactiv	Cantitate	Culoare capac	Volum de umplere	Ingrediente active
Cleanup Beads (CB)	4	Roșu	10 ml	Bile paramagnetice în fază solidă în soluție apoasă tamponată.

## Reactivi de etichetare 2 DNA Prep Dx Illumina, depozitați la o temperatură între 2 °C și 8 °C

Următorii reactivi se livrează refrigerați. Depozitați în mod prompt reactivii la temperatura de depozitare indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare. Depozitați eprubeta de depozitare eBLTS în poziție verticală, astfel încât bilele să fie întotdeauna scufundate în soluția tampon.

Nume reactiv	Cantitatea de eprubete		Culoare capac	Volum de umplere		Ingrediente active
	16 probe (nr. 20050021)	96 probe (nr. 20050026)		16 probe	96 probe	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Galben	200 µl	290 µl	Bile magnetice de streptavidină legate cu transpozomi în soluție apoasă tamponată conținând glicerol, EDTA, ditiotritol, sare și detergent.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Transparent	1,8 ml	1,8 ml	Soluție apoasă tamponată.

## Reactivi de etichetare 3 DNA Prep Dx Illumina, depozitați la o temperatură între -25 °C și -15 °C

Următorii reactivi se livrează congelați. Depozitați în mod prompt reactivii la temperatura de depozitare indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare.

Nume reactiv	Cantitatea de eprubete		Culoare capac	Volum de umplere		Ingrediente active
	16 probe (nr. 20050022)	96 probe (nr. 20050027)		16 probe	96 probe	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Transparent	290 µl	290 µl	Soluție apoasă tamponată care conține sare de magneziu și dimetilformamidă.

Nume reactiv	Cantitatea de eprubete		Culoare capac	Volum de umplere		Ingrediente active
	16 probe (nr. 20050022)	96 probe (nr. 20050027)		16 probe	96 probe	
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Transparent	200 µl	610 µl	Polimerază ADN și dNTP-uri în soluție apoasă tamponată.

## Reactivi ADN Prep Dx Enrichment 1 Illumina (16 probe), depozitați la o temperatură între 2 °C și 8 °C

Pentru 16 seturi de probe, următorii reactivi sunt incluși în Reactivii ADN Prep Dx Enrichment 1 Illumina (nr. catalog 20050023). Pentru 96 de seturi de probe, reactivii sunt incluși în Reactivii Prep Dx Enrichment 1 Illumina (nr. catalog 20050028).

Următorii reactivi se livrează refrigerati. Depozitați în mod prompt reactivii la temperatura de depozitare indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare.

Nume reactiv	Cantitatea de eprubete	Culoare capac	Volum de umplere	Ingrediente active
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Transparent	1,2 ml	Bilele magnetice de streptavidină în soluție apoasă tamponată conținând formamidă, detergent și sare.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Transparent	1,8 ml	Soluție apoasă tamponată.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Transparent	200 µl	Soluție apoasă tamponată cu detergent și sare.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Transparent	200 µl	Soluție apoasă tamponată.



## Reactivi Prep Dx Enrichment 1 Illumina (96 probe), depozitați la o temperatură între 2°C și 8°C

Pentru 96 seturi de probe, următorii reactivi sunt incluși în Reactivii Prep Dx Enrichment 1 Illumina (nr. catalog 20050028). Pentru 16 de seturi de probe, reactivii sunt incluși în Reactivii Prep Dx Enrichment 1 Illumina (nr. catalog 20050023).

Următorii reactivi se livrează refrigerati. Depozitați în mod prompt reactivii la temperatura de depozitare indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare.

Nume reactiv	Cantitatea de eprubete	Culoare capac	Volum de umplere	Ingrediente active
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Transparent	1,2 ml	Bilele magnetice de streptavidină în soluție apoasă tamponată conținând formamidă, detergent și sare.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Transparent	1,8 ml	Soluție apoasă tamponată.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Transparent	200 µl	Soluție apoasă tamponată cu detergent și sare.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Transparent	200 µl	Soluție apoasă tamponată.

## Reactivi ADN Prep Dx Enrichment 2 Illumina, depozitați la o temperatură între -25°C și -15°C

Următorii reactivi se livrează congelați. Depozitați în mod prompt reactivii la temperatura de depozitare indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare.

Nume reactiv	Cantitatea de eprubete		Culoare capac	Volum de umplere	Ingrediente active
	16 probe (nr. 20050024)	96 probe (nr. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Transparent	580 µl	Soluție de detergent în apă.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Galben	4,1 ml	Soluție apoasă tamponată cu săruri și detergent.

Nume reactiv	Cantitatea de eprubete		Culoare capac	Volum de umplere	Ingrediente active
	16 probe (nr. 20050024)	96 probe (nr. 20050029)			
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Transparent	320 µl	Amestec de primeri PCR (oligonucleotide).
2N NaOH (HP3)	1	1	Transparent	200 µl	Soluție de hidroxid de sodiu 2N (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Albastră	480 µl	Soluție apoasă tamponată cu ADN Cot-1, agent de aglomerare și formamidă
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Transparent	200 µl	Polimerază ADN și dNTP-uri în soluție apoasă tamponată.

## Set Dx cu index dublu unic A/B Illumina, a se depozita la temperaturi între -25 °C și -15 °C

Următorii reactivi se livrează congelați. Depozitați în mod prompt reactivii la temperatura de depozitare indicată, pentru a asigura performanța corespunzătoare. Pentru secvențele adaptorului de indexare, consultați [Anexa: Secvențele adaptorului de indexare UD Illumina la pagina 64](#).

Componentă	Cantitate
Set Dx cu index dublu unic A Illumina (96 indexuri), nr. 20050038	1
Set Dx cu index dublu unic B Illumina (96 indexuri), nr. 20050039	1

## Reactivi nefurnizați

### Reactivi obligatorii, nefurnizați

- Reactivi pentru purificarea și extracția ADN-ului
- Reactivi de cuantificare ADN
- Etanol (tărie normală 200 pentru biologie moleculară)
- Apă fără nuclează

- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- Soluție 1N NaOH, adecvată pentru biologie moleculară
- Dacă se utilizează sistemul de secvențiere NextSeq 550Dx:
  - 200 mM Tris, pH 7,0 (poate fi diluat din 1 M Tris-HCL, pH 7,0)
  - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) nr. catalog 20028871)
- Dacă utilizați sistemul de secvențiere MiSeqDx:
  - MiSeqDx Reagent Kit v3 (nr. catalog 20037124)
- Dacă se utilizează sistemul de secvențiere NovaSeq 6000Dx:
  - 400 mM Tris, pH 8,0 (poate fi diluat din 1 M Tris-HCL, pH 8,0)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (nr. catalog 20046931)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (nr. catalog 20046933)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (nr. catalog 20062292)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (nr. catalog 20062293)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube (nr. catalog 20062290)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (nr. catalog 20062291)

## Cerințe pentru panoul sondelor de îmbogățire

Reactivii Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sunt compatibili atât cu panourile de oligonucleotide ADN de amplificare Illumina cât și terțe. Dacă utilizați sonde de ADN biotinate terțe (panouri fixe sau personalizate), asigurați-vă că acestea îndeplinesc specificațiile necesare.

Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a fost optimizat și validat utilizând următoarele specificații pentru panoul terț. Performanța comparabilă nu este garantată atunci când utilizați panouri terțe care nu îndeplinesc specificațiile.

- Lungime sondă 80 bp sau 120 bp
- Între 500 și 675.000 de sonde
- ADN monocatenar sau dublu catenar
- Introducerea totală a sondei de  $\geq 3$  pmoli pentru îmbogățire la plexități de la 1 plex la 12 plexuri

## Depozitare și manipulare

- Temperatura camerei este definită ca fiind intervalul dintre 15°C și 30°C.
- Reactivii sunt stabili când sunt depozitați conform indicațiilor până la data de valabilitate specificată pe etichetele seturilor. Pentru temperaturile de depozitare, consultați [Reactivi furnizați la pagina 5](#).
- Reactivii congelați sunt stabili timp de maxim patru cicluri de congelare-dezghetare care au loc înainte de data de expirare specificată.

- Procedura Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx conține următoarele puncte de oprire în siguranță:
  - După [Amplificați ADN-ul etichetat la pagina 30](#) bibliotecile amplificate sunt stabile timp de până la 30 de zile atunci când sunt depozitate la temperaturi între -25 °C și -15 °C.
  - După [Curățarea bibliotecilor la pagina 32](#), bibliotecile amplificate curățate sunt stabile timp de până la 30 de zile atunci când sunt depozitate la temperaturi între -25 °C și -15 °C.
  - După [Gruparea bibliotecilor pre-îmbogățite la pagina 34](#) bibliotecile cumulate sunt stabile timp de până la 30 de zile dacă sunt depozitate la temperaturi între -25 °C și -15 °C.
  - După [Amplificarea bibliotecii concentrate la pagina 45](#) placa de biblioteci îmbogățite și amplificate poate rămâne pe ciclul termic până la 24 de ore. Alternativ, placa poate fi depozitată la temperaturi între 2 °C și 8 °C timp de până la 48 de ore.
  - Bibliotecile îmbogățite curățate finale sunt stabile până la 7 zile dacă sunt depozitate la temperaturi între -25 °C și -15 °C.
- Dacă orice ambalaj sau conținut al componentelor Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este deteriorat sau compromis, contactați departamentul Asistență clienți Illumina .
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) poate forma precipitate sau cristale vizibile. Dacă se observă precipitate, încălziți la 37 °C timp de 10 minute, apoi amestecați până la dizolvarea precipitatelor.
- Hybridization Oligos (HYB) și Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) trebuie preîncălzite la aceeași temperatură ca și temperatura de menținere pentru hibridizare aplicabilă pentru fiecare tip de probă și panou de sonde. Pentru mai multe informații privind manipularea NHB2 și EEW, consultați [Note procedurale la pagina 17](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) și HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) pot dezvolta cristale și opacitate. Dacă se observă cristale și opacitate, agitați sau pipetați în sus și în jos pentru a amesteca până când soluția este limpede. Asigurați-vă că preîncălziți NHB2 înainte de pipetare.
- Când manipulați Cleanup Beads (CB), utilizați următoarele bune practici:
  - Nu congelați niciodată bilele.
  - Chiar înainte de utilizare, agitați bilele până când sunt repuse în suspensie și culoarea pare omogenă.
- Când manipulați Enrichment BLT Small (eBLTS), utilizați următoarele bune practici:
  - Depozitați eprubeta eBLTS în poziție verticală, astfel încât bilele să fie întotdeauna scufundate în soluția tampon.
  - Agitați eBLTS temeinic până când bilele sunt repuse în suspensie. Pentru a evita reaşezarea bilelor, nu se recomandă centrifugarea înainte de pipetare.
  - Dacă bilele sunt lipite pe partea laterală sau superioară a unei plăci cu 96 de godeuri, centrifugați la 280 × g timp de 3 secunde, apoi pipetați pentru resuspendare.
- La manipularea plăcilor cu adaptor de indexare, utilizați următoarele bune practici:
  - Nu adăugați probe pe placa adaptorului de indexare.
  - Fiecare godeu al plăcii de indexare este de unică folosință.

# Echipamentele și materialele necesare, nefurnizate

În plus față de Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, asigurați-vă că dispuneți de echipamentele și materialele necesare înainte de a începe protocolul.

## Echipament

Asigurați-vă că aveți echipamentele necesare înainte de a începe protocolul.

Protocolul a fost optimizat și validat utilizând articole cu specificațiile enumerate. Performanța comparabilă nu este garantată atunci când se utilizează echipamente care nu respectă specificațiile.

Unele articole sunt necesare doar pentru fluxuri de lucru specifice. Aceste articole sunt specificate în tabele separate.

- Ciclor termic cu următoarele specificații:
  - Capac încălzit
  - Interval minim de control al temperaturii între 10 °C și 98 °C
  - Precizia minimă a temperaturii de  $\pm 0,25$  °C
  - Volum de reacție maxim de 100  $\mu$ l
  - Compatibil cu plăci PCR cu 96 de godeuri cu manta completă
- Incubator de microspecimene cu următoarele specificații:
  - Interval de temperatură ambiantă între +5,0 °C și 99,0 °C
  - Compatibil cu plăci MIDI cu 96 de godeuri
- Inserții incubator de microspecimene compatibile cu plăci MIDI cu 96 godeuri
- Agitator de microplăci de mare viteză cu un interval de viteze de amestecare de 200–3000 rpm
- Suport magnetic compatibil cu plăci PCR cu 96 de godeuri
- Suport magnetic compatibil cu plăci MIDI cu 96 de godeuri
- Fluorometru compatibil cu metoda dvs. de cuantificare
- Analizor fragmente de ADN
- Pipete de precizie:
  - Pipete monocanal sau multicanal de 10  $\mu$ l
  - Pipete monocanal sau multicanal de 20  $\mu$ l
  - Pipete monocanal sau multicanal de 200  $\mu$ l
  - Pipete monocanal de 1000  $\mu$ l

- Pipetele de precizie pentru a asigura transferul precis al reactivilor și probelor. Pipetele monocanal sau multicanal pot fi utilizate dacă sunt calibrate cu regularitate și sunt precise în limita a 5% din volumul indicat.
- Centrifugă cu microplăci
- Microcentrifugă
- Unul dintre următoarele sisteme de Illuminasecvențiere:
  - Instrumentul MiSeqDx, nr. catalog DX-410-1001
  - Instrumentul NextSeq 550Dx, nr. catalog 20005715 cu serverul opțional Illumina DRAGEN pentru NextSeq 550Dx, nr. catalog 20086130
  - Instrumentul NovaSeq 6000Dx, nr. catalog 20068232
- [Opțional] Concentrator de vid
- [FFPE] Sistem de detectare PCR în timp real

## Materiale

Asigurați-vă că aveți materialele necesare înainte de a începe protocolul.

Unele articole sunt necesare doar pentru fluxuri de lucru specifice. Aceste articole sunt specificate în tabele separate.

Protocolul a fost optimizat și validat utilizând articolele enumerate. Performanța comparabilă nu este garantată atunci când se utilizează materiale alternative.

- Vârfuri de pipetă filtrate
- Eprubete conice pentru centrifugă, 15 ml sau 50 ml
- Eprubete pentru microcentrifugă, 1,5 ml
- Rezervoare de reactiv multicanal fără ARNază/DNază, de unică folosință
- Benzi și capace cu 8 eprubete fără RNază/DNază
- Pipete serologice
- Placă de depozitare cu godeuri adânci din polipropilenă cu 96 de godeuri, 0,8 ml (placă MIDI)
- Plăci PCR cu manta completă, cu 96 de godeuri rigide
- Plăci qPCR [FFPE] compatibile cu instrumentul qPCR
- Sigilii adezive pentru plăci cu 96 de godeuri cu următoarele specificații:
  - Poliester transparent optic, ușor de dezlipit
  - Adekvat pentru plăcile PCR cu manta
  - Adeziv puternic, rezistent la multiple variații de temperatură între -40 °C și 110 °C.
  - Fără DNază/RNază
- Consumabile din plastic compatibile cu metoda de cuantificare aleasă

- Set de cuantificare fluorometrică pentru ADNds compatibil cu sistemul de cuantificare ales:
  - Pentru cuantificarea bibliotecilor amplificate pre-îmbogățite eligibile, se poate utiliza un set de cuantificare cu gamă largă.
  - Pentru cuantificarea bibliotecilor îmbogățite, intervalul setului de cuantificare depinde de panoul de sonde utilizate.
- Set de analiză fragmente pentru calificarea la bibliotecă cu sistemul de calificare ales:
  - Pentru bibliotecile amplificate pre-îmbogățite eligibile, se poate utiliza un set cu o gamă largă.
  - Pentru calificarea bibliotecilor îmbogățite, intervalul setului de calificare depinde de panoul de sonde utilizate.
- **[Opțional]** Set pentru extracția ADN-ului din celulele și țesuturile umane. Puteți utiliza orice metodă de extracție validată.

