

ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ

Προβλεπόμενη χρήση

Το Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι ένα σετ αντιδραστηρίων και αναλωσίμων που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία βιβλιοθηκών δειγμάτων από γονιδιωματικό DNA που προέρχεται από ανθρώπινα κύτταρα και ιστό. Τα πάνελ ανιχνευτών που παρέχονται από τον χρήστη απαιτούνται για την προετοιμασία βιβλιοθηκών που στοχεύουν σε ειδικές γονιδιωματικές περιοχές ενδιαφέροντος. Οι βιβλιοθήκες δειγμάτων που δημιουργούνται προορίζονται για χρήση σε συστήματα αλληλούχησης της Illumina.

Αρχές της διαδικασίας

Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit προορίζεται για την προετοιμασία βιβλιοθηκών αλληλούχησης DNA που έχουν εμπλουτιστεί για στοχευμένες περιοχές από γονιδιωματικό DNA που προέρχεται από ανθρώπινα κύτταρα και ιστό.

Απαιτείται η χρήση πάνελ βιοτινυλιωμένων ανιχνευτών ολιγονουκλεοτιδίων που παρέχονται από τον χρήστη για στοχευμένο εμπλουτισμό. Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι συμβατό με διάφορα μεγέθη πάνελ, συμπεριλαμβανομένων των μικρών πάνελ (< 20.000 ανιχνευτές) και των μεγάλων πάνελ (> 200.000 ανιχνευτές). Οι εμπλουτισμένες βιβλιοθήκες που δημιουργούνται προορίζονται για αλληλούχηση στα συστήματα αλληλούχησης της Illumina.

Η διαδικασία του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- **Κατακερματισμός και προσθήκη ετικετών σε γονιδιωματικό DNA**—Χρησιμοποιείται μικρό BLT εμπλουτισμού (eBLTS) για τον κατακερματισμό του υλικού εισόδου DNA και την προσθήκη ετικετών σε αυτό. Κατά τη διάρκεια του κατακερματισμού και της προσθήκης ετικετών, πραγματοποιείται κατακερματισμός του gDNA και σύνδεσή του με προσαρμογείς σε ένα μόνο βήμα. Απαιτείται ελάχιστο υλικό εισόδου DNA 50 ng για την πλήρη διαβροχή με το eBLTS στην αντίδραση κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών. Όταν επιτευχθεί πλήρης διαβροχή, το eBLTS κατακερματίζει έναν καθορισμένο αριθμό μορίων DNA για να δημιουργήσει κανονικοποιημένες βιβλιοθήκες με συνεπή κατανομή μεγέθους τμημάτων.
- **Εκκαθάριση μετά τον κατακερματισμό και την προσθήκη ετικετών**—Εκκαθαρίζεται το DNA με ετικέτα προσαρμογέα στο eBLTS για να χρησιμοποιηθεί στην ενίσχυση.
- **Ενίσχυση DNA που έχει κατακερματιστεί και επισημανθεί με ετικέτες**—Ενισχύεται το DNA που έχει κατακερματιστεί και επισημανθεί με ετικέτες με τη χρήση ενός προγράμματος PCR περιορισμένου κύκλου. Μοναδικοί διπλοί (UD) δείκτες προστίθενται στα άκρα των τμημάτων DNA, κάτι που επιτρέπει την απόδοση διπλού μοναδικού γραμμωτού κώδικα στις βιβλιοθήκες DNA και τη δημιουργία συστάδων κατά τη διάρκεια της αλληλούχησης.
- **Εκκαθάριση βιβλιοθηκών**—Χρησιμοποιείται μια διαδικασία εκκαθάρισης με σφαιρίδια για τον καθαρισμό και την επιλογή μεγέθους των εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών DNA.

- **Ομαδοποίηση βιβλιοθηκών**—Συνδυάζονται βιβλιοθήκες DNA με μοναδικούς δείκτες σε μία ομάδα με έως και 12 βιβλιοθήκες. Μπορείτε να ομαδοποιήσετε τις βιβλιοθήκες κατ' όγκο ή κατά μάζα.
- **Υβριδισμός ανιχνευτών**—Συνίσταται σε μια αντίδραση υβριδισμού κατά τη διάρκεια της οποίας οι βιβλιοθήκες DNA διπλής αλυσίδας υποβάλλονται σε αποδιάταξη και ένα πάνελ βιοτινυλιωμένων ανιχνευτών DNA υβριδίζεται στις στοχευμένες γονιδωματικές περιοχές.
 - Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι συμβατό με πολλά πάνελ. Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit δεν περιλαμβάνει πάνελ εμπλουτισμού. Τα πάνελ ανιχνευτών παρέχονται από τον χρήστη και πρέπει να πληρούν τις απαιτούμενες προδιαγραφές. Τα αντιδραστήρια του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι συμβατά με τα πάνελ ολιγονουκλεοτιδίων DNA εμπλουτισμού τόσο της Illumina όσο και άλλων κατασκευαστών που πληρούν τις απαιτούμενες προδιαγραφές. Για πληροφορίες σχετικά με τις απαιτούμενες προδιαγραφές για τα πάνελ άλλων κατασκευαστών, ανατρέξτε στην ενότητα [Απαιτήσεις για τα πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού στη σελίδα 12](#).
- **Σύλληψη υβριδισμένων ανιχνευτών**—Χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (SMB3) για τη σύλληψη των βιοτινυλιωμένων ανιχνευτών που έχουν υβριδιστεί στις στοχευμένες περιοχές ενδιαφέροντος.
- **Ενίσχυση εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών**—Χρησιμοποιείται PCR για την ενίσχυση των εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών.
- **Εκκαθάριση ενισχυμένων εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών**—Χρησιμοποιείται μια διαδικασία καθαρισμού με σφαιρίδια για τον καθαρισμό των εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών που είναι έτοιμες για αλληλούχιση.
- **Αλληλούχιση**—Η αλληλούχιση των εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών εκτελείται στα συστήματα αλληλούχισης MiSeqDx, NextSeq 550Dx ή NovaSeq 6000Dx. Για τα MiSeqDx και NextSeq 550Dx, η ενσωματωμένη μονάδα DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση της εκτέλεσης αλληλούχισης, την παρακολούθηση της εκτέλεσης και την κύρια ανάλυση (δημιουργία FASTQ από αντιστοιχίσεις βάσης). Για το NovaSeq 6000Dx, η εφαρμογή DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application χρησιμοποιείται για τη ρύθμιση της εκτέλεσης και τη δευτερεύουσα ανάλυση με πολλές διαθέσιμες ροές εργασιών.

Περιορισμοί της διαδικασίας

- *Για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι συμβατό με γονιδωματικό DNA που προέρχεται από ανθρώπινα κύτταρα και ιστό.
- Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι συμβατό με υλικό εισόδου gDNA διπλής αλυσίδας 50–1.000 ng. Η απόδοση δεν διασφαλίζεται με υλικό εισόδου που δεν εμπίπτει σε αυτά τα όρια.
- Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit δεν περιλαμβάνει αντιδραστήρια για εκχύλιση DNA. Τα αποτελέσματα του αναλυτικού ελέγχου, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου παρεμβολών, που παρέχονται στα [Χαρακτηριστικά απόδοσης στη σελίδα 64](#) ελήφθησαν με ολικό αίμα και FFPE ως

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

αντιπροσωπευτικούς τύπους δείγματος με αντιπροσωπευτικά κιτ εκχύλισης DNA. Όλες οι διαγνωστικές εξετάσεις που έχουν αναπτυχθεί για χρήση με αντιδραστήρια του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx απαιτούν πλήρη επικύρωση για όλες τις πτυχές της απόδοσης με το κιτ εκχύλισης DNA της επιλογής σας.

- Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit δεν συνιστάται για δείγματα FFPE κακής ποιότητας με $\Delta Cq > 5$. Η χρήση δειγμάτων με $\Delta Cq > 5$ ενδέχεται να αυξήσει τις πιθανότητες αποτυχίας προετοιμασίας βιβλιοθήκης και να μειώσει την απόδοση του προσδιορισμού.
- Τα αντιδραστήρια του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit έχουν διαμορφωθεί και ελεγχθεί για τα δείγματα εισόδου, τις αντιδράσεις εμπλουτισμού και την πλεκτικότητα που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Δείγμα εισόδου	Αντιδράσεις εμπλουτισμού	Πλεκτικότητα εμπλουτισμού
Κιτ 16 δειγμάτων	Χαμηλής ποιότητας (FFPE)	16 αντιδράσεις	1-πλεκτικός
Κιτ 96 δειγμάτων	Υψηλής ποιότητας (π.χ. ολικό αίμα)	8 αντιδράσεις	12-πλεκτικός

- Η επεξεργασία υλικού εισόδου FFPE έχει ελεγχθεί και συνιστάται αποκλειστικά για αντιδράσεις 1-πλεκτικού εμπλουτισμού με χρήση του κιτ 16 δειγμάτων.
- Για το κιτ 96 δειγμάτων, είναι δυνατή η εφαρμογή μη τυπικών πλεκτικοτήτων (2-πλεκτικός έως 11-πλεκτικός), ωστόσο υπόκειται στους ακόλουθους περιορισμούς:
 - Η επεξεργασία δειγμάτων σε αντιδράσεις 2-πλεκτικού έως 11-πλεκτικού εμπλουτισμού μειώνει τον ρυθμό απόδοσης του κιτ.
 - Δεν διασφαλίζεται η επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων. Για την επίτευξη κατάλληλης απόδοσης εμπλουτισμού για μη τυπικές πλεκτικότητες μπορεί να απαιτείται πρόσθετη βελτιστοποίηση.
 - Για στρατηγικές ομαδοποίησης χαμηλής πλεκτικότητας (2-πλεκτικός έως 8-πλεκτικός), απαιτείται η επιλογή προσαρμογέων δείκτη με ποικιλομορφία αλληλουχιών για τη βελτιστοποίηση της ισορροπίας χρώματος για επιτυχή αλληλούχιση και ανάλυση δεδομένων. Η μονάδα DNA GenerateFASTQ Dx στα όργανα MiSeqDx και NextSeq 550Dx παρέχει επιλογές για χρωματικά ισορροπημένους συνδυασμούς δεικτών κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με στρατηγικές ομαδοποίησης, ανατρέξτε στην ενότητα [Μέθοδοι ομαδοποίησης στη σελίδα 38](#).
- Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit περιορίζεται στην παροχή εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών που υποβάλλονται σε αλληλούχιση μόνο στα συστήματα MiSeqDx, NextSeq 550Dx και NovaSeq 6000Dx. Για τη χρήση άλλων συστημάτων αλληλούχισης απαιτείται πλήρης επικύρωση για όλες τις πτυχές της απόδοσης.
- Τα πάνελ εμπλουτισμού δεν περιλαμβάνονται ως μέρος αυτού του προϊόντος. Τα αποτελέσματα του αναλυτικού ελέγχου που παρέχονται στα [Χαρακτηριστικά απόδοσης στη σελίδα 64](#) ελήφθησαν με αντιπροσωπευτικά πάνελ εμπλουτισμού και παρέχονται μόνο για ενημερωτικούς σκοπούς. Τα χαρακτηριστικά αναλυτικής απόδοσης χρησιμεύουν για την επεξήγηση των γενικών δυνατοτήτων του

προσδιορισμού και δεν καθορίζουν τις δυνατότητες ή την καταλληλότητα σχετικά με οποιοδήποτε ειδικές αξιώσεις για τον προσδιορισμό. Για όλες τις διαγνωστικές εξετάσεις που έχουν αναπτυχθεί για χρήση με αυτά τα αντιδραστήρια απαιτείται πλήρης επικύρωση για όλες τις πτυχές της απόδοσης.

- Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι συμβατό με τα πάνελ εμπλουτισμού τόσο της Illumina όσο και άλλων κατασκευαστών. Ωστόσο, η απόδοση με πάνελ εμπλουτισμού άλλων κατασκευαστών που δεν πληρούν τις απαιτήσεις για τα πάνελ δεν διασφαλίζεται. Για πληροφορίες σχετικά με τις απαιτήσεις για τα πάνελ, ανατρέξτε στην ενότητα [Απαιτήσεις για τα πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού στη σελίδα 12](#).
- Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit χρησιμοποιεί χρόνο υβριδισμού 2 ωρών. Η χρήση μεγαλύτερου χρόνου υβριδισμού μπορεί να επηρεάσει τις μετρήσεις απόδοσης.
- Οι μονάδες DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager για συστήματα MiSeqDx και NextSeq 550Dx παρέχουν μόνο αρχεία FASTQ. Αν χρησιμοποιείτε αυτές τις μονάδες, απαιτείται να εκτελέσετε επικύρωση δευτερεύουσας ανάλυσης.
- Η εφαρμογή DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application διατίθεται στο σύστημα NovaSeq 6000Dx. Η εφαρμογή υποστηρίζει πολλαπλές ροές εργασιών δευτερεύουσας ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων της δημιουργίας FASTQ, της δημιουργίας FASTQ και VCF για ανίχνευση παραλλαγών βλαστικής σειράς και της δημιουργίας FASTQ και VCF για ανίχνευση σωματικών παραλλαγών. Αν χρησιμοποιείτε την εφαρμογή για δημιουργία VCF, δεν χρειάζεται να εκτελέσετε επικύρωση δευτερεύουσας ανάλυσης.
- Για τους περιορισμούς της εφαρμογής DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application όταν χρησιμοποιείται με το σύστημα NovaSeq 6000Dx, ανατρέξτε στο *Ένθετο συσκευασίας NovaSeq 6000Dx Instrument* (αρ. εγγράφου 200025276).

Εξαρτήματα προϊόντος

Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit περιλαμβάνει τα ακόλουθα εξαρτήματα.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, αρ. καταλόγου 20051354 (16 δείγματα) ή αρ. καταλόγου 20051352 (96 δείγματα)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, αρ. καταλόγου 20051355 (16 δείγματα) ή αρ. καταλόγου 20051353 (96 δείγματα)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module για το NextSeq 550Dx, αρ. καταλόγου 20063024
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module για το MiSeqDx, αρ. καταλόγου 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application για το NovaSeq 6000Dx, αρ. καταλόγου 20074609

Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Για την ολοκλήρωση του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx απαιτείται Illumina DNA Prep with Enrichment Dx με σετ A UD δεικτών ή Illumina DNA Prep with Enrichment Dx με σετ B UD δεικτών. Μπορείτε να εκτελέσετε τον ακόλουθο αριθμό αντιδράσεων προετοιμασίας και εμπλουτισμού βιβλιοθηκών χρησιμοποιώντας ένα κιτ 16 δειγμάτων ή 96 δειγμάτων.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Δείγμα εισόδου	Αντιδράσεις εμπλουτισμού	Πλεκτικότητα εμπλουτισμού
Κιτ 16 δειγμάτων	Χαμηλής ποιότητας (FFPE)	16 αντιδράσεις	1-πλεκτικός
Κιτ 96 δειγμάτων	Υψηλής ποιότητας (π.χ. ολικό αίμα)	8 αντιδράσεις	12-πλεκτικός

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx με σετ A/B UD δεικτών

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, Αποθηκεύστε στους 15 °C έως 30 °C

Τα ακόλουθα αντιδραστήρια αποστέλλονται σε θερμοκρασία δωματίου. Αποθηκεύστε αμέσως τα αντιδραστήρια στην υποδεικνυόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης για να διασφαλιστεί η σωστή απόδοση.

Όνομα αντιδραστηρίου	Ποσότητα σωληναρίων		Χρώμα πώματος	Όγκος πλήρωσης	Δραστικά συστατικά
	16 δείγματα (αρ. 20050020)	96 δείγματα (αρ. 20050025)			
Ρυθμιστικό διάλυμα διακοπής κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών 2 (ST2)	1	4	Κόκκινο	350 ml	Διάλυμα απορρυπαντικού σε νερό.
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών 2 (TWB2)	1	1	Πράσινο	41 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει απορρυπαντικό και άλας.
Σφαιρίδια εκκαθάρισης (CB)	1	Δ/Υ*	Κόκκινο	10 ml	Παραμαγνητικά σφαιρίδια στερεάς φάσης σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα.