## Colectarea, transportul și depozitarea probei



### ATENȚIE

Manevrați toate probele ca și cum ar fi agenți cu potențial infecțios.

- Această analiză este compatibilă cu ADN-ul genomic derivat din celule și țesuturi umane.
- Pentru ADNg purificat disponibil în comerț, asigurați-vă că probele au fost transportate în condițiile corecte și depozitate conform instrucțiunilor producătorului. Urmați cele mai bune practici pentru depozitare și ciclurile de congelare-dezghețare ale ADNg.
- Pentru introducerea sângelui integral, respectați cerințele privind recoltarea, transportul și depozitarea sângelui aplicabile metodei de extracție a ADN-ului aleasă. Poate fi utilizată orice metodă de extracție validată. Transportarea sângelui integral trebuie să fie în conformitate cu reglementările naționale, federale, statale și locale privind transportul de agenți etiologici.
- Pentru extracția ADN-ului din țesutul FFPE, se poate utiliza orice metodă de extracție validată. Urmați instrucțiunile și recomandările aplicabile metodei de extracție preferate pentru determinarea următoarelor practici:
  - Metoda de fixare în formol și includere la parafină pentru țesuturi, pentru a asigura cea mai bună calitate a ADN-ului extras.
  - Depozitarea specimenelor de FFPE.
  - Cerințele materiei inițiale, cum ar fi numărul și grosimea secțiunilor FFPE. Majoritatea metodelor de purificare recomandă utilizarea secțiunilor proaspăt tăiate.

## Avertizări și precauții

- Reactivii Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx conțin substanțe chimice potențial periculoase. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Purtați echipament de protecție, inclusiv protecție pentru ochi, mănuși și halat de laborator corespunzătoare riscului de expunere. Manipulați reactivii folosiți ca deșeuri chimice și eliminați-i în conformitate cu legile și reglementările regionale, naționale și locale aplicabile. Pentru informații suplimentare privind mediul, sănătatea și siguranța, consultați Fișele cu date de securitate (SDS) la adresa [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- Raportați imediat orice incidente grave în legătură cu acest produs către Illumina și autoritățile competente ale statelor membre în care sunt rezidenți utilizatorul și pacientul.
- Manipulați toate probele de sânge ca și cum se știe că sunt infecțioase cu virusul imunodeficienței umane (HIV), virusul hepatitei B (HBV) și alți agenți patogeni transmisibili prin sânge (precauții universale).
- Utilizați măsurile de precauție obișnuite pentru activitățile de laborator. Nu pipetați cu gura. Nu mâncați, nu beți și nu fumați în spațiile de lucru desemnate. Purtați mănuși de unică folosință și halate de laborator atunci când manipulați probe și reactivi din seturi. După ce manipulați probe și reactivi din seturi, spălați-vă temeinic pe mâini.
- Pentru a împiedica degradarea probei sau a reactivului, asigurați-vă că toți vaporii de hipoclorit de sodiu de la curățare s-au disipat complet înainte de a începe protocolul.
- Contaminarea probelor cu alte produse/ampliconi PCR poate cauza rezultate inexacte și nesigure. Pentru a evita contaminarea, utilizați următoarele bune practici:
  - Utilizați practicile de laborator și igienă de laborator corespunzătoare.
  - Executați pașii fluxului de lucru în zonele desemnate de pre-amplificare sau post-amplificare.
  - Depozitați reactivii utilizați înainte de a curăța bibliotecile într-o zonă de pre-amplificare.
  - Separați reactivii de pre-amplificare de reactivii post-amplificare.
  - Asigurați-vă că zonele de pre-amplificare și post-amplificare dispun de echipamente dedicate, cum ar fi pipete, vârfuri de pipete, agitator și centrifugă.
- Evitați contaminarea încrucișată. Utilizați vârfuri de pipetă noi pentru fiecare specimen și fiecare distribuție de reactivi. Utilizarea vârfurilor filtrate reduce riscul de transfer al ampliconului și de contaminare încrucișată de la o probă la alta.
  - La adăugarea sau transferul probelor sau a amestecurilor principale de reactivi, schimbați vârfurile între fiecare probă.
  - Când adăugați adaptoare de index cu o pipetă multicanal, schimbați vârfurile între fiecare rând sau fiecare coloană. Dacă utilizați o pipetă cu un singur canal, schimbați vârfurile între probe.
  - Scoateți plăcile adaptoare de indexare neutilizate din zona de lucru.
- Utilizați următoarele bune practici pentru pașii de spălare cu etanol:



- Preparați întotdeauna etanol 80% proaspăt. Etanolul poate să absoarbă umiditatea din aer, ceea ce poate afecta rezultatele.
- Asigurați-vă că tot etanolul a fost eliminat de pe fundul godeurilor în timpul pașilor de spălare. Reziduurile de etanol pot afecta rezultatele.
- Respectați durata de uscare specificată pentru pașii pe suportul magnetic pentru a asigura evaporarea completă. Etanolul rezidual poate afecta performanța reacțiilor ulterioare.
- Pregătiți întotdeauna amestecurile principale înainte de utilizare și nu depozitați niciodată soluțiile combinate de lucru.
- Performanța Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu este garantată atunci când procedurile nu sunt respectate, așa cum este descris în prospect.
- Nu utilizați nicio componentă a setului care a depășit perioada de valabilitate indicată pe eticheta setului.
- Nu interschimbați componentele setului între seturi Illumina DNA Prep with Enrichment Dx diferite. Seturile sunt identificate pe eticheta setului.

## Note procedurale

### Recomandări privind introducerea de ADN

Protocolul Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu introduceri de ADN genomic (ADNg) dublu catenar, de înaltă calitate, de 50–1000 ng.

Asigurați-vă că proba inițială de ADNg nu conține > 1 mM EDTA și nu conține contaminanți organici, cum ar fi fenol și etanol. Aceste substanțe pot interfera cu reacția de etichetare și pot duce la eșecul testului.

#### Introducere de ADNg ≥ 50 ng

Pentru introducerile de ADNg cuprinse între 50 și 1000 ng, nu este necesară cuantificarea și normalizarea probei inițiale de ADNg.

#### Introducere de ADNg < 50 ng

Se pot utiliza introduceri de ADN de 10–50 ng, cu următoarele ajustări:

- Dacă se utilizează o introducere de ADNg de 10–49 ng, se recomandă cuantificarea probei inițiale de ADNg pentru a determina numărul de cicluri PCR necesare după etichetare. Utilizați o metodă bazată pe fluorometrie pentru a cuantifica introducerea de ADNg dublu catenar. Evitați metodele care măsoară acidul nucleic total, cum ar fi NanoDrop sau alte metode de absorbantă UV.
- Acest protocol nu normalizează randamentele finale pre-îmbogățite ale bibliotecii de la 10 la 49 ng ADNg și, prin urmare, este necesară cuantificarea și normalizarea bibliotecilor înainte și după îmbogățire.
- Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx a fost caracterizat și verificat pentru introduceri de ADN de 50–1000 ng. Performanța echivalentă a produsului nu poate fi garantată pentru introducerile de ADNg < 50 ng.

## Recomandări privind introducerea de sânge

Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu ADN<sub>g</sub> extras din sânge integral periferic. Poate fi utilizată orice metodă de extracție validată. La extragerea de ADN<sub>g</sub> din sânge integral, nu este necesară cuantificarea inițială a ADN-ului introdus și Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx produce randamente de bibliotecă pre-îmbogățită normalizată.

Următorii factori pot afecta în mod negativ cantitatea de ADN obținută din probele de sânge integral și, prin urmare, normalizarea bibliotecii:

- Vechimea probei de sânge
- Condițiile de depozitare
- Afecțiuni medicale subiacente care afectează numărul de globule albe din sânge

## Recomandări pentru introducerea probelor de țesut FFPE

Utilizați următoarele criterii de calitate a ADN-ului FFPE pentru a determina contribuția corespunzătoare pentru pregătirea cu succes a bibliotecii:

- Pentru probele FFPE cu o valoare  $\Delta Cq \leq 5$ , valoarea recomandată pentru ADN este de 50–1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu este recomandat pentru probe FFPE de calitate slabă cu  $\Delta Cq > 5$ . Utilizarea probelor cu  $\Delta Cq > 5$  este posibilă, însă poate crește șansele de eroare la pregătirea bibliotecii sau poate scădea performanța testului.

### Extragerea FFPE

Utilizați o metodă de izolare a acidului nucleic care produce randamente mari de recuperare, reduce la minim consumul de probe și păstrează integritatea probelor. Puteți utiliza orice metodă validată pentru extragerea ADN-ului din probele FFPE. Pentru ADN<sub>g</sub> extras din țesutul FFPE, este necesară cuantificarea inițială a ADN-ului introdus și Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu produce randamente de bibliotecă pre-îmbogățită normalizată.

### Calificarea ADN-ului FFPE

ADN<sub>g</sub> extras din țesutul FFPE va fi calificat înainte de utilizare. Pentru o performanță optimă, evaluați calitatea probei de ADN utilizând o metodă de extracție validată pentru calificarea ADN-ului extras din probele FFPE. Protocolul Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este compatibil cu probele de ADN FFPE cu o valoare  $\Delta Cq \leq 5$ . Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nu este recomandat pentru probele FFPE de calitate slabă cu  $\Delta Cq > 5$ . Utilizarea probelor cu  $\Delta Cq > 5$  este posibilă, însă poate crește șansele de eroare la pregătirea bibliotecii sau poate scădea performanța testului.

### [Opțional] Probe de referință FFPE

Utilizați materiale de referință caracterizate, cum ar fi Horizon HD799 (ADN) drept control pozitiv atunci când realizați protocolul. Materialele FFPE calificate din xenogrefe derivate din linia celulară pot fi utilizate și ca probe de referință. Utilizați o metodă bazată pe fluorometrie pentru a cuantifica materialele de referință înainte de utilizare.

**NOTĂ** Rularea unei probe de referință cu control pozitiv sau cu control fără șablon consumă reactivi și reduce numărul total de probe necunoscute care pot fi procesate.

## Recomandări pentru introducerea probelor

Recomandările privind introducerea probelor pentru Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sunt sintetizate în tabelul următor.

Tabelul 1 Recomandări pentru introducerea probelor

Tipul de introducere a probei	Cantitatea de introducere a probei	Cuantificarea necesară a ADN-ului introdus	Calitatea necesară a ADN-ului introdus	Randamentul bibliotecii pre-îmbogățite normalizate
ADNg	10–49 ng	Da	Raport 260/280 de 1,8–2,0	Nu
ADNg	50–1000 ng	Nu	Raport 260/280 de 1,8–2,0	Da
ADNg din sânge	50–1000 ng	Nu	Raport 260/280 de 1,8–2,0	Da
ADNg din FFPE	50–1000 ng	Da	Valoare $\Delta Cq \leq 5$	Nu

Ciclurile PCR recomandate pentru programul PCR eBLTS sunt ajustate în funcție de concentrația și calitatea de introducere a probei. Pentru mai multe informații, consultați [Amplificați ADN-ul etichetat la pagina 30](#).

## Sfaturi și tehnici

### Evitați contaminarea încrucișată

- La adăugarea sau transferul probelor, schimbați vârfurile între *fiecare probă*.
- Când adăugați adaptoare de index cu o pipetă multicanal, schimbați vârfurile între *fiecare rând* sau *fiecare coloană*. Dacă utilizați o pipetă cu un singur canal, schimbați vârfurile între probe.

## Sigilarea plăcii

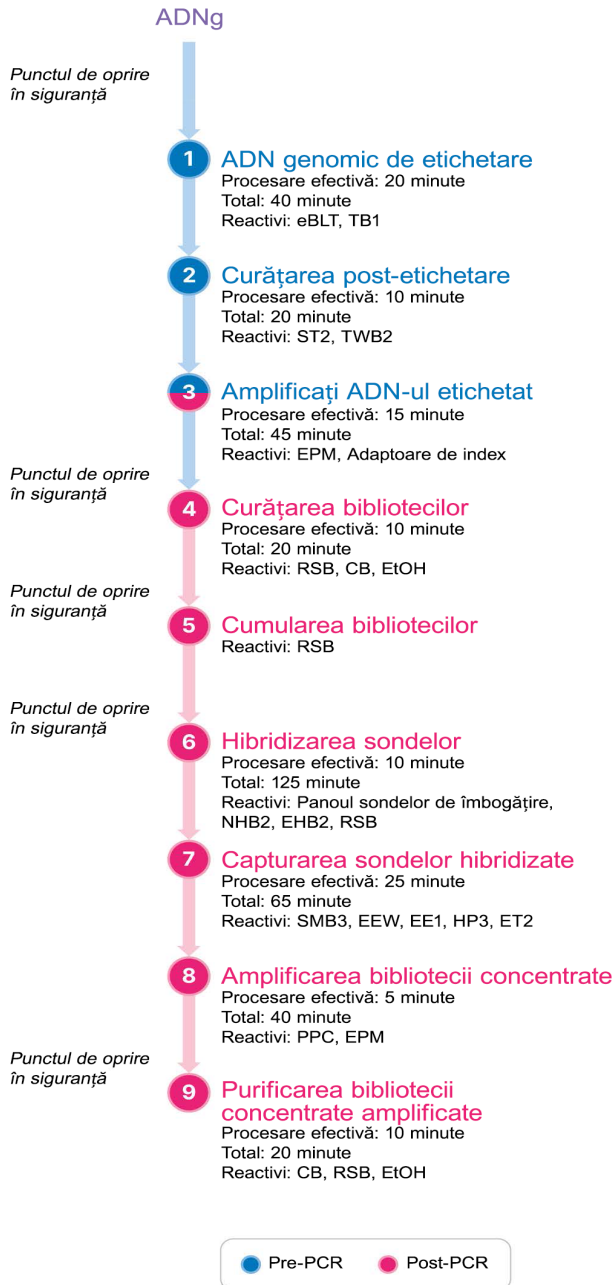
- Sigilați întotdeauna placa cu 96 de godeuri cu o folie adezivă nouă folosind o rolă de cauciuc pentru a acoperi placa înaintea următorilor pași din protocol:
  - Pașii de agitare
  - Pașii de incubare. Nerespectarea indicației de a sigila placa în mod corespunzător poate duce la evaporare în timpul incubării.
  - Pașii de centrifugare
  - Pașii de hibridizare
- Asigurați-vă că marginile și godeurile sunt complet sigilate pentru a reduce riscul de contaminare încrucișată și evaporare.
  - Dacă se observă lichid sau condens pe sigiliu sau pe lateralele godeurilor plăcii, centrifugați după cum este necesar înainte de desigilare.
- Puneți placa pe o suprafață plană înainte de a îndepărta încet sigiliul.