* Τα σφαιρίδια εκκαθάρισης για 96 δείγματα περιλαμβάνονται στο Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (αρ. 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 δείγματα), Αποθηκεύστε στους 15 °C έως 30 °C

Για τα κιτ 96 δειγμάτων, τα σφαιρίδια εκκαθάρισης περιλαμβάνονται στο Illumina Prep Dx Cleanup Beads (αρ. καταλόγου 20050030). Τα ακόλουθα αντιδραστήρια αποστέλλονται σε θερμοκρασία δωματίου. Αποθηκεύστε αμέσως τα αντιδραστήρια στην υποδεικνυόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης για να διασφαλιστεί η σωστή απόδοση. Για τα κιτ 16 δειγμάτων, τα σφαιρίδια εκκαθάρισης περιλαμβάνονται στο Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (αρ. καταλόγου 20050020).

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Όνομα αντιδραστηρίου	Ποσότητα	Χρώμα πώματος	Όγκος πλήρωσης	Δραστικά συστατικά
Σφαιρίδια εκκαθάρισης (CB)	4	Κόκκινο	10 ml	Παραμαγνητικά σφαιρίδια στερεάς φάσης σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα.

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, Αποθηκεύστε στους 2 °C έως 8 °C

Τα ακόλουθα αντιδραστήρια αποστέλλονται υπό ψύξη. Αποθηκεύστε αμέσως τα αντιδραστήρια στην υποδεικνυόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης για να διασφαλιστεί η σωστή απόδοση. Αποθηκεύστε το σωληνάριο αποθέματος eBLTS σε όρθια θέση ώστε τα σφαιρίδια να είναι πάντα βυθισμένα μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα.

Όνομα αντιδραστηρίου	Ποσότητα σωληναρίων		Χρώμα πώματος	Όγκος πλήρωσης		Δραστικά συστατικά
	16 δείγματα (αρ. 20050021)	96 δείγματα (αρ. 20050026)		16 δείγματα	96 δείγματα	
Μικρό BLT εμπλουτισμού (eBLTS)	1	4	Κίτρινο	200 μl	290 μl	Μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης που συνδέονται με τρανσποσώματα σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει γλυκερόλη, EDTA, διθειοθρεϊτόλη, άλας και απορρυπαντικό.
Ρυθμιστικό διάλυμα επανειναιώρησης (RSB)	1	4	Διάφανο	1,8 ml	1,8 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

illumina®

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, Αποθηκεύστε στους -25 °C έως -15 °C

Τα ακόλουθα αντιδραστήρια αποστέλλονται υπό ψύξη. Αποθηκεύστε αμέσως τα αντιδραστήρια στην υποδεικνυόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης για να διασφαλιστεί η σωστή απόδοση.

Όνομα αντιδραστηρίου	Ποσότητα σωληναρίων		Χρώμα πώματος	Όγκος πλήρωσης		Δραστικά συστατικά
	16 δείγματα (αρ. 20050022)	96 δείγματα (αρ. 20050027)		16 δείγματα	96 δείγματα	
Ρυθμιστικό διάλυμα κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών 1 (TB1)	1	4	Διάφανο	290 μl	290 μl	Ρυθμισμένο υδάτινο διάλυμα που περιέχει άλας μαγνησίου και διμεθυλομεθαναμίδιο.
Ενισχυμένο μείγμα PCR (EPM)	2	4	Διάφανο	200 μl	610 μl	Πολυμεράση DNA και dNTP σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 δείγματα), Αποθηκεύστε στους 2 °C έως 8 °C

Για τα κιτ 16 δειγμάτων, τα ακόλουθα αντιδραστήρια περιλαμβάνονται στο Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (αρ. καταλόγου 20050023). Για τα κιτ 96 δειγμάτων, τα αντιδραστήρια περιλαμβάνονται στο Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (αρ. καταλόγου 20050028).

Τα ακόλουθα αντιδραστήρια αποστέλλονται υπό ψύξη. Αποθηκεύστε αμέσως τα αντιδραστήρια στην υποδεικνυόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης για να διασφαλιστεί η σωστή απόδοση.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Όνομα αντιδραστηρίου	Ποσότητα σωληναρίων	Χρώμα πώματος	Όγκος πλήρωσης	Δραστικά συστατικά
Μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (SMB3)	4	Διάφανο	1,2 ml	Μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει φορμαμίδιο, απορρυπαντικό και άλας.
Ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης (RSB)	1	Διάφανο	1,8 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα.
Ρυθμιστικό διάλυμα υβρ. εμπλουτισμού 2 (EHB2)	1	Διάφανο	200 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει απορρυπαντικό και άλας.
Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης στόχου 2 (ET2)	1	Διάφανο	200 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 δείγματα), Αποθηκεύστε στους 2 °C έως 8 °C

Για τα κιτ 96 δειγμάτων, τα ακόλουθα αντιδραστήρια περιλαμβάνονται στο Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (αρ. καταλόγου 20050028). Για τα κιτ 16 δειγμάτων, τα αντιδραστήρια περιλαμβάνονται στο IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (αρ. καταλόγου 20050023).

Τα ακόλουθα αντιδραστήρια αποστέλλονται υπό ψύξη. Αποθηκεύστε αμέσως τα αντιδραστήρια στην υποδεικνυόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης για να διασφαλιστεί η σωστή απόδοση.

Όνομα αντιδραστηρίου	Ποσότητα σωληναρίων	Χρώμα πώματος	Όγκος πλήρωσης	Δραστικά συστατικά
Μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (SMB3)	2	Διάφανο	1,2 ml	Μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει φορμαμίδιο, απορρυπαντικό και άλας.
Ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης (RSB)	4	Διάφανο	1,8 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα.
Ρυθμιστικό διάλυμα υβρ. εμπλουτισμού 2 (EHB2)	1	Διάφανο	200 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει απορρυπαντικό και άλας.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Όνομα αντιδραστηρίου	Ποσότητα σωληναρίων	Χρώμα πώματος	Όγκος πλήρωσης	Δραστικά συστατικά
Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης στόχου 2 (ET2)	1	Διάφανο	200 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, Αποθηκεύστε στους -25 °C έως -15 °C

Τα ακόλουθα αντιδραστήρια αποστέλλονται υπό ψύξη. Αποθηκεύστε αμέσως τα αντιδραστήρια στην υποδεικνυόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης για να διασφαλιστεί η σωστή απόδοση.

Όνομα αντιδραστηρίου	Ποσότητα σωληναρίων		Χρώμα πώματος	Όγκος πλήρωσης	Δραστικά συστατικά
	16 δείγματα (αρ. 20050024)	96 δείγματα (αρ. 20050029)			
Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης εμπλουτισμού 1 (EE1)	1	1	Διάφανο	580 μl	Διάλυμα απορρυπαντικού σε νερό.
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης ενισχυμένου εμπλουτισμού (EEW)	4	4	Πορτοκαλί	4,1 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα και απορρυπαντικό.
Μείγμα εκκινητών PCR (PPC)	1	1	Διάφανο	320 μl	Μείγμα (ολιγονουκλεσιδίων) εκκινητών PCR.
2 N NaOH (HP3)	1	1	Διάφανο	200 μl	2 N διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH).
Ρυθμιστικό διάλυμα YBP. 2 + αποκλειστές NXT IDT (NHB2)	2	1	Μπλε	480 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα με Cot-1 DNA, παράγοντα συνωστισμού και φορμαμίδιο.