## Manipularea Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Depozitați eprubetele de depozitare eBLTS în poziție verticală în frigider, astfel încât bilele să fie întotdeauna scufundate în soluția tampon.
- Imediat înainte de utilizare, agitați temeinic eprubeta de depozitare eBLTS până când bilele sunt din nou în suspensie. Pentru a evita reșezarea bilelor, nu se recomandă centrifugarea înainte de pipetare.
- Dacă bilele sunt lipite pe partea laterală sau superioară a unei plăci cu 96 de godeuri, centrifugați la 280 × g timp de 3 secunde, apoi pipetați pentru resuspendare.
- La spălarea eBLTS:
  - Utilizați suportul magnetic corespunzător pentru placă.
  - Mențineți placa pe suportul magnetic până la momentul de îndepărtare specificat în instrucțiuni.
  - Dacă ați aspirat bile în vârful de pipetă, eliberați înapoi în placa de pe suportul magnetic și așteptați să se limpezească lichidul (2 minute).

# Fluxul de lucru Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Diagrama următoare ilustrează fluxul de lucru Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Punctele de oprire în siguranță sunt marcate între pași. Estimările de timp se bazează pe procesarea a 12 probe la îmbogățire de 12 plexuri.



# Instrucțiuni de utilizare

Acest capitol descrie protocolul Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

- Consultați fluxul de lucru de secvențiere complet planificat, de la probă la analiză, pentru a asigura compatibilitatea produselor și a parametrilor experimentului.
- Înainte de a continua, confirmați conținutul setului și asigurați-vă că aveți componentele, echipamentele și materialele necesare.
  - Sondele biotinite terțe trebuie să îndeplinească cerințe specifice. Consultați [Cerințe pentru panoul sondelor de îmbogățire la pagina 11](#) pentru a vă asigura că sondele terțe îndeplinesc cerințele.
- Urmați protocolul în ordinea indicată, utilizând volumele și parametrii de incubare specificați.
- Dacă în protocol nu se specifică un punct de oprire în siguranță, continuați imediat cu pasul următor.
- La crearea unui amestec principal, surplusul este inclus în volumele prevăzute.
- Asigurați-vă că utilizați suportul magnetic adecvat pentru tipul dvs. de placă.

## Pregătirea pentru grupare

Acest pas este necesar pentru a asigura secvențierea cu succes a bibliotecilor îmbogățite. Gruparea bibliotecilor poate avea loc înainte de îmbogățire și înainte de secvențiere.

**Înainte de îmbogățire** – Bibliotecile amplificate indexate individuale sunt grupate pentru îmbogățire cu panoul de sonde selectat. Acest lucru creează un fond multiplexat de biblioteci îmbogățite. Pentru introducerea probelor FFPE, procesarea a fost testată și este recomandată exclusiv pentru reacții de îmbogățire de 1 plex. Pentru ADNg de înaltă calitate, s-a testat cu 12 plexuri, dar sunt posibile reacții de la 2 plexuri la 11 plexuri.

**Înainte de secvențiere** – bibliotecile îmbogățite cu 1 plex și/sau bibliotecile îmbogățite cu multiplexare sunt grupate înainte de secvențiere. Numărul de biblioteci îmbogățite care pot fi secvențiate depinde de adâncimea de citire țintă pentru fiecare probă din sistemul dvs. de secvențiere.

## Indexare dublă unică

Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx utilizează indexuri duble unice.

- Bibliotecile cu indexare dublă adaugă secvențe Index 1 (i7) și Index 2 (i5) pentru a genera biblioteci cu etichetare unică.
- Indexurile UD au secvențe de indexuri distincte, neasociate pentru Citirea indexurilor i7 și i5. Indexurile au o lungime de 10 baze.

Selectarea adaptoarelor de index cu secvențe diverse pentru bibliotecile cumulate optimizează balansul de culoare pentru o secvențiere și o analiză a datelor reușită. Fondurile de plexitate care sunt  $\geq 10$  plexuri sunt echilibrate în mod inerent în ceea ce privește culoarea, așadar puteți utiliza orice combinație de adaptoare de

indexare. În timpul rulării de secvențiere, Modulul DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager oferă opțiuni pentru combinațiile de indexuri echilibrate în ceea ce privește culoarea și vă înștiințează dacă nu există suficientă diversitate în combinațiile de indexuri selectate.

Pentru informații privind secvențele adaptorului de indexare UD Illumina și dispunerile plăcilor, consultați [Anexa: Secvențele adaptorului de indexare UD Illumina la pagina 64](#)

## Plexități de îmbogățire acceptate

Reactivii Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sunt configurați și testați la plexitate de îmbogățire cu 1 plex și 12 plexuri. Deși sunt posibile alte plexități de îmbogățire, unele plexități necesită reactivi suplimentari de pregătire a bibliotecii înainte de îmbogățire și pentru panoul de sonde de îmbogățire.

Obținerea unui randament adecvat de îmbogățire pentru plexități de îmbucățire non-standard poate necesita o optimizare suplimentară. Nu sunt garantate rezultate optime.

- **Plexitate de îmbogățire** – Numărul de biblioteci pre-îmbogățite (1–12) grupate într-o singură reacție de îmbogățire pentru hibridizare cu panourile de sonde de îmbogățire. De exemplu, combinarea a 12 biblioteci pre-îmbogățite creează o un fond îmbogățit cu 12 plexuri.
- **Reacție de îmbogățire** – Numărul de preparate unice pentru reacția de îmbogățire, indiferent de numărul de biblioteci pre-îmbogățite grupate per reacție. De exemplu, o singură reacție de îmbogățire poate pregăti un fond de îmbogățire cu 1 plex sau 12 plexuri.

Pentru a calcula numărul total de biblioteci după îmbogățire, înmulțiți plexitatea de îmbogățire per reacție cu numărul de reacții de îmbogățire. De exemplu, o singură reacție de îmbogățire a unui fond de îmbogățire de 12 plexuri produce un fond de 12 biblioteci post-îmbogățite.

La combinarea bibliotecilor pre-îmbogățite, reactivii Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx susțin următoarele reacții de îmbogățire și plexitate.

Reactivi Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx	Reacții de îmbogățire	Plexitate de îmbogățire
Set cu 16 probe	16 reacții	1-plex
Set cu 96 probe	8 reacții	12 plexuri

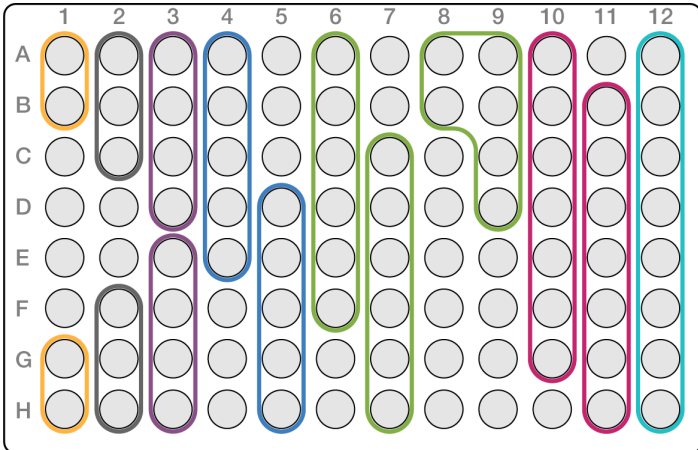
## Strategii de grupare de la două plexuri până la opt plexuri

Următorul tabel prezintă adaptoarele de indexare (godeuri) care pot fi combinate într-un fond de 2–8 plexuri, în timp ce figura codificată pe culori ilustrează fiecare combinație.

Grupați orice plexitate  $\geq 2$  din partea superioară sau inferioară a unei coloane. Nu grupați la nivelul unui rând.

Plexitate	Combi-nații	Culoare în Figura
2	Primele două sau ultimele două godeuri dintr-o coloană: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A și B</li> <li>• G și H</li> </ul> Rândurile C–F nu sunt utilizate.	Portocalie
3	Primele trei sau ultimele trei godeuri dintr-o coloană: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–C</li> <li>• F–H</li> </ul> Rândurile D și E nu sunt utilizate.	Gri
4	Primele patru sau ultimele patru godeuri dintr-o coloană: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–D</li> <li>• E–H</li> </ul>	Violet
5	Primele cinci sau ultimele cinci godeuri dintr-o coloană: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–E</li> <li>• D–H</li> </ul>	Albastră
6	[Opțiunea 1] Primele șase sau ultimele șase godeuri dintr-o coloană: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–F</li> <li>• C–H</li> </ul> [Opțiunea 2] Primele două godeuri (A și B) sau ultimele două godeuri (G și H) dintr-o coloană și oricare patru godeuri dintr-o coloană adiacentă.	Verde
7	Primele șapte sau ultimele șapte godeuri dintr-o coloană: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–G</li> <li>• B–H</li> </ul>	Roz
8	Întreaga coloană.	Turcoaz



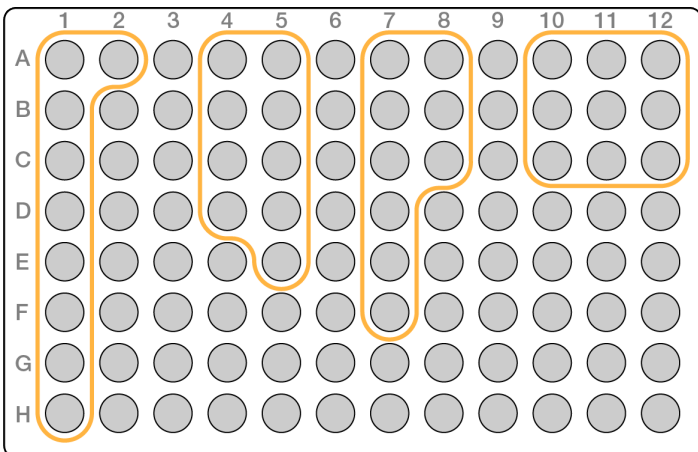


## Strategii de grupare în nouă plexuri

Utilizați adaptoare de indexare din orice godeuri care optimizează balansul de culoare într-o rulare de secvențiere, de exemplu:

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

Figura următoare prezintă toate cele patru exemple.



## ADN genomic de etichetare

Acest pas utilizează Enrichment BLT Small (eBLTS) pentru a eticheta ADN-ul, care este un proces care fragmentează și etichetează ADN-ul cu secvențele adaptorului.

## Consumabile

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (capac galben)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Apă fără nuclează
- Placă PCR cu 96 de godeuri
- Folie adezivă
- Eprubete pentru microcentrifugă, 1,7 ml
- Bandă cu 8 eprubete
- Vârfuri pipete
  - Pipete multicanal de 200 µl



### ATENȚIE

**Acest set de reactivi conține substanțe chimice potențial periculoase. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Purtați echipament de protecție, inclusiv protecție pentru ochi, mănuși și halat de laborator corespunzătoare riscului de expunere. Manipulați reactivii folosiți ca deșeuri chimice și eliminați-i în conformitate cu legile și reglementările regionale, naționale și locale aplicabile.** Pentru informații suplimentare privind mediul, sănătatea și siguranța, consultați Fișele cu date de securitate (SDS) la adresa [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Despre reactivi

- eBLTS trebuie depozitat la temperaturi cuprinse între 2 °C și 8 °C. Nu utilizați eBLTS dacă a fost depozitat la temperaturi sub 2 °C.
- Nu centrifugați eBLTS.

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

Articol	Depozitare	Instrucțiuni
eBLTS (capac galben)	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura camerei. Agitați imediat înainte de utilizare pentru a amesteca. Nu centrifugați înainte de pipetare.
TB1	între -25 °C și -15 °C	Aduceți la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca.

2. Agitați sau pipetați ADN-ul și apoi centrifugați scurt.
3. Salvați următorul program TAG (etichetare) pe ciclul termic:

- Alegeți opțiunea de preîncălzire capac și setați la 100 °C.
- Setați volumul de reacție la 50 µl
- 55°C timp de 5 minute
- Mențineți la 10 °C.

## Procedura

1. Adăugați 2–30 µl de ADN în fiecare godeu al unei plăci PCR cu 96 de godeuri, astfel încât cantitatea totală introdusă să fie de 50–1000 ng .  
Dacă volumul de ADN < 30 µl, adăugați apă fără nuclează la probele de ADN pentru a aduce volumul total la 30 µl.
2. AgitațieBLTStemeinic până când bilele sunt repuse complet în suspensie.
3. Combinați următoarele volume într-o eprubetă pentru a pregăti Amestecul principal de etichetare. Înmulțiți fiecare volum cu numărul de specimene procesate.
  - eBLTS(11,5 µl)
  - TB1(11,5 µl)Surplusul de reactivi este inclus în volum.
4. Pipetați temeinic Amestecul principal de etichetare pentru a amesteca.
5. Împărțiți volumul de Amestec principal de etichetare în mod egal într-o bandă cu 8 eprubete.
6. Folosind o pipetă multicanal de 200 µl, transferați 20 µl de Amestec principal de etichetare în fiecare godeu al plăcii PCR care conține o probă. Utilizați vârfuri noi pentru fiecare coloană sau rând de probă.
7. Eliminați banda cu 8 eprubete după ce a fost distribuit Amestecul principal de etichetare.
8. Folosind o pipetă multicanal de 200 µl setată la 40 µl, pipetați fiecare probă de 10 ori pentru amestecare. Utilizați vârfuri noi pentru fiecare coloană de probe.  
Alternativ, sigilați placa PCR și utilizați un agitator de plăci la 1600 rpm timp de 1 minut.
9. Sigilați placa și așezați-o apoi pe ciclul termic programat anterior și rulați programul TAG (etichetare).
10. Așteptați până când programul TAG (etichetare) atinge temperatura de menținere de 10 °C, apoi scoateți placa imediat.
11. Lăsați placa PCR cu 96 de godeuri la temperatura camerei timp de 2 minute, apoi treceți la pasul următor.

## Curățarea post-etichetare

Acest pas spală ADN-ul etichetat cu adaptorul pe eBLTS înainte de amplificarea PCR.

### Consumabile

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- Suport magnetic placă PCR cu 96 de godeuri

- Folie adezivă
- Bandă cu 8 eprubete
- Vârfuri pipete
  - Pipete multicanal de 20 µl
  - Pipete multicanal de 200 µl
- Pregătiți-vă pentru o procedură ulterioară:
  - EPM (Enhanced PCR Mix)
  - Placă adaptor index

## Despre reactivi

- Asigurați-vă că utilizați suportul magnetic corespunzător pentru placa dvs. Utilizarea unui suport magnetic al plăcii MIDI pentru o placă PCR poate împiedica aderența TWB2 la bile.
- Pipetați TWB2 încet pentru a reduce la minim spumarea, pentru a evita aspirarea volumului incorect și amestecarea incompletă.

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

Articol	Depozitare	Instrucțiuni
EPM	între -25 °C și -15 °C	Decongelați pe gheață timp de 1 oră. Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.
ST2	între 15 °C și 30 °C	Dacă se observă precipitate, încălziți la 37 °C timp de 10 minute, apoi agitați până la dizolvarea precipitatelor. A se utiliza la temperatura camerei.
TWB2	între 15 °C și 30 °C	A se utiliza la temperatura camerei.
Placă adaptor index	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute.

## Procedura

1. Adăugați 10 µl ST2 la fiecare reacție de etichetare. Dacă utilizați o pipetă multicanal, pipetați ST2 într-o bandă cu 8 eprubete și apoi transferați volumele corespunzătoare pe placa PCR. Utilizați vârfuri noi pentru fiecare coloană sau rând de probă.
2. Folosind o pipetă de 200 µl setată la 50 µl, pipetați încet fiecare godeu de 10 ori pentru a repune bilele în suspensie.  
Alternativ, sigilați placa și agitați la 1600 rpm timp de 1 minut. Repetați după cum este necesar.
3. Sigilați placa, iar apoi centrifugați la 280 × g timp de 10 secunde.

4. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute.
5. Așezați pe suportul magnetic al plăcii PCR și așteptați până când lichidul este transparent (3 minute).
6. [ $\leq$  48 probe] Spălați de trei ori după cum urmează.
  - a. Utilizând o pipetă multicanal de 200  $\mu$ l setată la 60  $\mu$ l, îndepărtați și eliminați supernatantul fără a deranja peleta cu bile.
  - b. Scoateți-l de pe suportul magnetic.
  - c. Imediat după aceea, adăugați încet 100  $\mu$ l TWB2 direct pe bile.
  - d. Pipetați lent până când bilele sunt repuse complet în suspensie. Alternativ, sigilați placa și agitați la 1600 rpm timp de 1 minut.
  - e. Dacă vă stropiți, reduceți viteza de rotire la 280  $\times$  g timp de 10 secunde.
  - f. Așezați pe suportul magnetic al plăcii PCR și așteptați până când lichidul este transparent (3 minute). Lăsați placa pe suportul magnetic și TWB2 în godeuri pentru a preveni uscarea excesivă la efectuarea celei de-a treia spălări. Îndepărtați și eliminați supernatantul după ce ați pregătit Amestecul principal PCR.
  - g. Utilizând o pipetă multicanal de 200  $\mu$ l setată la 100  $\mu$ l, îndepărtați și eliminați supernatantul.
  - h. Repetați pașii c–f de două ori pentru un total de trei spălări.
7. [ $>$  48 de probe] Spălați de trei ori după cum urmează.
  - a. Parcurgeți pașii b și c în incremente de 1 coloană până la 2 coloane până când toate coloanele au fost procesate pentru a preveni uscarea excesivă.
  - b. Utilizând o pipetă multicanal de 200  $\mu$ l setată la 60  $\mu$ l, îndepărtați și eliminați supernatantul.
  - c. Scoateți-l de pe suportul magnetic.
  - d. Imediat după aceea, distribuiți încet 100  $\mu$ l TWB2 direct pe bile.
  - e. Pipetați lent până când bilele sunt repuse complet în suspensie. Alternativ, sigilați placa și agitați la 1600 rpm timp de 1 minut.
  - f. Dacă vă stropiți, reduceți viteza de rotire la 280  $\times$  g timp de 10 secunde.
  - g. Așezați pe suportul magnetic al plăcii PCR și așteptați până când lichidul este transparent (3 minute). Lăsați placa pe suportul magnetic și TWB2 în godeuri pentru a preveni uscarea excesivă la efectuarea celei de-a treia spălări. Îndepărtați și eliminați supernatantul după ce ați pregătit Amestecul principal PCR.
  - h. Utilizând o pipetă multicanal de 200  $\mu$ l setată la 100  $\mu$ l, îndepărtați și eliminați supernatantul.
  - i. Scoateți din suportul magnetic și adăugați încet 100  $\mu$ l TWB2 direct pe bile.
  - j. Repetați pașii h și i în incremente de 1 sau 2 coloane până când toate coloanele au fost procesate.
  - k. Repetați pașii e–h de două ori pentru un total de trei spălări.
8. Păstrați pe suportul magnetic până la pasul 4 din secțiunea *Procedură* din *Amplificarea ADN-ului etichetat*. TWB2 rămâne în godeuri pentru a preveni uscarea excesivă a bilelor.

## Amplificați ADN-ul etichetat

Acest pas amplifică ADN-ul etichetat utilizând un program PCR cu cicluri limitate. Pasul PCR adaugă adaptoarele pentru Indexul 1 (i7), adaptoarele pentru Indexul 2 (i5) și secvențele necesare pentru generarea grupului de celule de secvențiere.

### Consumabile

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Placă adaptor index
- Placă PCR cu 96 de godeuri
- Apă fără nuclează
- Folie adezivă
- Eprubete pentru microcentrifugă, 1,5 ml
- Vârfuri pipete
  - Pipete multicanal de 20 µl
  - Pipete multicanal de 200 µl

### Despre reactivi

- Plăci cu adaptor de indexare
  - Un godeu poate conține > 10 µl de adaptoare de indexare.
  - Nu adăugați probe pe placa adaptorului de indexare.
  - Fiecare godeu al plăcii de indexare este de unică folosință.

### Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

Articol	Depozitare	Instrucțiuni
EPM	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la 4 °C sau pe gheață timp de 1 oră. Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.
Placă adaptor index	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura camerei timp de 30 de minute.

2. Salvați următorul program PCR eBLTS pe un ciclor termic folosind numărul corespunzător de cicluri PCR indicat în tabelul de mai jos.
- Alegeți opțiunea de preîncălzire capac și setați la 100 °C.
  - Setați volumul de reacție la 50 µl
  - 72 °C timp de 3 minute
  - 98 °C timp de 3 minute
  - Xcicluri la:
    - 98 °C timp de 20 secunde
    - 60 °C timp de 30 secunde
    - 72 °C timp de 1 minut
  - 72 °C timp de 3 minute
  - Mențineți la 10 °C.

Durata totală de rulare este ~38 de minute pentru 9 cicluri și ~46 de minute pentru 12 cicluri.

Tipul de introducere a probei	Numărul de cicluri PCR (X)
10–49 ng ADNg	12
50–1000 ng ADNg	9
50–1000 ng ADNg extras din FFPE	12
ADNg extras din sânge	9

## Procedura

1. Combinați următoarele pentru a pregăti Amestecul principal PCR. Înmulțiți fiecare volum cu numărul de probe procesate.
  - EPM (23 µl)
  - Apă fără nuclează (23 µl)
 Surplusul de reactivi este inclus în volum.
2. Pipetați Amestecul principal PCR de 10 ori pentru a amesteca, apoi centrifugați un timp scurt.
3. Cu placa pe suportul magnetic, utilizați o pipetă multicanal de 200 µl pentru a îndepărta și elimina TWB2. Spuma care rămâne pe pereții godeului nu afectează în mod negativ biblioteca.
4. Scoateți de pe suportul magnetic.
5. Adăugați imediat 40 µl din Amestecul principal PCR direct pe bilele din fiecare godeu.
6. Pipetați imediat pentru a amesteca până când bilele sunt repuse complet în suspensie. Alternativ, sigilați placa și agitați la 1600 rpm timp de 1 minut.

7. Sigilați placa de probe și centrifugați la 280 × g timp de 10 secunde.
8. Centrifugați placa adaptorului de indexare la 1000 x g timp de 1 minut.
9. Pregătiți placa adaptorului de indexare.
  - [ $< 96$  probe] Perforați sigiliul de folie de pe placa adaptorului de indexare cu un nou vârf de pipetă pentru fiecare godeu numai pentru numărul de probe procesate.
  - [96 de probe] Aliniați o nouă placă PCR cu jumătate de manta deasupra plăcii adaptorului de indexare și apăsați în jos pentru a perfora sigiliul din folie. Eliminați placa PCR utilizată pentru a perfora sigiliul din folie.
10. Utilizând un vârf de pipetă nou, adăugați 10  $\mu$ l de adaptoare de indexare asociate în prealabil în fiecare godeu.
11. Utilizând o pipetă setată la 40  $\mu$ l, pipetați de 10 ori pentru a amesteca. Alternativ, sigilați placa și agitați la 1600 rpm timp de 1 minut.
12. Sigilați placa, iar apoi centrifugați la 280 × g timp de 10 secunde.
13. Așezați pe ciclul termic și rulați programul PCR eBLTS.

#### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, depozitați la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 30 de zile.

## Curățarea bibliotecilor

Acest pas utilizează procedura de purificare a bilelor pe ambele laturi pentru a purifica bibliotecile amplificate.

#### Consumabile

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Etanol 80% proaspăt preparat (EtOH)
- Placă de depozitare cu godeuri adânci din polipropilenă, cu 96 de godeuri de 0,8 ml (placă MIDI)
- Placă PCR cu 96 de godeuri
- Suport magnetic pentru placă MIDI
- Suport magnetic placă PCR
- Eprubete pentru microcentrifugă, 1,5 ml
- Apă fără nuclează

#### Despre reactivi

- Cleanup Beads
  - Agitați înainte de fiecare utilizare.
  - Agitați frecvent pentru a vă asigura că bilele sunt distribuite uniform.



- Aspirați și distribuiți încet luând în considerare vâscozitatea soluției.

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

Articol	Depozitare	Instrucțiuni
CB	Temperatura camerei	Agitați și răsturnați pentru a amesteca până când culoarea lichidului este omogenă.
RSB	între 2 °C și 8 °C	Decongelați timp de 30 de minute la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca.

## Procedura

1. Agitați placa PCR cu 96 de godeuri la 1800 rpm timp de 1 minut, apoi centrifugați pentru scurt timp.
2. Așezați pe suportul magnetic al plăcii PCR și așteptați până când lichidul este transparent (1 minut).
3. Agitați CB de 3 ori timp de 10 secunde, apoi răsturnați de mai multe ori pentru a repune în suspensie.
4. Pentru ADNg de înaltă calitate, procedați după cum urmează.
  - a. Adăugați 77 μl de apă fără nuclează în fiecare godeu al unei noi plăci MIDI.
  - b. Adăugați 88 μl de CB în fiecare godeu al plăcii MIDI.
  - c. Transferați câte 45 μl de supernatant din fiecare godeu al plăcii PCR în godeul corespunzător al plăcii MIDI.
  - d. Eliminați placa PCR.
  - e. Pipetați fiecare godeu de 10 ori pentru amestecare. Alternativ, sigilați placa și agitați la 1800 rpm timp de 1 minut.
  - f. Sigilați placa și incubați la temperatura camerei timp de 5 minute.
  - g. Verificați dacă există bule de aer. Dacă se observă, rotiți în jos.
  - h. Așezați pe suportul magnetic al plăcii MIDI și așteptați până când lichidul este transparent (5 minute).
  - i. În timpul incubației, agitați temeinic CB, apoi adăugați 20 μl în fiecare godeu al unei noi plăci MIDI.
  - j. Transferați câte 200 μl de supernatant din fiecare godeu al plăcii MIDI în godeul corespunzător al noii plăci MIDI (care conține 20 μl de CB).
  - k. Eliminați prima placă MIDI.
  - l. Pipetați fiecare godeu al noii plăci MIDI de 10 ori pentru a amesteca. Alternativ, sigilați placa și agitați la 1800 rpm timp de 1 minut.
5. Pentru FFPE extras, procedați după cum urmează.
  - a. Adăugați 81 μl de CB în fiecare godeu al noii plăci MIDI.
  - b. Transferați câte 45 μl de supernatant din fiecare godeu al plăcii PCR în godeul corespunzător al plăcii MIDI.
  - c. Eliminați placa PCR.

- d. Pipetați fiecare godeu de 10 ori pentru a amesteca . Alternativ, sigilați placa și agitați la 1800 rpm timp de 1 minut.
6. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute.
7. Verificați dacă există bule de aer. Dacă se observă, rotiți în jos.
8. Așezați pe suportul magnetic al plăcii MIDI și așteptați până când lichidul este transparent (5 minute).
9. Fără a deranja bilele, îndepărtați și eliminați supernatantul.
10. Spălați bilele după cum urmează.
  - a. Cu placa pe suportul magnetic, adăugați 200  $\mu$ l de EtOH 80% proaspăt fără amestecare.
  - b. Incubați timp de 30 de secunde.
  - c. Fără a deranja bilele, îndepărtați și eliminați supernatantul.
11. Spălați bilele a **doua** oară.
12. Uscați la aer pe suportul magnetic timp de 5 minute.
13. În timpul uscării la aer, utilizați o pipetă de 20  $\mu$ l pentru a îndepărta și elimina EtOH rezidual.
14. Scoateți-l de pe suportul magnetic.
15. Adăugați 17  $\mu$ l de RSB pe bile.
16. Sigilați placa și agitați la 1800 rpm timp de 2 minute.
17. Incubați la temperatura camerei timp de 2 minute.
18. Verificați dacă există bule de aer. Dacă se observă, rotiți în jos.
19. Așezați placa pe suportul magnetic al plăcii MIDI și așteptați până când lichidul este transparent (2 minute).
20. Transferați 15  $\mu$ l de supernatant pe o nouă placă PCR cu 96 de godeuri.

#### **PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ**

Dacă vă opriți, sigilați placa și depozitați-o la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 30 de zile.

## **Gruparea bibliotecilor pre-îmbogățite**

Acest pas combină bibliotecile de DNA cu indexuri unice într-un singur fond de până la 12 biblioteci.

## Metode de grupare

Puteți efectua gruparea în funcție de volum sau masă. Utilizați următorul tabel pentru a determina metoda adecvată pentru datele dvs.

Tabelul 2 Metode de grupare recomandate

Introducerea specimenului	Metoda de grupare
10–49 ng ADNg	Masă
50–1000 ng ADNg	Volum
ADNg extras din FFPE	Masă
ADNg extras din sânge	Volum

- Îmbogățirea într-un singur plex nu necesită gruparea bibliotecilor pre-îmbogățite. Totuși, poate fi necesară adăugarea de RSB.
- După cuantificarea bibliotecilor pre-îmbogățite, toate tipurile de probe introduse pot fi grupate în funcție de masă, pentru a obține un echilibru optim de indexuri.
- Randamentul final al bibliotecilor pre-îmbogățite generate în preparate experimentale separate poate varia. Prin urmare, se recomandă gruparea în funcție de masă pentru a obține un echilibru optim de indexuri.
- Utilizați o îmbogățire într-un singur plex pentru următoarele situații.
  - 10–49 ng ADNg
  - 50–1000 ng ADNg extras din FFPE
  - Detecția redusă a frecvențelor alelice minore pentru definirea variantelor somatice.

## Grupare în funcție de masă

Pentru următoarele situații, cuantificați-vă bibliotecile pentru a utiliza o masă de ADN per bibliotecă pentru îmbogățirea specificată în [Gruparea bibliotecilor pre-îmbogățite la concentrații egale la pagina 36](#).

- Introducere probă de 10–49 ng ADNg
- Introducere probă de 50–1000 ng ADNg extras din FFPE
- Detecția redusă a frecvențelor alelice minore pentru definirea variantelor somatice
- ADNg extras din sânge pentru un echilibru optim de indexuri

## Cuantificarea bibliotecilor pre-îmbogățite

- Rulați 1  $\mu$ l din bibliotecile pre-îmbogățite folosind metoda preferată de cuantificare pe bază de fluorescență, care utilizează colorantul de intercalare ADNds.
  - Pentru ADNg de înaltă calitate de 50–1000 ng, așteptați-vă la un randament al bibliotecii pre-îmbogățite  $\geq$  500 ng.
  - Pentru 50–1000 ng de ADNg extras din FFPE, așteptați-vă la un randament al bibliotecii pre-îmbogățite de 500–6000 ng, în funcție de calitatea probei inițiale.

**NOTĂ** Pentru metode de cuantificare cu decalaje diferite, calificați metoda de cuantificare pentru acest flux de lucru. Rezultatele concentrației pot varia în funcție de metoda utilizată.

### Gruparea bibliotecilor pre-îmbogățite la concentrații egale

Utilizați următorul tabel pentru a stabili masa de ADN per bibliotecă necesară pentru îmbogățire, în funcție de tipul de probă și plexitatea de îmbogățire. Randamentele optime de îmbogățire și performanța testelor nu sunt garantate dacă se utilizează randamente ale bibliotecilor pre-îmbogățite mai mici decât cele recomandate.