Όνομα αντιδραστηρίου	Ποσότητα σωληναρίων		Χρώμα πώματος	Όγκος πλήρωσης	Δραστικά συστατικά
	16 δείγματα (αρ. 20050024)	96 δείγματα (αρ. 20050029)			
Ενισχυμένο μείγμα PCR (EPM)	2	1	Διάφανο	200 μl	Πολυμεράση DNA και dNTP σε ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, Αποθηκεύστε στους -25 °C έως -15 °C

Τα ακόλουθα αντιδραστήρια αποστέλλονται υπό ψύξη. Αποθηκεύστε αμέσως τα αντιδραστήρια στην υποδεικνυόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης για να διασφαλιστεί η σωστή απόδοση. Για αλληλουχίες προσαρμογών δεικτών, ανατρέξτε στο [Παράρτημα: Αλληλουχίες προσαρμογών UD δεικτών της Illumina στη σελίδα 68](#).

Στοιχείο	Ποσότητα
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 δείκτες), αρ. 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B της Illumina (96 δείκτες), αρ. 20050039	1

Αντιδραστήρια που δεν παρέχονται

Απαιτούμενα αντιδραστήρια, δεν παρέχονται

- Αντιδραστήρια εκχύλισης και καθαρισμού DNA
- Αντιδραστήρια ποσοτικού προσδιορισμού DNA
- Αιθανόλη (200 proof για μοριακή βιολογία)
- Νερό χωρίς νουκλεάσες
- 1 M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- Διάλυμα NaOH 1N, μοριακού βαθμού καθαρότητας
- Εάν χρησιμοποιείτε το σύστημα αλληλούχισης NextSeq 550Dx:
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλοι) (αρ. καταλόγου 20028871)
- Εάν χρησιμοποιείτε το σύστημα αλληλούχισης MiSeqDx:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (αρ. καταλόγου 20037124)
- Εάν χρησιμοποιείτε το σύστημα αλληλούχισης NovaSeq 6000Dx:

- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 κύκλοι) (αρ. καταλόγου 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 κύκλοι) (αρ. καταλόγου 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (αρ. καταλόγου 20062292)
- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (αρ. καταλόγου 20062293)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (αρ. καταλόγου 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube, συσκευασία των 24 (αρ. καταλόγου 20062291)

Απαιτήσεις για τα πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού

Τα αντιδραστήρια του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι συμβατά με τα πάνελ ολιγονουκλεοτιδίων DNA εμπλουτισμού τόσο της Illumina όσο και άλλων κατασκευαστών. Εάν χρησιμοποιείτε βιοτινυλιωμένους ανιχνευτές DNA άλλων κατασκευαστών (σταθερά ή προσαρμοσμένα πάνελ), βεβαιωθείτε ότι πληρούν τις απαιτούμενες προδιαγραφές.

Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit έχει βελτιστοποιηθεί και επικυρωθεί με τη χρήση των ακόλουθων προδιαγραφών πάνελ άλλων κατασκευαστών. Δεν διασφαλίζεται η επίτευξη συγκρίσιμης απόδοσης κατά τη χρήση πάνελ άλλων κατασκευαστών που δεν πληρούν τις προδιαγραφές.

- Μήκος ανιχνευτή 80 bp ή 120 bp
- Από 500 έως 675.000 ανιχνευτές
- DNA μονής ή διπλής αλυσίδας
- Σύνολο ανιχνευτών εισόδου ≥ 3 rpols για εμπλουτισμό σε πλεκτικότητες από 1-πλεκτικό έως 12-πλεκτικό

Αποθήκευση και χειρισμός

- Η θερμοκρασία δωματίου ορίζεται ως 15 °C έως 30 °C.
- Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά όταν αποθηκεύονται όπως υποδεικνύεται μέχρι την καθορισμένη ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες των κιτ. Για τις θερμοκρασίες αποθήκευσης, ανατρέξτε στην ενότητα [Παρεχόμενα αντιδραστήρια στη σελίδα 5](#).
- Τα κατεψυγμένα αντιδραστήρια είναι σταθερά για τέσσερις κύκλους κατάψυξης-απόψυξης κατά μέγιστο που πραγματοποιούνται πριν από την καθορισμένη ημερομηνία λήξης.
- Η διαδικασία του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit περιλαμβάνει τα ακόλουθα σημεία ασφαλούς διακοπής:
 - Μετά την [Ενίσχυση DNA που έχει κατακερματιστεί και επισημανθεί με ετικέτες στη σελίδα 33](#), οι ενισχυμένες βιβλιοθήκες είναι σταθερές για έως και 30 ημέρες όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία από -25 °C έως -15 °C.
 - Μετά την [Εκκαθάριση βιβλιοθηκών στη σελίδα 35](#), οι εκκαθαρισμένες ενισχυμένες βιβλιοθήκες είναι σταθερές για έως και 30 ημέρες όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία από -25 °C έως -15 °C.

- Μετά την [Ομαδοποίηση βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό στη σελίδα 38](#), οι ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες είναι σταθερές για έως και 30 ημέρες όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία από -25 °C έως -15 °C.
- Μετά την [Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης στη σελίδα 50](#), η πλάκα εμπλουτισμένων, ενισχυμένων βιβλιοθηκών μπορεί να παραμείνει στον θερμικό κυκλοποιητή για έως και 24 ώρες. Εναλλακτικά, η πλάκα μπορεί να αποθηκευτεί στους 2 °C έως 8 °C για έως και 48 ώρες.
- Οι τελικές εκκαθαρισμένες εμπλουτισμένες βιβλιοθήκες είναι σταθερές για έως και 7 ημέρες όταν αποθηκεύονται στους -25 °C έως -15 °C.
- Εάν οποιαδήποτε από τις συσκευασίες ή το περιεχόμενο του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit έχει υποστεί ζημιά ή έχει διακυβευτεί, επικοινωνήστε με το τμήμα εξυπηρέτησης πελατών της Illumina.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα διακοπής κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών 2 (ST2) μπορεί να σχηματίσει ορατά ιζήματα ή κρυστάλλους. Εάν παρατηρούνται ιζήματα, θερμάνετε στους 37 °C για 10 λεπτά και, στη συνέχεια, αναδεύστε μέχρι να διαλυθούν τα ιζήματα.
- Το ρυθμιστικό διάλυμα ολιγονουκλεοτιδίων υβριδισμού (HYB) και το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης ενισχυμένου εμπλουτισμού (EEW) πρέπει να προθερμαίνονται στην ίδια θερμοκρασία με τη θερμοκρασία διατήρησης υβριδισμού που ισχύει ανά τύπο δείγματος και πάνελ ανιχνευτών. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τον χειρισμό των NHB2 και EEW, ανατρέξτε στην ενότητα [Σημειώσεις για τις διαδικασίες στη σελίδα 18](#).
- Το ρυθμιστικό διάλυμα υβρ. εμπλουτισμού 2 (EHB2) και το ρυθμιστικό διάλυμα HYB + αποκλειστές NXT IDT (NHB2) μπορεί να αναπτύξουν κρυστάλλους και θολρότητα. Εάν παρατηρούνται κρύσταλλοι και θολρότητα, αναδεύστε ή εφαρμόστε την πιπέτα προς τα πάνω και προς τα κάτω για ανάμειξη μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Φροντίστε να προθερμάνετε το NHB2 πριν από την εφαρμογή της πιπέτας.
- Κατά τον χειρισμό των σφαιριδίων εκκαθάρισης (CB), χρησιμοποιείτε τις ακόλουθες βέλτιστες πρακτικές:
 - Μην καταψύχετε ποτέ τα σφαιρίδια.
 - Αμέσως πριν από τη χρήση, αναδεύστε τα σφαιρίδια μέχρι να επαναιωρηθούν και το χρώμα να γίνει ομοιογενές.
- Κατά τον χειρισμό του μικρού BLT εμπλουτισμού (eBLTS), χρησιμοποιείτε τις ακόλουθες βέλτιστες πρακτικές:
 - Αποθηκεύστε το σωληνάριο eBLTS σε όρθια θέση ώστε τα σφαιρίδια να είναι πάντα βυθισμένα μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα.
 - Αναδεύστε το eBLTS σχολαστικά μέχρι τα σφαιρίδια να επαναιωρηθούν. Για να αποφευχθεί η μετακίνηση των σφαιριδίων, δεν συνιστάται η εκτέλεση φυγοκέντρησης πριν από την εφαρμογή της πιπέτας.
 - Εάν τα σφαιρίδια έχουν προσκολληθεί πλευρικά ή στο επάνω μέρος μιας πλάκας 96 βοθρίων, φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 3 δευτερόλεπτα και, στη συνέχεια, εφαρμόστε την πιπέτα για επανεναιώρηση.
- Κατά τον χειρισμό των πλακών προσαρμογών δείκτη, χρησιμοποιείτε τις ακόλουθες βέλτιστες πρακτικές:

- Μην προσθέτετε δείγματα στην πλάκα προσαρμογών δείκτη.
- Κάθε βοθρίο της πλάκας δεικτών προορίζεται για μία μόνο χρήση.