Masa totală de ADN în reacția de îmbogățire nu trebuie să depășească 6000 ng.

Introducerea specimenului	Plexitate de îmbogățire	Masa de ADN per bibliotecă (ng)	Masa totală a bibliotecii de ADN (ng)
ADNg de înaltă calitate	12	250–500	3000–6000
ADNg extras din FFPE	1	200	200

- Înregistrați indexurile pentru bibliotecile pe care intenționați să le grupați în această etapă.
- În funcție de concentrația fiecărei biblioteci, calculați volumul care trebuie adăugat în reacția de îmbogățire pentru a ajunge la masa dorită de ADN.
  - ADNg de înaltă calitate: calculați volumul bibliotecii necesar pentru introduceri de 250–500 ng.
  - ADNg extras din FFPE: calculați volumul bibliotecii necesar pentru introduceri de 200 ng.
- Adăugați volumul calculat pentru fiecare bibliotecă în același godeu al plăcii PCR.
- Dacă utilizați ADNg de înaltă calitate, efectuați una din următoarele operațiuni, în funcție de volumul total de biblioteci pre-îmbogățite cumulate:
  - Dacă volumul bibliotecii pre-îmbogățite = 30  $\mu$ l, continuați cu [Hibridizarea sondelor la pagina 38](#).
  - Dacă volumul bibliotecii pre-îmbogățite < 30  $\mu$ l, adăugați RSB pentru a ajunge la un volum total de 30  $\mu$ l.
  - Dacă volumul bibliotecii pre-îmbogățite > 30  $\mu$ l, utilizați o metodă bazată pe bile sau un concentrator de vid, pentru a concentra probele grupate. Adăugați RSB în proba grupată concentrată pentru a ajunge la un volum total de 30  $\mu$ l.
- Dacă utilizați ADNg extras din FFPE, efectuați una din următoarele operațiuni, în funcție de volumul total de biblioteci pre-îmbogățite cumulate.

- Dacă volumul bibliotecii pre-îmbogățite = 7,5 µl, continuați cu [Hibridizarea sondelor la pagina 38](#).
- Dacă volumul bibliotecii pre-îmbogățite < 7,5 µl, adăugați RSB pentru a ajunge la un volum total de 7,5 µl.

### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa și depozitați-o la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 30 de zile.

### Grupare în funcție de volum

Când cantitatea introdusă este 50–1000 ng de ADN<sub>g</sub>, nu este necesară cuantificarea și normalizarea bibliotecilor individuale generate în același experiment.

Pentru a obține performanțe optime, grupați doar probele pre-îmbogățite din bibliotecă pregătite de același utilizator, același lot de reactivi și aceeași placă a adaptorului de index.

1. Înregistrați indexurile pentru bibliotecile pe care intenționați să le grupați în această etapă.
2. Combinați următoarele volume de biblioteci pre-îmbogățite și RSB pentru plexitatea dvs. de îmbogățire în același godeu al unei noi plăci PCR.  
Volumul rezultat este de 30 µl.

Plexitate de îmbogățire *	Fiecare volum de bibliotecă pre-îmbogățită (µl)	Volum RSB (µl)
1-plex	14	16
2 plexuri	14	2
3 plexuri	10	0
4 plexuri	7,5	0
5 plexuri	6	0
6 plexuri	5	0
7 plexuri	4,2	0,6
8 plexuri	3,7	0,4
9 plexuri	3,3	0,3
10 plexuri	3	0
11 plexuri	2,7	0,3
12 plexuri	2,5	0

\*Pentru informații despre plexitățile non-standard (de la 2 plexuri la 11 plexuri), consultați [Limitări ale procedurii la pagina 2](#).

### PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa și depozitați-o la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 30 de zile.

## [Opțional] Calificarea bibliotecilor pre-îmbogățite

Dacă se face gruparea în funcție de volum, pentru a cuantifica bibliotecile pre-îmbogățite, utilizați o metodă bazată pe fluorometrie care utilizează colorantul de intercalare ADNds. Pentru a califica bibliotecile pre-îmbogățite, utilizați un analizor de fragmente de ADN cu setul corespunzător de analiză a fragmentelor.

Utilizați 1 µl în total pentru calificarea bibliotecii. Bibliotecile pre-îmbogățite sunt suficient de concentrate pentru a permite diluții mici pentru cuantificare sau analiza fragmentelor.

## Hibridizarea sondelor

Acest pas leagă zonele țintă ale ADN-ului, cu sondele de captare.

Reactivii Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sunt compatibili atât cu panourile de oligonucleotide ADN de amplificare Illumina cât și terțe. Pentru informații privind specificațiile necesare pentru panourile terțe, consultați [Cerințe pentru panoul sondelor de îmbogățire la pagina 11](#).

### Consumabile

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (Soluție tampon HYB 2 + Elemente de blocare IDT NXT) (capac albastru)
- Panoul sondelor de îmbogățire
- Placă PCR cu 96 de godeuri
- Folie adezivă
- Pregătiți-vă pentru o procedură ulterioară:
  - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
  - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (capac galben)

### Despre reactivi

- NHB2 se precipită și se separă în timpul depozitării.
- Panoul sondelor de îmbogățire se referă la panoul de oligonucleotide de amplificare ales de la furnizorul Illumina.

### Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

Articol	Depozitare	Instrucțiuni
EHB2	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca. Dacă se observă cristale și opacitate, repetați agitarea sau pipetați în sus și în jos pentru a amesteca până când soluția este limpede.
Panoul sondelor de îmbogățire	-între 25 °C și -15 °C (Illumina)	Atât pentru panourile Illumina cât și cele terțe, aduceți la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca.
NHB2 (capac albastru)	între -25 °C și -15 °C	A se dezgheța la temperatura camerei. Atunci când vă aflați la temperatura camerei, preîncălziți pe un incubator de microspecimene la aceeași temperatură cu sonda pe care o utilizați timp de 5 minute. Agitați la viteză maximă de 3 ori timp de 10 secunde fiecare pentru a suspenda din nou. Centrifugați scurt. Pipetați în sus și în jos din partea de jos a eprubetei. Dacă se observă cristale și opacitate, repetați agitarea sau pipetați în sus și în jos pentru a amesteca până când soluția este limpede. Utilizați cât timp este cald pentru a evita reformarea precipitatelor.
SMB3*	între 2 °C și 8 °C	Dacă treceți la următoarea procedură imediat după reținerea timp de 90 de minute în cadrul programului HYB (hibridizare), aduceți la temperatura camerei cu cel puțin 2 ore înainte de a începe programul HYB (hibridizare).
EEW* (eprubetă galbenă)	între -25 °C și -15 °C	Dacă treceți la următoarea procedură imediat după reținerea timp de 90 de minute în cadrul programului HYB (hibridizare), aduceți la temperatura camerei cu cel puțin 2 ore înainte de a începe programul HYB (hibridizare). Atunci când vă aflați la temperatura camerei, preîncălziți pe un incubator de microspecimene la temperatura aplicabilă de hibridizare și captare timp de 30 de minute înainte să se încheie programul HYB (hibridizare).

\*Dacă vă opriți înainte de următoarea procedură, amânați pregătirea acestui reactiv până când ajungeți la procedura respectivă.

2. Salvați următorul program HYB (hibridizare) pe ciclul termic utilizând numărul corespunzător de cicluri, care sunt indicate în [Tabelul 3](#).
  - Alegeți opțiunea de preîncălzire capac și setați la 100 °C.
  - Setați volumul de reacție
    - [ADNgde înaltă calitate ] 100 µl
    - [ADNg extras din FFPE] 25 µl
  - 98 °C timp de 5 minute
  - X cicluri a câte 1 minut fiecare, începând de la 98°C pentru primul ciclu, apoi scăzând cu 2 °C per ciclu
  - Mențineți timp de 90 de minute la temperatura aplicabilă:
    - [ADNg extras din FFPE] 58 °C
    - [panouri de sonde 80 mer] 58 °C
    - [Definirea variantelor somatice] 58 °C
    - [Toate celelalte] 62 °C

Durata totală de rulare este de ~115 minute.

Tabelul 3 Număr de cicluri per probă sau panou

Tip probă și panou	Număr de cicluri (X)
ADNg extras din FFPE (indiferent de tipul panoului)	20
Panouri de sonde 80 mer (indiferent de tipul probei)	20
Definirea variantelor somatice	20
Toate celelalte probe și panouri	18

## Procedura

1. [ADNgde înaltă calitate] Adăugați următorii reactivi *în ordinea enumerată* în fiecare bibliotecă cumulată în placa PCR.  
Nu creați un amestec principal. Crearea unui amestec principal de NHB2 și EHB2 afectează în mod negativ performanța de îmbogățire.
  - NHB2 (capac albastru) (50 µl)
  - Panoul sondelor de îmbogățire (10 µl)
  - EHB2 (10 µl)
2. [ADNgde înaltă calitate] Folosind o pipetă setată la 90 µl, pipetați fiecare godeu de 10 ori pentru a amesteca.
3. [ADNg extras din FFPE] Adăugați următorii reactivi *în ordinea enumerată* în fiecare bibliotecă cumulată în placa PCR.  
Nu creați un amestec principal. Crearea unui amestec principal de NHB2 și EHB2 afectează în mod negativ performanța de îmbogățire.



- NHB2 (capac albastru) (12,5 µl)
  - Panoul sondelor de îmbogățire (2,5 µl)
  - EHB2 (2,5 µl)
4. [ADNg extras din FFPE] Folosind o pipetă setată la 20 µl, pipetați fiecare godeu de 10 ori pentru a amesteca.
  5. Sigilați placa și centrifugați la 280 × g timp de 10 secunde.
  6. Așezați placa de probe pe ciclul termic programat anterior și rulați programul HYB (hibridizare).
  7. Treceți imediat la următoarea procedură atunci când se încheie durata temperaturii de păstrare a programului HYB (hibridizare).



### ATENȚIE

Precipitarea are loc dacă temperatura reacției de hibridizare scade sub temperatura camerei.

## Capturarea sondelor hibridizate

Acest pas utilizează Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) pentru captarea de sonde hibridizate pe zonele de interes țintă.

### Consumabile

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (capac galben)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- Eprubetă pentru microcentrifugă, 1,5 ml
- Placă MIDI cu 96 de godeuri
- Placă PCR cu 96 de godeuri
- Folie adezivă
- Suport magnetic pentru placă MIDI
- Pregătiți-vă pentru o procedură ulterioară:
  - Enhanced PCR Mix (EPM)
  - PCR Primer Cocktail (PPC)

### Despre reactivi

- EEW
  - Asigurați-vă că EEW a fost dezghețat la temperatura camerei timp de cel puțin 2 ore înainte de preîncălzirea pe un incubator de microspecimene.

- Asigurați-vă că EEW a fost încălzit într-un incubator de microspecimene timp de 30 de minute înainte de încheierea programului HYB (hibridizare).
  - Lăsați EEW în incubatorul de microspecimene atunci când nu se utilizează. EEW trebuie să rămână încălzit pe tot parcursul protocolului.
  - Poate fi tulbure după ce a ajuns la temperatura camerei.
  - Poate părea galben.
- SMB3
    - SMB3 trebuie să fie la temperatura camerei înainte de utilizare.

## Pregătirea

### 1. Pregătiți următoarele consumabile.

Articol	Depozitare	Instrucțiuni
SMB3	între 2 °C și 8 °C	Lăsați să stea timp de 2 ore pentru a ajunge la temperatura camerei. Răsturnați și apoi agitați până la repunerea completă în suspensie.
EEW (eprubetă galbenă)	între -25 °C și -15 °C	După 2 ore de incubație la temperatura camerei, preîncălziți pe un incubator de microspecimene la temperatura aplicabilă de hibridizare și captare timp de 30 de minute înainte să se încheie programul HYB (hibridizare).
EE1	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura camerei, iar apoi agitați.
HP3	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura camerei, iar apoi agitați.
ET2	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca.
EPM	între -25 °C și -15 °C	Decongelați pe gheață timp de o oră. Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp. Puneți deoparte pe gheață.
PPC	între -25 °C și -15 °C	Decongelați pe gheață timp de o oră. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp. Puneți deoparte pe gheață.

2. Preîncălziți un incubator de microspecimene cu o inserție de bloc termic MIDI pentru a incuba placa pentru probe la una dintre următoarele temperaturi. Un al doilea incubator de microspecimene opțional poate fi utilizat pentru preîncălzirea EEW. Sprijiniți EEW deasupra inserției blocului termic MIDI.
- [FFPE] 58°C
  - [panouri de sonde 80 mer] 58 °C
  - [Definirea variantelor somatice] 58°C

- [Toate celelalte] 62°C

## Procedura

### Capturare

1. Adăugați SMB3 în godeul corespunzător al unei plăci MIDI noi după cum urmează.
  - [ADNgde înaltă calitate] Adăugați 250 µl SMB3.
  - [ADNg extras din FFPE] Adăugați 62,5 µl SMB3.
2. Folosind o pipetă setată la 100 µl pentru ADNg de înaltă calitate sau 25 µl pentru FFPE, transferați fiecare bibliotecă cumulată din placa PCR cu 96 de godeuri în godeul corespunzător al noii plăci MIDI.
3. Sigilați placa și agitați la 1200 rpm timp de 4 minute.
4. Dacă vă stropiți, centrifugați placa pentru scurt timp.
5. Așezați placa de probe pe inserția blocului termic MIDI de pe incubatorul cu microspecimene, sub eprubeta EEW, închideți capacul și apoi incubați timp de 15 minute la temperatura aplicabilă:
  - [FFPE] 58°C
  - [panou de sonde 80 mer] 58 °C
  - [Definirea variantelor somatice] 58°C
  - [Toate celelalte] 62°C
6. Scoateți placa de biblioteci cumulate și centrifugați la 280 × g timp de 30 de secunde.
7. Așezați imediat pe un suport magnetic al plăcii MIDI și așteptați până când lichidul este transparent (2 minute).
8. [ADNgde înaltă calitate ] Folosind o pipetă setată la 200 µl, îndepărtați și eliminați tot supernatantul din fiecare godeu fără a deranja peleta cu bile.
9. [ADNg extras din FFPE] Folosind o pipetă setată la 90 µl, îndepărtați și eliminați tot supernatantul din fiecare godeu fără a deranja peleta cu bile.
10. Îndepărtați și eliminați tot supernatantul rezidual.

### Spălare

1. Scoateți de pe suportul magnetic.
2. [ADNgde înaltă calitate ] Scoateți rapid EEW din incubatorul de microspecimene și adăugați 200 µl în fiecare godeu.
3. [ADNg extras din FFPE] Scoateți rapid EEW din incubatorul de microspecimene și adăugați 50 µl în fiecare godeu.
4. Returnați EEW neutilizat la incubatorul de microspecimene și mențineți-l încălzit.
5. Sigilați și agitați la 1800 rpm timp de 4 minute.

- Așezați placa de probe pe inserția blocului termic MIDI de pe incubatorul cu microspecimene, sub eprubeta EEW, închideți capacul și apoi incubați timp de 5 minute la temperatura aplicabilă:
  - [FFPE] 58°C
  - [panouri de sonde 80 mer] 58°C
  - [Definirea variantelor somatice] 58°C
  - [Toate celelalte panouri] 62 °C
- Așezați imediat pe un suport magnetic al plăcii MIDI și așteptați până când lichidul este transparent (2 minute).
- Utilizând o pipetă setată la 200 μl pentru ADN<sub>g</sub> de înaltă calitate sau 50 μl pentru FFPE, îndepărtați și eliminați tot supernatantul din fiecare godeu.
- Repeți pașii 1–8 de două ori pentru un total de trei spălări.

### Spălarea prin transfer

- Scoateți-l de pe suportul magnetic.
- [ADN<sub>g</sub> de înaltă calitate ] Scoateți rapid EEW din incubatorul de microspecimene și adăugați 200 μl în fiecare godeu .
- [ADN<sub>g</sub> extras din FFPE] Scoateți rapid EEW din incubatorul de microspecimene și adăugați 50 μl în fiecare godeu .
- Sigilați și agitați la 1800 rpm timp de 4 minute. Dacă vă stropiți, reduceți viteza la 1600 rpm.
- Transferați soluția de bile repuse în suspensie pe o nouă placă MIDI .  
Câteva probe pot rămâne în godeuri.



#### ATENȚIE

Transferul reactivului reduce la minim transferul de reactivi reziduali care pot inhiba PCR din aval.

- Așezați placa de probe pe inserția blocului termic MIDI de pe incubatorul cu microspecimene, închideți capacul și apoi incubați timp de 5 minute la temperatura aplicabilă:
  - [FFPE] 58°C
  - [panouri de sonde 80 mer] 58°C
  - [Definirea variantelor somatice] 58°C
  - [Toate celelalte] 62°C
- Așezați imediat pe un suport magnetic al plăcii MIDI și așteptați până când lichidul este transparent (2 minute).
- Utilizând o pipetă setată la 200 μl pentru ADN<sub>g</sub> de înaltă calitate sau 50 μl pentru FFPE, îndepărtați și eliminați tot supernatantul din fiecare godeu .
- Centrifugați placa la 280 × g timp de 30 de secunde.
- Așezați pe un suport magnetic al plăcii MIDI timp de 10 secunde.

11. Utilizați o pipetă de 20  $\mu$ l pentru a îndepărta și elimina lichidul rezidual din fiecare godeu.
12. Continuați imediat cu [Eluare la pagina 45](#) pentru a preveni uscarea excesivă a bilelor și pierderea randamentului bibliotecii.

## Eluare

1. Combinați următoarele volume pentru a pregăti un Amestec principal de eluare. Înmulțiți fiecare volum cu numărul de biblioteci cumulate procesate.
  - EE1 (28,5  $\mu$ l)
  - HP3 (1,5  $\mu$ l)Surplusul de reactivi suplimentari este inclus în volum.
2. Agitați, iar apoi centrifugați pentru scurt timp.
3. Luați placa MIDI de pe suportul magnetic.
4. Adăugați 23  $\mu$ l de Amestec principal de eluare în fiecare godeu .
5. Sigilați placa și agitați la 1800 rpm timp de 2 minute.
6. Incubați placa la temperatura camerei timp de 2 minute.
7. Centrifugați la 280  $\times$  g timp de 30 de secunde.
8. Așezați pe un suport magnetic al plăcii MIDI și așteptați până când lichidul este transparent (2 minute).
9. Transferați 21  $\mu$ l de supernatant din placa MIDI în godeul corespunzător al unei noi plăci PCR cu 96 de godeuri.
10. Eliminați placa MIDI.
11. Adăugați 4  $\mu$ l ET2 în fiecare godeu care conține 21  $\mu$ l de supernatant.
12. Setați pipeta la 20  $\mu$ l și pipetați încet fiecare godeu de 10 ori pentru a amesteca.
13. Sigilați placa, iar apoi centrifugați la 280  $\times$  g timp de 10 secunde.
14. Incubați placa timp de 1 minut la temperatura camerei.

## Amplificarea bibliotecii concentrate

Acest pas utilizează PCR pentru a amplifica biblioteca îmbogățită.

### Consumabile

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Folie adezivă

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile:

Articol	Depozitare	Instrucțiuni
EPM	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la 4 °C sau pe gheață timp de o oră. Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp. Puneți deoparte pe gheață.
PPC	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la 4 °C pe gheață timp de o oră. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp. Puneți deoparte pe gheață.

2. Salvați următorul program AMP (amplificare) pe ciclul termic utilizând numărul corespunzător de cicluri PCR, care sunt indicate în tabelul următor.

- Alegeți opțiunea de preîncălzire capac și setați la 100 °C.
- Setați volumul de reacție la 50 µl
- 98 °C timp de 45 secunde
- (X) cicluri la:
  - 98 °C timp de 30 secunde
  - 60 °C timp de 30 secunde
  - 72 °C timp de 30 secunde
- 72 °C timp de 5 minute
- Mențineți la 10 °C.

Durata totală de rulare este de ~35 minute.

Tip probă și panou	(X) Cicluri
FPPE	14
Panou de exomi (CEX) Illumina pentru ADNg de înaltă calitate	10
Panou de exomi (CEX) Illumina pentru FFPE	12
Toate celelalte probe și panouri	12 <sup>1234</sup>

<sup>1</sup> Se poate ajusta până la 15 cicluri pentru panouri terțe mici prin optimizare ulterioară. Dacă se utilizează FFPE, numărul de cicluri poate fi ajustat până la 17.

<sup>2</sup> Se poate ajusta până la 17 cicluri pentru panouri terțe care au doar 500 de sonde. Dacă se utilizează FFPE, numărul de cicluri poate fi ajustat până la 19.

<sup>3</sup> Se poate ajusta până la 14 cicluri pentru probele FFPE.

<sup>4</sup> Creșterea numărului de cicluri PCR poate duce la o rată mai mare de duplicate și la dimensiuni mai mici ale fragmentelor pentru probele FFPE.

## Procedura

1. Adăugați 5 µl de PPC în fiecare godeu.
2. Adăugați 20 µl de EPM în fiecare godeu.
3. Sigilați placa și agitați la 1200 rpm timp de 1 minut.
4. Centrifugați placa la 280 × g timp de 10 secunde.
5. Așezați-o pe ciclul termic de preprogramat și rulați programul AMP (amplificare).

## PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, depozitați la o temperatură între 2 °C și 8 °C timp de până la două zile. Alternativ, lăsați pe ciclul termic timp de până la 24 de ore.

## Purificarea bibliotecii concentrate amplificate

Acest pas utilizează Cleanup Beads pentru a purifica biblioteca îmbogățită și a elimina produsele nedorite.

## Consumabile

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Etanol 80% proaspăt preparat (EtOH)
- Sigilii adezive
- Placă MIDI cu 96 de godeuri
- Placă PCR cu 96 de godeuri
- Suport magnetic pentru placă MIDI

## Despre reactivi

- Cleanup Beads
  - Agitați înainte de fiecare utilizare.
  - Agitați frecvent pentru a vă asigura că bilele sunt distribuite uniform.
  - Aspirați și distribuiți încet luând în considerare vâscozitatea soluției.

## Pregătirea

1. Pregătiți următoarele consumabile.

Articol	Depozitare	Instrucțiuni
CB	Temperatura camerei	Agitați și răsturnați pentru a amesteca până când culoarea lichidului este omogenă.
RSB	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura camerei. Agitați pentru a amesteca.

2. Preparați EtOH 80% proaspăt din etanol absolut.

## Procedura

1. Centrifugați placa PCR la 280 × g timp de 10 secunde.
2. Agitați CB de 3 ori timp de 10 secunde, iar apoi răsturnați.
3. Adăugați 40,5 μl de CB în fiecare godeu al noii **plăci** MIDI.
4. Transferați 45 μl din fiecare godeu al plăcii PCR în godeul corespunzător al plăcii MIDI.
5. Sigilați placa și agitați la 1800 rpm timp de 1 minut.
6. Incubați placa MIDI la temperatura camerei timp de 5 minute.
7. Centrifugați la 280 × g timp de 10 secunde.
8. Așezați pe un suport magnetic al plăcii MIDI și așteptați până când lichidul este transparent (5 minute).
9. Folosind o pipetă setată la 95 μl, îndepărtați și eliminați tot supernatantul din fiecare godeu.
10. Spălați de două ori după cum urmează.
  - a. Cu placa pe suportul magnetic, adăugați 200 μl de EtOH 80% proaspăt fără amestecare.
  - b. Incubați timp de 30 de secunde.
  - c. Fără a deranja bilele, îndepărtați și eliminați supernatantul.
11. Uscați la aer pe suportul magnetic timp de 5 minute.
12. În timpul uscării la aer, utilizați o pipetă de 20 μl pentru a îndepărta și elimina EtOH rezidual din fiecare godeu.
13. Îndepărtați de pe suportul magnetic și adăugați 32 μl de RSB în fiecare godeu.
14. Sigilați placa și agitați la 1800 rpm timp de 1 minut.
15. Incubați placa la temperatura camerei timp de 5 minute.
16. Centrifugați la 280 × g timp de 10 secunde.
17. Așezați pe un suport magnetic al plăcii MIDI și așteptați până când lichidul este transparent (2 minute).
18. Transferați câte 30 μl de supernatant din placa MIDI cu 96 de godeuri în godeul corespunzător al noii plăci PCR.
19. Eliminați placa MIDI.

## PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, sigilați placa și depozitați-o la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 7 zile.



## Verificați bibliotecile îmbogățite

Pentru a cuantifica introducerea de ADN dublu catenar, utilizați o metodă bazată pe fluorescență care utilizează colorantul de intercalare. Evitați metodele care măsoară acidul nucleic total, cum ar fi NanoDrop sau alte metode de absorbantă UV.

1. Rulați 1 µl din bibliotecile îmbogățite folosind metoda dvs. de cuantificare.

**NOTĂ** Molaritatea totală a sondei afectează în mod proporțional randamentul bibliotecii post-îmbogățire.

Așteptați-vă la o dimensiune medie a inserției de 125–235 bp și la distribuirea fragmentelor din bibliotecă cu un interval de dimensiuni cuprins între ~200 bp și ~1000 bp.

## Diluarea bibliotecilor la concentrația de pornire

Acest pas diluează bibliotecile la concentrația de pornire pentru sistemul dvs. de secvențiere și este primul pas într-o diluție în serie. După diluarea la concentrația de pornire, bibliotecile sunt pregătite pentru a fi denaturate și diluate la concentrația de încărcare finală.

Pentru secvențiere, indiferent de panoul sondelor de îmbogățire pe care îl utilizați, Illumina recomandă configurarea unei rulări cu secvențiere la ambele capete cu 151 de cicluri per citire (2 × 151) și 10 cicluri per citire de indexuri. Dacă doriți mai puține citiri suprapuse sau mai puțină acoperire brută, puteți trece la o secvență mai mică la 2 × 126 sau 2 × 101.

- Calculați valoarea molarității bibliotecii sau bibliotecilor grupate utilizând următoarea formulă.
  - Pentru bibliotecile calificate pe un analizor de fragmente de ADN, utilizați dimensiunea medie obținută pentru bibliotecă.
  - Pentru toate celelalte metode de calificare, utilizați 350 bp ca dimensiune medie a bibliotecii.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times dimensiune\ medie\ bibliotecă(bp)} = \text{Molaritate (nM)}$$

De exemplu, în cazul în care concentrația bibliotecii dvs. este 20 ng/μl și dimensiunea medie este 350 bp, valoarea molarității rezultate este 86,58 nM.

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

- Utilizând valoarea molarității, calculați volumele RSB și biblioteca de care este nevoie pentru a dilua bibliotecile la concentrația de pornire pentru sistemul dvs.

Sistem de secvențiere	Volum de biblioteci minim necesar (μl)	Concentrație de pornire (nM)	Concentrație de încărcare finală (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1.2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) sau 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM este concentrația de pornire pentru o concentrație de încărcare finală de 350 pM. Dacă este necesar, ajustați concentrația de încărcare finală utilizând următorul tabel.

Concentrație de încărcare finală (pM)	Concentrație bibliotecă cumulată (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1

Concentrație de încărcare finală (pM)	Concentrație bibliotecă cumulată (nM)
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

### 3. Diluați bibliotecile utilizând RSB:

- **Biblioteci cuantificate ca și fond de biblioteci multiplexate** — Diluați fondul de biblioteci la concentrația de pornire pentru sistemul dvs.
- **Biblioteci cuantificate individual** — Diluați fiecare bibliotecă la concentrația de pornire pentru sistemul dvs. Adăugați 10 µl din fiecare bibliotecă diluată într-o eprubetă pentru a crea un fond de biblioteci multiplexate.

### 4. Urmați instrucțiunile de denaturare și diluare pentru ca sistemul dvs. să se dilueze la concentrația de încărcare finală.

- Pentru Sistemul NextSeq 550Dx, consultați [Pregătirea secvențierii NextSeq 550Dx la pagina 51](#).
- Pentru Sistemul MiSeqDx, consultați [Pregătirea secvențierii MiSeqDx la pagina 53](#).
- Pentru Sistemul NovaSeq 6000Dx, consultați [Pregătirea secvențierii pentru NovaSeq 6000Dx la pagina 54](#).

Concentrațiile de încărcare finale reprezintă un punct de pornire și o îndrumare generală. Optimizați concentrațiile pentru fluxul dvs. de lucru și metoda de cuantificare pe parcursul rulărilor de secvențiere ulterioare sau în funcție de titrarea celulei de flux.

## Pregătirea secvențierii NextSeq 550Dx

Utilizați următoarele instrucțiuni pentru denaturarea și diluarea bibliotecilor pentru secvențiere pe sistemul de secvențiere NextSeq 550Dx.

### Consumabile

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

## Pregătirea

Pregătiți o diluție *nouă* de 0,2 N NaOH pentru denaturarea bibliotecilor pentru secvențiere. Pentru a preveni micile erori de pipetare care afectează concentrația finală de NaOH, se pregătește un volum suplimentar.



### ATENȚIE

0,2 N NaOH proaspăt diluat este esențial pentru procesul de denaturare. Denaturarea necorespunzătoare poate reduce randamentul.

1. Pregătiți următoarele consumabile.

Articol	Depozitare	Instrucțiuni
HT1	între -25 °C și -15 °C	A se dezgheța la temperatura camerei. A se păstra la temperaturi între 2 °C și 8 °C până când sunteți pregătiți să diluați bibliotecile denaturate.

2. Combinați următoarele volume într-o eprubetă pentru microcentrifugă pentru a pregăti o diluție proaspătă de NaOH:

- Apă de laborator (800 µl)
- 1N NaOH (200 µl)

Rezultatul este 1 ml 0,2N NaOH.

3. Răsturnați eprubeta de mai multe ori pentru a amesteca.

4. Combinați următoarele volume într-o eprubetă pentru microcentrifugă pentru a prepara 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

- Apă de laborator (800 µl)
- 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

Rezultatul este 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

**NOTĂ** Țineți eprubeta cu capacul pus. Utilizați diluția proaspătă în decurs de **12 ore**.

## Biblioteci denaturate

1. Combinați următoarele volume din bibliotecă și 0,2 N NaOH proaspăt diluat într-o eprubetă pentru microcentrifugă.

- Bibliotecă 10 µl
- 10 µl 0,2N NaOH

2. Agitați scurt timp și apoi centrifugați la 280 × g timp de 1 minut.

3. Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute.

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

## Diluarea și denaturarea bibliotecilor la 20 pM

1. Adăugați 970  $\mu$ l de HT1 prerăcit în eprubeta de biblioteci denaturate.  
Rezultatul este o bibliotecă denaturată de 20 pM.
2. Agitați scurt timp și apoi centrifugați la  $280 \times g$  timp de 1 minut.
3. Așezați bibliotecile de 20 pM pe gheață până când sunteți gata să continuați cu diluția finală.