Εξοπλισμός και υλικά που απαιτούνται, δεν παρέχονται

Εκτός από το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, βεβαιωθείτε ότι έχετε τον εξοπλισμό και τα υλικά που απαιτούνται προτού ξεκινήσετε να εφαρμόζετε το πρωτόκολλο.

Εξοπλισμός

Βεβαιωθείτε ότι έχετε τον απαιτούμενο εξοπλισμό προτού ξεκινήσετε να εφαρμόζετε το πρωτόκολλο.

Το πρωτόκολλο έχει βελτιστοποιηθεί και επικυρωθεί με τη χρήση των στοιχείων με τις αναφερόμενες προδιαγραφές. Δεν διασφαλίζεται η επίτευξη συγκρίσιμης απόδοσης κατά τη χρήση εξοπλισμού που δεν πληρεί τις προδιαγραφές.

Ορισμένα στοιχεία απαιτούνται μόνο για συγκεκριμένες ροές εργασιών. Αυτά τα στοιχεία καθορίζονται σε χωριστούς πίνακες.

- Θερμικός κυκλοποιητής με τις παρακάτω προδιαγραφές:
 - Θερμαινόμενο καπάκι
 - Ελάχιστο εύρος ρύθμισης θερμοκρασίας 10 °C έως 98 °C
 - Ελάχιστη ακρίβεια θερμοκρασίας $\pm 0,25$ °C
 - Μέγιστος όγκος αντίδρασης 100 μl
 - Συμβατός με πλάκες PCR 96 βοθρίων με πλήρη επένδυση
- Συσκευή επώασης μικροδειγμάτων με τις ακόλουθες προδιαγραφές:
 - Εύρος θερμοκρασίας περιβάλλοντος +5,0 °C έως 99,0 °C
 - Συμβατή με πλάκες MIDI 96 βοθρίων
- Ένθετα συσκευής επώασης μικροδειγμάτων συμβατά με πλάκες MIDI 96 βοθρίων
- Αναδευτήρας μικροπλακών υψηλής ταχύτητας με εύρος ταχύτητας ανάμειξης 200–3.000 rpm
- Μαγνητική βάση συμβατή με πλάκες PCR 96 βοθρίων
- Μαγνητική βάση συμβατή με πλάκες MIDI 96 βοθρίων
- Φθορισμόμετρο συμβατό με τη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού σας
- Αναλυτής τμημάτων DNA
- Πιπέτες ακριβείας:
 - Πιπέτες μονού καναλιού και πολλαπλών καναλιών 10 μl
 - Πιπέτες μονού καναλιού και πολλαπλών καναλιών 20 μl

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

- Πιπέτες μονού καναλιού και πολλαπλών καναλιών 200 μl
- Πιπέτες μονού καναλιού 1.000 μl
- Οι πιπέτες ακριβείας εξασφαλίζουν την ακριβή χορήγηση των αντιδραστηρίων και των δειγμάτων. Μπορούν να χρησιμοποιούνται πιπέτες μονού καναλιού και πολλαπλών καναλιών εάν βαθμονομούνται τακτικά και είναι ακριβείς εντός του 5% του αναφερόμενου όγκου.
- Φυγόκεντρος μικροπλακών
- Μικροφυγόκεντρος
- Ένα από τα ακόλουθα συστήματα αλληλούχησης της Illumina:
 - Όργανο MiSeqDx Instrument, αρ. καταλόγου DX-410-1001
 - Όργανο NextSeq 550Dx Instrument, αρ. καταλόγου 20005715
 - Όργανο NovaSeq 6000Dx Instrument, αρ. καταλόγου 20068232
- [Προαιρετικό] Συμπυκνωτής κενού
- [FFPE] Σύστημα ανίχνευσης PCR σε πραγματικό χρόνο

Υλικά

Βεβαιωθείτε ότι έχετε τα υλικά που απαιτούνται προτού ξεκινήσετε να εφαρμόζετε το πρωτόκολλο.

Ορισμένα στοιχεία απαιτούνται μόνο για συγκεκριμένες ροές εργασιών. Αυτά τα στοιχεία καθορίζονται σε χωριστούς πίνακες.

Το πρωτόκολλο έχει βελτιστοποιηθεί και επικυρωθεί με τη χρήση των παρατιθέμενων στοιχείων. Δεν διασφαλίζεται η επίτευξη συγκρίσιμης απόδοσης κατά τη χρήση εναλλακτικών υλικών.

- Άκρα πιπέτας με φίλτρο
- Κωνικά σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης, 15 ml ή 50 ml
- Σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης 1,5 ml
- Δεξαμενές αντιδραστηρίων πολλαπλών καναλιών χωρίς RNase/DNase, μίας χρήσης
- θάδες σωληναρίων χωρίς RNase/DNase και πώματα
- Ορολογικές πιπέτες
- Πλάκα αποθήκευσης βοθρίων μεγάλου βάθους 96 βοθρίων από πολυπροπυλένιο, 0,8 ml (πλάκα MIDI)
- Πλάκες PCR 96 βοθρίων με πλήρη επένδυση και σκληρό περίβλημα
- [FFPE] Πλάκες qPCR συμβατές με όργανο qPCR
- Αυτοκόλλητες στεγανοποιήσεις για πλάκες 96 βοθρίων με τις ακόλουθες προδιαγραφές:
 - Αποκολλούμενες, οπτικά διαφανής πολυεστέρας
 - Κατάλληλες για πλάκες PCR με επένδυση
 - Ισχυρές αυτοκόλλητες στεγανοποιήσεις ανθεκτικές σε πολλαπλές μεταβολές της θερμοκρασίας από -40 °C έως 110 °C

- Χωρίς DNase/RNase
- Πλαστικά αναλώσιμα συμβατά με μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού της επιλογής σας
- Κιτ φθορισμομετρικού ποσοτικού προσδιορισμού dsDNA συμβατό με το επιλεγμένο σύστημα ποσοτικού προσδιορισμού:
 - Για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενισχυμένων βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κιτ ποσοτικού προσδιορισμού με μεγάλο εύρος.
 - Για τον ποσοτικό προσδιορισμό εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών, το εύρος του κιτ ποσοτικού προσδιορισμού εξαρτάται από το πάνελ ανιχνευτών που χρησιμοποιείται.
- Κιτ ανάλυσης τμημάτων για τον ποσοτικό προσδιορισμό βιβλιοθηκών με το επιλεγμένο σύστημα ποσοτικού προσδιορισμού:
 - Για τον ποιοτικό προσδιορισμό ενισχυμένων βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κιτ με μεγάλο εύρος.
 - Για τον ποιοτικό προσδιορισμό εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών, το εύρος του κιτ ποιοτικού προσδιορισμού εξαρτάται από το πάνελ ανιχνευτών που χρησιμοποιείται.
- [Προαιρετικό] Κιτ για εκχύλιση DNA από ανθρώπινα κύτταρα και ιστό. Μπορείτε να χρησιμοποιήσετε οποιαδήποτε επικυρωμένη μέθοδο εκχύλισης.

Συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση δειγμάτων



ΠΡΟΣΟΧΗ

Να χειρίζεστε όλα τα δείγματα ως εάν να περιείχαν δυνητικώς μολυσματικούς παράγοντες.