## Diluarea bibliotecilor la concentrația de încărcare

1. Adăugați următoarele volume pentru a dilua soluția de bibliotecă denaturată de 20 pM la 1,2 pM.
  - Soluție de bibliotecă denaturată (78  $\mu$ l)
  - HT1 prerăcit (1222  $\mu$ l)Volumul total este 1,3 ml la 1,2 pM.
2. Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați cu impulsuri.
3. Treceți la secvențiere. Pentru instrucțiuni, consultați *Ghidul de referință pentru instrumentul NextSeq 550Dx (nr. document 100000009513)* și *Ghidul fluxului de lucru pentru Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx pentru NextSeq 550Dx (nr. document 200015671)* sau *Ghidul de utilizare DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pe aplicația NextSeq 550Dx (nr. document 200025238)*.

## Pregătirea secvențierii MiSeqDx

Utilizați următoarele instrucțiuni pentru denaturarea și diluarea bibliotecilor pentru secvențiere pe sistemul de secvențiere MiSeqDx.

### Consumabile

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1N NaOH

### Pregătirea

Pregătiți o diluție *nouă* de 0,2 N NaOH pentru denaturarea bibliotecilor pentru secvențiere. Pentru a preveni micile erori de pipetare care afectează concentrația finală de NaOH, se pregătește un volum suplimentar.



#### ATENȚIE

0,2 N NaOH proaspăt diluat este esențial pentru procesul de denaturare. Denaturarea necorespunzătoare poate reduce randamentul.

1. Pregătiți următoarele consumabile.

Articol	Depozitare	Instrucțiuni
HT1	între -25 °C și -15 °C	A se dezgheța la temperatura camerei. A se păstra la temperaturi între 2 °C și 8 °C până când sunteți pregătiți să diluați bibliotecile denaturate.

- Combinați următoarele volume într-o eprubetă pentru microcentrifugă pentru a pregăti o diluție proaspătă de NaOH:

- Apă de laborator (800 µl)
- 1N NaOH (200 µl)

Rezultatul este 1 ml 0,2N NaOH.

**NOTĂ** Țineți eprubeta cu capacul pus. Utilizați diluția proaspătă în decurs de **12 ore**.

## Denaturarea unei biblioteci 4 nM

- Combinați următoarele volume într-o eprubetă de microcentrifugă.
  - Bibliotecă 4 nM (5 µl)
  - 0,2N NaOH (5 µl)
- Agitați scurt timp și apoi centrifugați la 280 × g timp de 1 minut.
- Incubați la temperatura camerei timp de 5 minute.
- Adăugați 990 µl HT1 pre-răcit în eprubeta care conține biblioteca denaturată. Rezultatul este o bibliotecă denaturată de 1 ml 20 pM.

## Diluarea bibliotecii 20 pM denaturate

- Diluati la concentrația dorită utilizând următoarele volume.

Concentrație	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Bibliotecă 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
HT1 prerăcit	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- Răsturnați pentru a amesteca, apoi centrifugați cu impulsuri.
- Treceți la secvențiere. Pentru instrucțiuni, consultați *Ghidul de referință al instrumentului MiSeqDx pentru MOS v4* (nr. document 1000000157953) și *Ghidul fluxului de lucru pentru Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx pentru MiSeqDx* (document nr. 200015661).

## Pregătirea secvențierii pentru NovaSeq 6000Dx

Utilizați următoarele instrucțiuni pentru denaturarea și diluarea bibliotecilor pentru secvențiere pe sistemul de secvențiere NovaSeq 6000Dx.

## Consumabile

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

## Pregătirea

Pregătiți o diluție *nouă* de 0,2 N NaOH pentru denaturarea bibliotecilor pentru secvențiere. Pentru a preveni micile erori de pipetare care afectează concentrația finală de NaOH, se pregătește un volum suplimentar.



### ATENȚIE

0,2 N NaOH proaspăt diluat este esențial pentru procesul de denaturare. Denaturarea necorespunzătoare poate reduce randamentul.

1. Combinați următoarele volume într-o eprubetă pentru microcentrifugă pentru a dilua 1N NaOH la 0,2N NaOH:

Tabelul 4 Mod S2

Reactiv	Volum pentru o celulă de flux (μl)	Volum pentru două celule de flux (μl)
Apă destinată utilizării în laborator	40	80
Stoc 1N NaOH	10	20

Aceste volume au ca rezultat 50 μl 0,2 N NaOH pentru o celulă de flux sau 100 μl 0,2 N NaOH pentru două celule de flux.

Tabelul 5 Mod S4

Reactiv	Volum pentru o celulă de flux (μl)	Volum pentru două celule de flux (μl)
Apă destinată utilizării în laborator	80	160
Stoc 1N NaOH	20	40

Aceste volume au ca rezultat 100 μl 0,2 N NaOH pentru o celulă de flux sau 200 μl 0,2 N NaOH pentru două celule de flux.

2. Răsturnați de mai multe ori pentru a amesteca sau agitați temeinic.
3. Combinați următoarele volume într-o eprubetă pentru microcentrifugă pentru a prepara 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.

- Apă de laborator (600 µl)
- 1M Tris-HCl, pH 8,0 (400 µl)

Rezultatul este 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0

**NOTĂ** Țineți eprubeta cu capacul pus. Utilizați diluția proaspătă în decurs de **12 ore**.

## Crearea unui fond de biblioteci normalizate

Concentrația de încărcare poate varia în funcție de metodele de pregătire, de cuantificare și de normalizare a bibliotecii.

Utilizați următoarele instrucțiuni pentru a normaliza bibliotecile la concentrația corespunzătoare și apoi gruparea acestora. Bibliotecile secvențiate pe aceeași celulă de flux trebuie combinate într-un singur fond normalizat.

**NOTĂ** Numărul maxim de probe care pot fi rulate pe fiecare culoar cu Set Illumina DNA Prep with Enrichment Dx este de 192. Această limită se datorează numărului total de Indexuri UD din Seturile A și B.

## Normalizarea bibliotecilor pentru grupare

1. Determinați concentrația necesară a bibliotecii cumulate pe baza concentrației de încărcare finale dorite.
  - Pentru o concentrație de încărcare finală de 350 pM, concentrația necesară a bibliotecii cumulate este de 1,75 nM.
  - Pentru a determina concentrația bibliotecii cumulate pentru o concentrație de încărcare finală diferită, consultați [Diluarea bibliotecilor la concentrația de pornire la pagina 50](#).
2. Normalizați bibliotecile la concentrația dorită a bibliotecii cumulate utilizând Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. Pentru asistență la diluarea bibliotecilor la concentrația corespunzătoare, consultați [Calculatorul de grupare](#) de pe site-ul web Illumina.

### Concentrații de încărcare recomandate

Concentrația optimă de încărcare a ADN-ului depinde de tipul bibliotecii și de dimensiunea inserției. Pentru biblioteci > 450 bp, este posibil să fie necesare concentrații de încărcare mai mari.

## Gruparea bibliotecilor normalizate și adăugarea controlului PhiX opțional

1. Combinați volumul corespunzător din fiecare bibliotecă normalizată într-o eprubetă nouă pentru microcentrifugă pentru a obține unul dintre următoarele volume finale:

Mod	Volum final (µl)
S2	150
S4	310



2. **[Opțional]** Creștere bruscă în 1% PhiX nedenaturat> după cum urmează.
  - a. Diluați 10 nM PhiX la 2,5 nM folosind Tris-HCl 10 mM, pH 8,5.
  - b. Adăugați volumul corespunzător de 2,5 nM PhiX nedenaturat în eprubeta fondului de biblioteci nedenaturate.

Mod	2,5 nM PhiX nedenaturat (μl)	Fond de biblioteci nedenaturate (μl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

La creșterea bruscă cu PhiX, 1% este cantitatea recomandată pentru biblioteci bine echilibrate. Bibliotecile cu diversitate redusă pot necesita mai mult. Pentru a utiliza un control PhiX cu biblioteci cu diversitate redusă, contactați departamentul de asistență tehnică Illumina pentru îndrumări.

### Fondul de biblioteci denaturare și controlul PhiX opțional

1. Adăugați 0,2N NaOH în eprubeta fondului de biblioteci nedenaturate și PhiX opțional, după cum urmează.

Celulă de flux	0,2N NaOH	Fond de biblioteci nedenaturate (μl)	Volum rezultat
S2	37	150	187 μl sau 187,9 μl cu PhiX
S4	77	310	387 μl sau 388,9 μl cu PhiX

2. Puneți capacul și apoi agitați scurt.
3. Centrifugați la 280 × g timp de până la 1 minut.
4. Incubați la temperatura camerei timp de 8 minute pentru a denatura.
5. Adăugați 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 după cum urmează pentru neutralizare.

Mod	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (μl)	Volum rezultat
S2	38	225 μl sau 225,9 μl cu PhiX
S4	78	465 μl sau 466,9 μl cu PhiX

6. Puneți capacul și apoi agitați scurt.
7. Centrifugați la 280 × g timp de până la 1 minut.
8. Transferați întregul volum de bibliotecă denaturată sau bibliotecă denaturată și PhiX în eprubeta din biblioteca NovaSeq 6000Dx.
9. Treceți la secvențiere. Pentru instrucțiuni, consultați *Documentația produsului Instrument NovaSeq 6000Dx* (nr. document 200010105) și *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pentru NovaSeq 6000Dx* (nr. document 200014776).

## Depanare

Pentru depanarea problemelor din fluxul de lucru, urmați instrucțiunile din tabelul de mai jos. Dacă un ciclu de secvențiere sau o pregătire a bibliotecii pentru o probă eșuează de două ori, este posibil să fie necesară o depanare suplimentară. Contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.

Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
Ciclul de secvențiere nu corespunde specificațiilor de control al calității aferente Specificații	Eroare de utilizare sau a echipamentelor de laborator în fluxul de lucru de analiză	<p>Calificați bibliotecile îmbogățite pentru a asigura randamentul adecvat al bibliotecii și distribuirea dimensiunii fragmentului. Repetați pregătirea bibliotecii de la unul din pașii următori, în funcție de momentul în care suspectați că s-a produs eroarea de utilizare sau de echipament. Dacă pasul este necunoscut sau au apărut alte erori, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru depanare.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Efectuați o resecvențiere a bibliotecilor. Consultați <a href="#">Pregătirea secvențierii NextSeq 550Dx la pagina 51</a> <a href="#">Pregătirea secvențierii MiSeqDx la pagina 53</a> sau <a href="#">Pregătirea secvențierii pentru NovaSeq 6000Dx la pagina 54</a>.</li> <li>• Reconcentrați bibliotecile. Consultați <a href="#">Hibridizarea sondelor la pagina 38</a>.</li> <li>• Inițializați pregătirea bibliotecii de la începutul fluxului de lucru. Consultați <a href="#">Instrucțiuni de utilizare la pagina 22</a>.</li> </ul>
	Problemă cu instrumentul	Contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.
Eroare la generarea FASTQ sau eroare generală a sistemului de secvențiere (de ex. eroare de rețea, erori la încărcarea/descărcarea reactivilor etc.)	Problemă cu software-ul sau instrumentul	<p>Consultați ghidul modulului sau al aplicației pentru ajutor la analiză sau consultați documentația produsului dedicată Instrumentului <i>NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide</i> (nr. document 100000009513), <i>Ghidul de referință al instrumentului MiSeqDx pentru MOS v4</i> (nr. document 1000000157953) sau <i>NovaSeq 6000Dx</i> (nr. document 200010105).</p> <p>Contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru asistență suplimentară.</p>

Observație	Cauză posibilă	recomandată Acțiune
Biblioteca de ADN nu generează un randament suficient pentru încărcarea secvențierii	Cerințe pentru introducerea specimenului nerespectate	Asigurați introducerea corectă a specimenului și repetați pregătirea bibliotecii. Consultați <a href="#">Recomandări pentru introducerea probelor la pagina 19</a> .
	Eroare de utilizare sau de echipament în fluxul de lucru de analiză	<p>Repetati pregătirea bibliotecii de la unul din pașii următori, în funcție de momentul în care suspectați că s-a produs eroarea de utilizare sau de echipament. Dacă pasul este necunoscut sau au apărut alte erori, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru depanare.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Efectuați o resecvențiere a bibliotecilor. Consultați <a href="#">Pregătirea secvențierii NextSeq 550Dx la pagina 51</a> <a href="#">Pregătirea secvențierii MiSeqDx la pagina 53</a> sau <a href="#">Pregătirea secvențierii pentru NovaSeq 6000Dx la pagina 54</a>.</li> <li>• Reconcentrați bibliotecile. Consultați <a href="#">Hibridizarea sondelor la pagina 38</a>.</li> <li>• Inițializați pregătirea bibliotecii de la începutul fluxului de lucru. Consultați <a href="#">Instrucțiuni de utilizare la pagina 22</a>.</li> </ul>
	Nu au fost îndeplinite cerințele pentru panoul sondelor de îmbogățire	Asigurați-vă că panoul sondelor de îmbogățire este corespunzător și repetați pregătirea bibliotecii. Consultați <a href="#">Cerințe pentru panoul sondelor de îmbogățire la pagina 11</a> .

## Caracteristici de performanță

### Performanța cu panouri de exomi întregi

Performanța panoului de exomi a fost testată utilizând cea mai mică (50 ng) și cea mai mare (1000 ng) introducere recomandată de ADNg NA12878 de linie celulară Coriell, cu un set cunoscut pentru detectarea variantelor de linie germinală (Coriell platinum genome). Panoul de exomi 1 (45 Mb) și panoul de exomi 2 (36,8 Mb) au fost utilizate drept panouri reprezentative. Au fost testate 24 de replicări tehnice prin testul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, utilizând panoul de exomi 1 (45 Mb) în două reacții de îmbogățire cu 12 plexuri. Au fost testate 12 replicări tehnice prin testul Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, utilizând panoul de exomi 2 (36,8 Mb) într-o singură reacție de îmbogățire cu 12 plexuri. Bibliotecile îmbogățite au fost secvențiate pe sistemul de secvențiere NextSeq 550Dx cu modulul DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager.

Următorul tabel indică valorile medii ale celei de-a doua secvențieri și parametrii de performanță pentru definirea variantelor pentru replicările tehnice testate cu fiecare panou.

Tabelul 6 Performanța testului cu două panouri de exomi întregi

Panou	Îmbogățire cu o singură citire completată	Uniformitatea a acoperirii	Lungimea mediană a fragmentului	Rechemare SNV <sup>1</sup>	Precizie SNV <sup>2</sup>	Rechemare indel <sup>1</sup>	Precizie indel <sup>2</sup>
Panou de exomi 1 (45 Mb)	80%	96%	186 bp	96%	99%	90%	89%
Panou de exomi 2 (36,8 Mb)	93%	98%	188 bp	96%	99%	92%	93%

<sup>1</sup>Rechemare=Pozitive/(adevărat pozitive + fals negative)

<sup>2</sup>Precizie=Adevărat pozitive/(Adevărat pozitive + fals pozitive)

## Limita de detecție

Standardul de referință ADN Horizon HD799 a fost utilizat pentru a testa limita de detecție. HD799 constă din ADN tratat cu formalină moderat compromis, cu SNV-uri cunoscute în frecvențe alelice cuprinse între 1 și 24,5%. A fost utilizată cantitatea de intrare cea mai mică de ADN recomandată (50 ng) și a fost evaluată rata de detecție a SNV-urilor cu o frecvență alelică a variantelor (VAF)  $\geq 5,0\%$ . 16 replicări tehnice au fost testate prin analiza Illumina DNA Prep with Enrichment Dx utilizând fluxul de lucru FFPE, îmbogățit cu un panou de îmbogățire pan-cancer (1,94 Mb) în 16 îmbogățiri (1 plex), iar apoi secvențiate pe un instrument NextSeq 550Dx cu modulul DNA Generate FASTQ Dx.