- Αυτός ο προσδιορισμός είναι συμβατός με γονιδιωματικό DNA που προέρχεται από ανθρώπινα κύτταρα και ιστό.
- Για το καθαρισμένο gDNA που διατίθενται στο εμπόριο, βεβαιωθείτε ότι τα δείγματα έχουν μεταφερθεί υπό σωστές συνθήκες και έχουν αποθηκευτεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολουθείτε τις βέλτιστες πρακτικές για την αποθήκευση και τους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης του gDNA.
- Για υλικό εισόδου ολικού αίματος, τηρείτε τις απαιτήσεις συλλογής, μεταφοράς και αποθήκευσης του αίματος που ισχύουν για τη μέθοδο εκχύλισης DNA της επιλογής σας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε εγκεκριμένη μέθοδος εκχύλισης. Η μεταφορά ολικού αίματος πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τους εθνικούς, ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς και τοπικούς κανονισμούς για τη μεταφορά αιτιολογικών παραγόντων.
- Για την εκχύλιση DNA από ιστό FFPE, μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε εγκεκριμένη μέθοδος εκχύλισης. Ακολουθείτε τις οδηγίες και τις συστάσεις που ισχύουν για τη μέθοδο εκχύλισης της επιλογής σας για τον προσδιορισμό των ακόλουθων πρακτικών:
 - Μέθοδος μονιμοποίησης με φορμαλίνη και εγκλεισμού σε παραφίνη για ιστούς για την εξασφάλιση βέλτιστης ποιότητας του εκχυλισμένου DNA.
 - Αποθήκευση δειγμάτων FFPE.

- Οι απαιτήσεις για το υλικό έναρξης, όπως ο αριθμός και το πάχος των τμημάτων FFPE. Οι περισσότερες μέθοδοι καθαρισμού συνιστούν τη χρήση τμημάτων που κόπηκαν πρόσφατα.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

- Τα αντιδραστήρια του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit περιέχουν δυνητικά επικίνδυνες χημικές ουσίες. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσει τραυματισμό. Φοράτε προστατευτικό εξοπλισμό, συμπεριλαμβανομένου εξοπλισμού προστασίας για τα μάτια, γάντια και εργαστηριακή ποδιά, κατάλληλο για τον κίνδυνο έκθεσης. Τα χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια πρέπει να αντιμετωπίζονται ως χημικά απόβλητα και να απορρίπτονται σύμφωνα με τους ισχύοντες περιφερειακούς, εθνικούς και τοπικούς νόμους και κανονισμούς. Για επιπλέον πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον, την υγεία και την ασφάλεια, ανατρέξτε στα φύλλα δεδομένων ασφαλείας (SDS), στη διεύθυνση support.illumina.com/sds.html.
- Πρέπει να χειρίζεστε όλα τα δείγματα αίματος ως εάν να ήταν γνωστό ότι είναι μολυσματικά για τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), για τον ιό της ηπατίτιδας B (HBV) και άλλους παθογόνους παράγοντες που μεταδίδονται με το αίμα (γενικές προφυλάξεις).
- Χρησιμοποιείτε συνήθεις εργαστηριακές προφυλάξεις. Μη χρησιμοποιείτε το στόμα σας για να αναρροφήσετε υγρά στην πιπέτα. Μην τρώτε, πίνετε ή καπνίζετε σε καθορισμένους χώρους εργασίας. Φοράτε γάντια μίας χρήσης και εργαστηριακή ρόμπα κατά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων των κιτ. Πλένετε τα χέρια σας σχολαστικά μετά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων των κιτ.
- Για την αποτροπή υποβάθμισης των δειγμάτων ή των αντιδραστηρίων, βεβαιωθείτε ότι όλοι οι ατμοί υδροξειδίου του νατρίου από τον καθαρισμό έχουν εξανεμιστεί πριν από την έναρξη του πρωτοκόλλου.
- Η επιμόλυνση των δειγμάτων με άλλα προϊόντα/αμπλικόνια PCR μπορεί να προκαλέσει ανακριβή και αναξιόπιστα αποτελέσματα. Για να αποφεύγεται η επιμόλυνση, χρησιμοποιείτε τις ακόλουθες βέλτιστες πρακτικές:
 - Χρησιμοποιείτε ορθές εργαστηριακές πρακτικές και εφαρμόζετε καλή εργαστηριακή υγιεινή.
 - Εκτελείτε τα βήματα της ροής εργασιών στις καθορισμένες περιοχές πριν από την ενίσχυση ή μετά την ενίσχυση.
 - Αποθηκεύετε τα χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια πριν από την εκκαθάριση των βιβλιοθηκών σε μια περιοχή πριν από την ενίσχυση.
 - Διαχωρίζετε τα αντιδραστήρια πριν από την ενίσχυση από τα αντιδραστήρια μετά την ενίσχυση.
 - Διασφαλίζετε ότι στις περιοχές πριν από την ενίσχυση και μετά την ενίσχυση υπάρχει ειδικός εξοπλισμός, όπως πιπέτες, άκρα πιπετών, αναδευτήρας και φυγόκεντρος.
- Αποτρέπετε την πρόκληση διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Χρησιμοποιείτε νέα άκρα πιπέτας μεταξύ των δειγμάτων και μεταξύ των διανομών αντιδραστηρίων. Η χρήση άκρων με φίλτρο μειώνει τον κίνδυνο μεταφοράς αμπλικονίων και διασταυρούμενης επιμόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων.
 - Κατά την προσθήκη ή τη μεταφορά δειγμάτων ή κύριων δειγμάτων αντιδραστηρίων, αλλάζετε τα άκρα μεταξύ των δειγμάτων.

- Κατά την προσθήκη προσαρμογέων δείκτη με πιπέτα πολλαπλών καναλιών, αλλάζετε τα άκρα μεταξύ των γραμμών ή των στηλών. Εάν χρησιμοποιείτε πιπέτα μονού καναλιού, αλλάζετε τα άκρα μεταξύ των δειγμάτων.
- Αφαιρείτε τις χρησιμοποιημένες πλάκες προσαρμογέων δείκτη από την περιοχή εργασίας.
- Χρησιμοποιήστε τις ακόλουθες βέλτιστες πρακτικές για τα στάδια έκπλυσης με αιθανόλη:
 - Προετοιμάζετε πάντα φρέσκια αιθανόλη 80%. Η αιθανόλη μπορεί να απορροφήσει νερό από τον αέρα, κάτι που μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα.
 - Βεβαιωθείτε ότι έχει αφαιρεθεί όλη η αιθανόλη από το κάτω μέρος των βοθρίων κατά τη διάρκεια των βημάτων έκπλυσης. Τα υπολείμματα αιθανόλης μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.
 - Τηρείτε τον καθορισμένο χρόνο ξήρανσης για τα βήματα στη μαγνητική βάση ώστε να εξασφαλίζεται πλήρης εξάτμιση. Τα υπολείμματα αιθανόλης μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση επόμενων αντιδράσεων.
- Προετοιμάζετε πάντα τα κύρια μείγματα πριν από τη χρήση και μην αποθηκεύετε ποτέ τα συνδυασμένα διαλύματα εργασίας.
- Η απόδοση του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit δεν διασφαλίζεται όταν οι διαδικασίες δεν ακολουθούνται όπως περιγράφεται στο ένθετο συσκευασίας.
- Μην χρησιμοποιείτε τα εξαρτήματα του κιτ πέραν της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του κιτ.
- Μην ανταλλάσσετε εξαρτήματα του κιτ από διαφορετικά κιτ Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Τα κιτ ταυτοποιούνται πάνω στην ετικέτα του κιτ.

Σημειώσεις για τις διαδικασίες

Συστάσεις για το υλικό εισόδου DNA

Το πρωτόκολλο του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι συμβατό με υψηλής ποιότητας υλικό εισόδου γενωμικού DNA (gDNA) διπλής αλυσίδας 50–1.000 ng.

Βεβαιωθείτε ότι το αρχικό δείγμα gDNA δεν περιέχει > 1 mM EDTA και είναι χωρίς οργανικούς επιμολυντές, όπως φαινόλη και αιθανόλη. Οι ουσίες αυτές μπορούν να προκαλέσουν παρεμβολές στην αντίδραση κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών και να οδηγήσουν σε αποτυχία του προσδιορισμού.

Υλικό εισόδου gDNA \geq 50 ng

Για υλικό εισόδου gDNA 50–1.000 ng, δεν απαιτούνται ποσοτικός προσδιορισμός και κανονικοποίηση του αρχικού δείγματος gDNA.

Υλικό εισόδου gDNA < 50 ng

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί υλικό εισόδου DNA 10–50 ng, με τις ακόλουθες προσαρμογές:

- Εάν χρησιμοποιείτε υλικό εισόδου 10–49 ng, συνιστάται ο ποσοτικός προσδιορισμός του αρχικού δείγματος gDNA για τον προσδιορισμό του αριθμού κύκλων PCR που απαιτείται μετά τον κατακερματισμό και την προσθήκη ετικετών. Χρησιμοποιήστε μέθοδο με βάση τη φθορισμομετρία για τον ποσοτικό προσδιορισμό του υλικού εισόδου gDNA διπλής αλυσίδας. Αποφύγετε τη χρήση μεθόδων που μετρούν το ολικό νουκλεϊκό οξύ, όπως η μέθοδος NanoDrop ή άλλες μέθοδοι απορρόφησης UV.
- Αυτό το πρωτόκολλο δεν κανονικοποιεί τις τελικές αποδόσεις βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό από 10–49 ng gDNA και, συνεπώς, απαιτούνται ποσοτικός προσδιορισμός και κανονικοποίηση των βιβλιοθηκών πριν και μετά τον εμπλουτισμό.
- Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit έχει χαρακτηριστεί και επαληθευτεί για υλικό εισόδου DNA 50–1.000 ng. Δεν διασφαλίζεται αντίστοιχη απόδοση προϊόντος για υλικό εισόδου gDNA < 50 ng.

Συστάσεις για το υλικό εισόδου αίματος

Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι συμβατό με gDNA που έχει εξαχθεί από περιφερικό ολικό αίμα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε εγκεκριμένη μέθοδος εκχύλισης. Κατά την εκχύλιση gDNA από ολικό αίμα, δεν απαιτείται αρχικός ποσοτικός προσδιορισμός του υλικού εισόδου DNA και το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit παράγει κανονικοποιημένες αποδόσεις βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό.

Οι ακόλουθοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ποσότητα του DNA που ελήφθη από δείγματα ολικού αίματος και, συνεπώς, την κανονικοποίηση των βιβλιοθηκών:

- Ηλικία δείγματος αίματος
- Συνθήκες αποθήκευσης
- Υποκείμενες ιατρικές παθήσεις που επηρεάζουν τον αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων

Συστάσεις για δείγματα εισόδου ιστού FFPE

Χρησιμοποιήστε τα ακόλουθα κριτήρια ποιότητας DNA από FFPE για να προσδιορίσετε το κατάλληλο υλικό εισόδου για επιτυχή προετοιμασία των βιβλιοθηκών:

- Για δείγματα FFPE με τιμή $\Delta Cq \leq 5$, το συνιστώμενο υλικό εισόδου DNA είναι 50–1.000 ng.
- Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx δεν συνιστάται για δείγματα FFPE κακής ποιότητας με $\Delta Cq > 5$. Η χρήση δειγμάτων με $\Delta Cq > 5$ είναι δυνατή, αλλά ενδέχεται να αυξήσει τις πιθανότητες αποτυχίας προετοιμασίας βιβλιοθήκης ή να μειώσει την απόδοση του προσδιορισμού.

Εκχύλιση από FFPE

Χρησιμοποιήστε μια μέθοδο απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων που παράγει υψηλές αποδόσεις ανάκτησης, ελαχιστοποιεί την κατανάλωση δειγμάτων και διατηρεί την ακεραιότητα των δειγμάτων. Μπορείτε να χρησιμοποιήσετε οποιαδήποτε επικυρωμένη μέθοδο για την εκχύλιση DNA από δείγματα FFPE. Για την εκχύλιση gDNA από ιστό FFPE, απαιτείται αρχικός ποσοτικός προσδιορισμός του υλικού εισόδου DNA και το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit δεν παράγει κανονικοποιημένες αποδόσεις βιβλιοθήκης πριν από τον εμπλουτισμό.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Ποιοτικός προσδιορισμός DNA από FFPE

Το gDNA που έχει εξαχθεί από ιστό FFPE πρέπει να προσδιορίζεται ποιοτικά πριν από τη χρήση. Για βέλτιστη απόδοση, αξιολογήστε την ποιότητα του δείγματος DNA χρησιμοποιώντας μια επικυρωμένη μέθοδο εκχύλισης για τον ποιοτικό προσδιορισμό του DNA που έχει εκχυλιστεί από δείγματα FFPE. Το πρωτόκολλο του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι συμβατό με δείγματα DNA FFPE με τιμή $\Delta Cq \leq 5$. Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit δεν συνιστάται για δείγματα FFPE κακής ποιότητας με $\Delta Cq > 5$. Η χρήση δειγμάτων με $\Delta Cq > 5$ είναι δυνατή, αλλά ενδέχεται να αυξήσει τις πιθανότητες αποτυχίας προετοιμασίας βιβλιοθήκης ή να μειώσει την απόδοση του προσδιορισμού.

[Προαιρετικό] Δείγματα αναφοράς FFPE

Χρησιμοποιείτε χαρακτηρισμένα υλικά αναφοράς, όπως το Horizon HD799 (DNA), ως θετικό μάρτυρα ελέγχου κατά την εκτέλεση του πρωτοκόλλου. Ποιοτικά προσδιορισμένα υλικά FFPE από ξενομοσχεύματα προερχόμενα από κυτταρικές σειρές μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως δείγματα αναφοράς. Χρησιμοποιήστε μια μέθοδο με βάση τη φθορισμομετρία για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υλικών αναφοράς πριν από τη χρήση.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Η εκτέλεση δείγματος αναφοράς θετικού μάρτυρα ελέγχου ή αρνητικού μάρτυρα ελέγχου καταναλώνει αντιδραστήρια και μειώνει τον συνολικό αριθμό άγνωστων δειγμάτων που μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία.

Συστάσεις για το δείγμα εισόδου

Οι συστάσεις για το δείγμα εισόδου για το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 1 Συστάσεις για το δείγμα εισόδου

Τύπος δείγματος εισόδου	Ποσότητα δείγματος εισόδου	Απαιτείται ποσοτικός προσδιορισμός του υλικού εισόδου DNA	Απαιτούμενη ποιότητα υλικού εισόδου DNA	Κανονικοποιημένη απόδοση βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό
gDNA	10–49 ng	Ναι	Λόγος 260/280 1,8–2,0	Όχι
gDNA	50–1.000 ng	Όχι	Λόγος 260/280 1,8–2,0	Ναι
gDNA από αίμα	50–1.000 ng	Όχι	Λόγος 260/280 1,8–2,0	Ναι
gDNA από FFPE	50–1.000 ng	Ναι	Τιμή $\Delta Cq \leq 5$	Όχι

Οι συνιστώμενοι κύκλοι PCR για το πρόγραμμα PCR eBLTS προσαρμόζονται με βάση τη συγκέντρωση και την ποιότητα του δείγματος εισόδου. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα [Ενίσχυση DNA που έχει κατακερματιστεί και επισημανθεί με ετικέτες στη σελίδα 33](#).

Άκρα και τεχνικές

Αποτροπή διασταυρούμενης επιμόλυνσης

- Κατά την προσθήκη ή τη μεταφορά δειγμάτων, αλλάζετε τα άκρα μεταξύ των δειγμάτων.
- Κατά την προσθήκη προσαρμογέων δείκτη με πιπέτα πολλαπλών καναλιών, αλλάζετε τα άκρα μεταξύ των γραμμών ή των στηλών. Εάν χρησιμοποιείτε πιπέτα μονού καναλιού, αλλάζετε τα άκρα μεταξύ των δειγμάτων.