Toate probele au îndeplinit cerințele de performanță specifice panoului, după cum este indicat în tabelul următor.

Tabelul 7 Performanța probei pentru limita de detecție

Panou	Rata de detecție a variantelor pentru SNV-uri cu VAF $\geq 5,0\%$	Valoare medie Uniformitatea acoperirii
Panou de îmbogățire pan-cancer (1,94 Mb, 523 gene)	100%	99%

## Substanțe care interferează

Impactul substanțelor care pot interfera a fost evaluat în Illumina DNA Prep with Enrichment Dx prin evaluarea performanței testului în prezența unor substanțe care pot interfera.

### Interferență în sângele integral

Acetaminofena (compus exogen, medicament), creatinina și trigliceridele (metaboliți endogeni) au fost testate prin îmbogățirea acestora în probe de sânge uman integral înainte de extracția ADN-ului. Pentru a evalua interferența rezultată din recoltarea sângelui (recoltare scurtă), EDTA a fost, de asemenea, îmbogățit în probele de sânge integral. În plus, pentru a evalua interferența rezultată din pregătirea probei, etanolul molecular a fost îmbogățit în ADN-ul extras din sânge integral.

Următorul tabel prezintă concentrațiile de testare per substanță interferentă.

Tabelul 8 Substanțe și concentrații potențial interferente testate în sânge integral

Substanță de testare	Concentrație de testare
Acetaminofenă	15,6 mg/dl* De trei ori cea mai mare concentrație preconizată după o doză terapeutică de medicament.
Creatinină	15 mg/dl* Cea mai mare concentrație observată în populație.
Trigliceride	1,5 g/dl* Cea mai mare concentrație observată în populație.
EDTA	6 mg/ml De trei ori concentrația preconizată în sânge, recoltat în eprubete EDTA.
Etanol molecular	15% v/v În eluat după extracția ADN-ului.

\*Conform CLSI EP37-ED1:2018

Pentru fiecare substanță interferentă, au fost testate 12 replicări tehnice prin analiza Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, îmbogățite cu panoul de exomi 1 (45 Mb) într-o singură îmbogățire (12 plexuri), apoi secvențiate pe un instrument NextSeq 550Dx cu modulul DNA Generate FASTQ Dx.

Pentru substanțele testate, toate cele 12 probe au îndeplinit cerințele de performanță ale probelor și nu s-a observat nicio interferență cu performanța analizei.

### Interferență în țesutul FFPE

Două probe FFPE colorectale au fost testate în prezența și absența hemoglobinei la 0,1 mg per 10 μm din secțiunea FFPE pentru a reprezenta cel mai nefavorabil scenariu de 50% contaminare a probei de țesut FFPE cu sânge cu nivel ridicat de hemoglobină. Probele au fost testate prin intermediul testului Illumina DNA Prep with

Enrichment Dx folosind panoul de îmbogățire pan-cancer 1 (1,94 Mb) ca panou reprezentativ în îmbogățiri cu un plex unic. Bibliotecile îmbogățite au fost apoi secvențiate pe un instrument NextSeq 550Dx cu modulul DNA Generate FASTQ Dx. Toate probele au îndeplinit cerințele de performanță ale probelor și s-a demonstrat că hemoglobina nu interferează cu performanța testului.

Pentru a evalua interferența rezultată din pregătirea probelor, doi compuși exogeni au fost introduși în ADN-ul extras dintr-o probă de țesut FFPE de cancer de vezică urinară. Substanțele exogene testate sunt soluții de extracție utilizate în mod obișnuit în timpul procesului de extracție a ADN-ului și sunt enumerate cu cantitățile testate în tabelul următor.

Soluțiile substanței de testare sunt disponibile în comerț în seturi de izolare ADN pe bază de coloană.

Tabelul 9 Substanțe și concentrații exogene potențial interferente testate în FFPE

Substanță de testare	Concentrația de testare (μl/30 μl eluat)
Soluție de deparafinare	113 x 10 <sup>-6</sup>
Soluție tampon de spălare AW2	0,417

Pentru fiecare substanță interferentă, au fost testate opt replicări tehnice prin analiza Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, îmbogățite cu un panou de îmbogățire pan-cancer (1,94 Mb) într-o îmbogățire cu un plex, apoi secvențiate pe un instrument NextSeq 550Dx cu modulul DNA Generate FASTQ Dx.

Pentru ambele substanțe testate, toate cele opt probe au îndeplinit cerințele de performanță ale probelor și nu s-a observat nicio interferență la performanța analizei.

## Contaminarea încrucișată

Linia de celule Coriell ADNg NA12878 (sex feminin, 10 probe), Linia de celule Coriell ADNg NA12877 (sex masculin, 12 probe) și controale fără șablon (NTC, 2 probe) au fost testate prin intermediul analizei Illumina DNA Prep with Enrichment Dx într-o dispunere a plăcilor de tip tablă de șah. Toate probele au utilizat recomandarea privind cea mai mare introducere de ADNg (1000 ng) drept cea mai stringentă condiție pentru evaluarea contaminării încrucișate a probelor. Testarea a fost efectuată de două ori de către doi operatori separați. Panoul de exomi 1 (45 Mb) a fost utilizat în reacțiile de îmbogățire cu 12 plexuri. Bibliotecile îmbogățite au fost secvențiate pe NextSeq 550Dx cu DNA Generate FASTQ Dx. Evaluarea a fost efectuată prin evaluarea acoperirii cromozomului Y specific masculin în probele feminine, prin compararea cu nivelurile de fundal ale unei plăci complete de probe feminine, precum și reprezentarea indexurilor probelor NTC.

Tabelul 10 Rezultatele contaminării încrucișate

Probe feminine cu acoperire cu cromozom Y masculin în <3x zgomot de referință	Reprezentarea indexurilor în NTC
100%	< 0,0005%

## Performanța aplicației DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Caracteristicile de performanță ale Aplicației DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pentru NovaSeq 6000Dx sunt furnizate în *Prospectul pentru instrumentul NovaSeq 6000Dx (nr. document 200025276)*.

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pe NextSeq 550Dx oferă aceleași fluxuri de lucru de analiză secundară ca și aplicația de pe NovaSeq 6000Dx, inclusiv următoarele trei fluxuri de lucru: generarea FASTQ, generarea FASTQ și VCF pentru detectarea variantelor de linie germinală și generarea FASTQ și VCF pentru detectarea variantelor somatice.

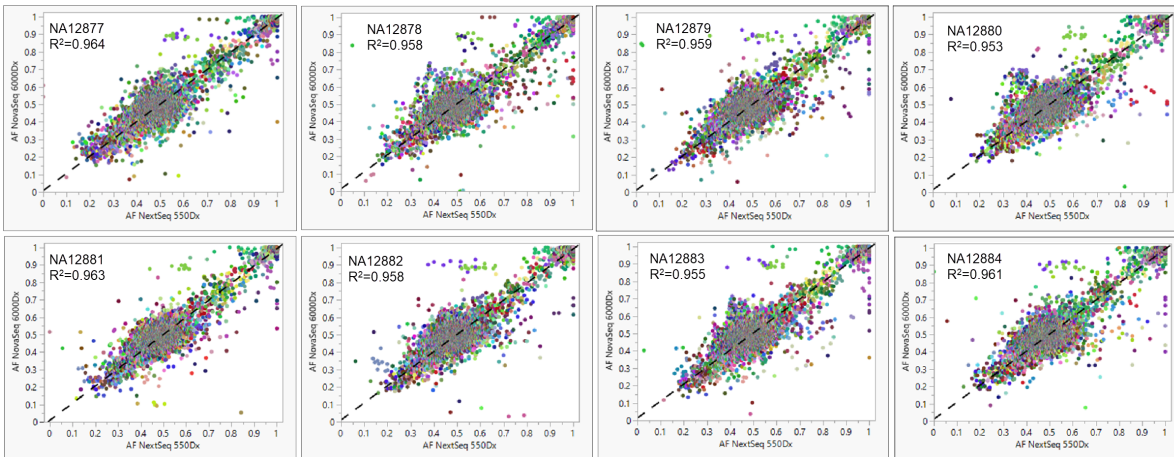
Performanța analizei secundare comparabile a fost obținută din aceeași pregătire a bibliotecii, secvențiată pe ambele platforme. Rata de detecție a variantelor ([Tabelul 11](#)) și concordanța frecvenței ([Figura 1](#)) pentru probele de ADNg de linie celulară Coriell, au fost evaluate utilizând un test reprezentativ concepută pentru a interoga o varietate de gene care acoperă 1.970.505 baze (9.232 ținte) la nivelul tuturor celor 23 de cromozomi umani. Au fost testate opt probe de ADN Platinum Genome, șapte în replicări de șase (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) și una (NA12881) în replicări de cinci (consultați [Figura 1](#)). Bibliotecile au fost secvențiate cu trei rulări fiecare pe instrumentele NovaSeq 6000Dx și NextSeq 550Dx și s-a efectuat definirea variantelor utilizând generarea FASTQ și VCF pentru fluxul de lucru al analizei pentru detectarea variantelor de linie germinală al Aplicației DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Pe baza corelației puternice dintre performanța aplicației pe instrumentele NovaSeq 6000Dx și NextSeq 550Dx, caracteristicile de performanță aferente analizei secundare furnizate în *Prospectul pentru instrumentul NovaSeq 6000Dx (nr. document 200025276)* sunt determinate ca fiind aplicabile și pentru DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx în aplicația NextSeq 550Dx.

Tabelul 11 Performanța aplicației – Rata de detecție a variantelor pentru SNV-uri, inserții și deleții

Panou	Rata de detecție a variantelor pe NovaSeq 6000Dx	Rata de detecție a variantelor pe NextSeq 550Dx
Panoul pan-genomului (1,97 Mb, 9.232 ținte, 23 cromozomi)	99,9%	99,9%

Figura 1 Comparația frecvenței variantelor pentru rulările NovaSeq 6000Dx și NextSeq 550Dx cu analiză folosind aplicația DRAGEN for IDPE Dx



## Anexa: Secvențele adaptorului de indexare UD Illumina

Aceste adaptoare cu index dublu unic (UD) sunt aranjate pe placă pentru a pune în aplicare strategia de asociere recomandată. Adaptoarele de indexuri au o lungime de 10 baze, în locul celor opt baze tipice.

Adaptoare index 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Adaptoare index 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Următoarea secvență este utilizată pentru reglarea fină a adaptorului pentru Read 1 (Citire 1) și Read 2 (Citire 2).

CTGTCTCTTATACATCT

### Adaptoare index placă A/set 1

Nume index	Baze i7 în adaptor	Baze i5 în adaptor
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT



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

<b>Nume index</b>	<b>Baze i7 în adaptor</b>	<b>Baze i5 în adaptor</b>
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	TATTCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCA	AACTGATICĂ
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA

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

## Adaptoare index placă B/set 2

Nume index	Baze i7 în adaptor	Baze i5 în adaptor
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	ATGTTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

<b>Nume index</b>	<b>Baze i7 în adaptor</b>	<b>Baze i5 în adaptor</b>
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTA	TATAGATTTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCTTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA

<b>Nume index</b>	<b>Baze i7 în adaptor</b>	<b>Baze i5 în adaptor</b>
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
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC

Nume index	Baze i7 în adaptor	Baze i5 în adaptor
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

## Istoricul versiunilor

Document	Data	Descrierea modificării
Nr. document 200038118 v00	Iulie 2023	<p>Versiunea inițială.</p> <p>Documentul anterior 200019584 înlocuit cu acesta.</p> <p>Modificări de la documentul 200019584 la acest nou document:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• A fost adăugat conținut pentru a accepta secvențierea pe Aplicația DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pentru NextSeq 550Dx.</li> <li>• A fost clarificată lista de reactivi nefurnizați.</li> <li>• Au fost adăugate informații privind raportarea incidenței la Avertismente și precauții.</li> <li>• A fost clarificată așteptarea privind bibliotecile de îmbogățire.</li> <li>• Au fost adăugate instrucțiuni pentru prepararea a 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.</li> <li>• A fost eliminată greșeala de tipar de la pasul Pregătirea secvențierii.</li> </ul> <p>Modificări aduse anterior documentului 200019584:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• A fost adăugat conținut pentru a accepta secvențierea pe instrumentul NovaSeq 6000Dx.</li> <li>• Au fost adăugat nume de sistem de secvențiere și numere de catalog.</li> <li>• Au fost eliminate informații privind indexarea duală unică pentru bibliotecile cu indexare unică.</li> </ul>

## Brevete și mărci comerciale

Prezentul document și conținutul său constituie proprietatea Illumina, Inc. și a afiliaților săi („Illumina”) și sunt destinate exclusiv pentru utilizarea contractuală de către client în legătură cu folosirea produsului sau produselor descrise în prezentul document și în niciun alt scop. Acest document și conținutul său nu trebuie utilizate sau distribuite pentru niciun alt scop și/sau nici comunicate, divulgate sau reproduse în orice alt mod și în orice formă fără consimțământul prealabil acordat în scris de Illumina. Illumina nu transmite, în temeiul brevetelor sale, al mărcilor sale comerciale, al drepturilor sale de autor sau în temeiul dreptului comun, nicio licență și nici drepturi similare ale oricărui terț prin acest document.

Instrucțiunile din acest document trebuie respectate în mod strict și explicit de către personalul calificat și corespunzător instruit pentru a asigura utilizarea corespunzătoare și în siguranță a produsului descris/produselor descrise în acest document. Înainte de utilizarea acestui produs/acestor produse, întreg conținutul acestui document trebuie citit și înțeles în întregime.

NERESPECTAREA OBLIGAȚIEI DE A CITI COMPLET ȘI DE A RESPECTA ÎN MOD EXPLICIT TOATE INSTRUCȚIUNILE CUPRINSE ÎN PREZENTUL DOCUMENT POATE DUCE LA DETERIORAREA PRODUSULUI SAU PRODUSELOR, LA VĂTĂMAREA PERSOANELOR, INCLUSIV A UTILIZATORILOR SAU A ALTOR PERSOANE ȘI LA DAUNE ALE ALTOR PROPRIETĂȚI ȘI VA ANULA ORICE GARANȚIE APLICABILĂ PRODUSULUI SAU PRODUSELOR.

ILLUMINA NU ÎȘI ASUMĂ NICIO RĂSPUNDERE CARE DECURGE DIN UTILIZAREA INADECVATĂ A PRODUSULUI SAU PRODUSELOR DESCRISE ÎN PREZENTUL DOCUMENT (INCLUSIV A COMPONENTELOR SAU SOFTWARE-ULUI ACESTORA).

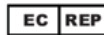
© 2023 Illumina, Inc. Toate drepturile rezervate.

Toate mărcile comerciale sunt proprietatea Illumina, Inc. sau a proprietarilor lor respectivi. Pentru informații specifice privind mărcile comerciale, consultați [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Informații de contact



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 S.U.A.  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (în afara Americii de Nord)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

### Sponsor australian

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

## Etichetarea produsului

Pentru referințe complete privind simbolurile afișate pe ambalajele și etichetele produselor, consultați legenda simbolurilor la adresa [support.illumina.com](http://support.illumina.com) în fila *Documentation* (Documentație) corespunzătoare setului dvs.