Στεγανοποίηση της πλάκας

- Στεγανοποιείτε πάντα την πλάκα 96 βοθρίων με νέα αυτοκόλλητη στεγανοποίηση χρησιμοποιώντας έναν ελαστικό κύλινδρο για να καλύψετε την πλάκα προτού εκτελέσετε τα ακόλουθα βήματα στο πρωτόκολλο:
 - Βήματα ανάδευσης
 - Βήματα επώασης. Η μη ορθή στεγανοποίηση της πλάκας μπορεί να οδηγήσει σε εξάτμιση κατά τη διάρκεια της επώασης.
 - Βήματα φυγοκέντρησης
 - Βήματα υβριδισμού
- Βεβαιωθείτε ότι τα άκρα και τα βοθρία είναι πλήρως στεγανοποιημένα για να μειωθεί ο κίνδυνος διασταυρούμενης επιμόλυνσης και εξάτμισης.
 - Εάν παρατηρηθεί υγρό ή συμπύκνωμα στη στεγανοποίηση ή στις πλευρές των βοθρίων της πλάκας, φυγοκεντρήστε ανάλογα με τις ανάγκες πριν από την αφαίρεση της στεγανοποίησης.
- Τοποθετήστε την πλάκα σε μια επίπεδη επιφάνεια προτού αφαιρέσετε τη στεγανοποίηση με αργές κινήσεις.

Χειρισμός μικρού BLT εμπλουτισμού (eBLTS)

- Αποθηκεύστε το σωληνάριο αποθέματος eBLTS σε όρθια θέση στο ψυγείο ώστε τα σφαιρίδια να είναι πάντα βυθισμένα μέσα στο ρυθμιστικό διάλυμα.
- Αμέσως πριν από τη χρήση, αναδεύστε σχολαστικά το σωληνάριο αποθέματος eBLTS μέχρι τα σφαιρίδια να επανεναιωρηθούν. Για να αποφευχθεί η μετακίνηση των σφαιριδίων, δεν συνιστάται η εκτέλεση φυγοκέντρησης πριν από την εφαρμογή της πιπέτας.
- Εάν τα σφαιρίδια έχουν προσκολληθεί πλευρικά ή στο επάνω μέρος μιας πλάκας 96 βοθρίων, φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 3 δευτερόλεπτα και, στη συνέχεια, εφαρμόστε την πιπέτα για επανεναιώρηση.
- Κατά την έκπλυση του eBLTS:
 - Χρησιμοποιήστε την κατάλληλη μαγνητική βάση για την πλάκα.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

illumina®

- Διατηρήστε την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση μέχρι να χρειαστεί να την αφαιρέσετε σύμφωνα με τις οδηγίες.
- Εάν τα σφαιρίδια αναρροφηθούν μέσα στα άκρα της πιπέτας, διανείμετε ξανά μέσα στην πλάκα στη μαγνητική βάση και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (2 λεπτά).

Ροή εργασιών Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Το ακόλουθο διάγραμμα απεικονίζει τη ροή εργασιών του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Τα σημεία ασφαλούς διακοπής επισημαίνονται μεταξύ των βημάτων. Οι εκτιμήσεις του χρόνου βασίζονται στην επεξεργασία 12 δειγμάτων σε 12-πλεκτικό εμπλουτισμό.



Οδηγίες χρήσης

Σε αυτό το κεφάλαιο, περιγράφεται το πρωτόκολλο του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Ελέγξτε την προγραμματισμένη πλήρη ροή εργασιών αλληλούχισης, από το δείγμα έως την ανάλυση, ώστε να διασφαλίσετε τη συμβατότητα των προϊόντων και των παραμέτρων πειράματος.
- Προτού προχωρήσετε, επιβεβαιώστε τα περιεχόμενα του κιτ και βεβαιωθείτε ότι έχετε τα απαιτούμενα εξαρτήματα, εξοπλισμό και υλικά.
 - Οι βιοτινυλιωμένοι ανιχνευτές άλλων κατασκευαστών πρέπει να πληρούν ειδικές απαιτήσεις. Ανατρέξτε στην ενότητα [Απαιτήσεις για τα πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού στη σελίδα 12](#), για να βεβαιωθείτε ότι οι ανιχνευτές άλλου κατασκευαστή που διαθέτετε πληρούν τις απαιτήσεις.
- Ακολουθήστε το πρωτόκολλο με τη σειρά που παρουσιάζεται, χρησιμοποιώντας τους καθορισμένους όγκους και παραμέτρους επώασης.
- Εάν δεν προσδιορίζεται σημείο ασφαλούς διακοπής στο πρωτόκολλο, προχωρήστε αμέσως στο επόμενο βήμα.
- Κατά τη δημιουργία κύριου μείγματος, οι παρεχόμενοι όγκοι περιλαμβάνουν επιπλέον ποσότητα.
- Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε την κατάλληλη μαγνητική βάση για τον τύπο πλάκας σας.

Προετοιμασία για ομαδοποίηση

Αυτό το βήμα απαιτείται για την εξασφάλιση επιτυχούς αλληλούχισης των εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών. Η ομαδοποίηση των βιβλιοθηκών μπορεί να πραγματοποιηθεί πριν από τον εμπλουτισμό και πριν από την αλληλούχιση.

Πριν από τον εμπλουτισμό—Οι μεμονωμένες ενισχυμένες βιβλιοθήκες που έχουν υποβληθεί σε ευρετηρίαση ομαδοποιούνται μαζί για εμπλουτισμό με το επιλεγμένο πάνελ ανιχνευτών. Αυτό δημιουργεί μια πολυπλεγμένη ομάδα εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών. Για δείγμα εισόδου FFPE, η επεξεργασία έχει ελεγχθεί και συνιστάται αποκλειστικά για αντιδράσεις 1-πλεκτικού εμπλουτισμού. Για υψηλής ποιότητας gDNA, έχει ελεγχθεί ο 12-πλεκτικός εμπλουτισμός, ωστόσο είναι δυνατός ο 2-πλεκτικός έως 11-πλεκτικός εμπλουτισμός.

Πριν από την αλληλούχιση—Οι βιβλιοθήκες που έχουν υποβληθεί σε 1-πλεκτικό εμπλουτισμό ή/και οι βιβλιοθήκες που έχουν υποβληθεί σε πολυπλεκτικό εμπλουτισμό ομαδοποιούνται πριν από την αλληλούχιση. Ο αριθμός εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών που μπορούν να υποβληθούν σε αλληλούχιση εξαρτάται από το στοχευόμενο βάθος ανάγνωσης για κάθε δείγμα στο σύστημα αλληλούχισής σας.

Μοναδική διπλή ευρετηρίαση

Το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit χρησιμοποιεί μοναδικούς διπλούς δείκτες.

- Οι βιβλιοθήκες με διπλό δείκτη προσθέτουν τις αλληλουχίες δείκτη 1 (i7) και δείκτη 2 (i5) για τη δημιουργία βιβλιοθηκών με μοναδικές ετικέτες.

- Οι UD δείκτες έχουν ξεχωριστές, μη σχετικές αλληλουχίες δείκτη για την ανάγνωση δείκτη i7 και i5. Οι δείκτες έχουν μήκος 10 βάσεων.

Η επιλογή προσαρμογών δείκτη με ποικιλομορφία αλληλουχιών για ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες βελτιστοποιεί την ισορροπία χρώματος για επιτυχή αλληλούχιση και ανάλυση δεδομένων. Οι ομάδες πλεκτικότητας που είναι ≥ 10 -πλεκτικές είναι εγγενώς χρωματικά ισορροπημένες, συνεπώς μπορείτε να χρησιμοποιήσετε οποιονδήποτε συνδυασμό προσαρμογών δείκτη. Κατά την εκτέλεση αλληλούχισης, η μονάδα DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module παρέχει επιλογές για συνδυασμούς δεικτών με χρωματική ισορροπία και σας ειδοποιεί εάν δεν υπάρχει επαρκής ποικιλομορφία στους επιλεγμένους συνδυασμούς δεικτών.

Για πληροφορίες σχετικά με τις αλληλουχίες προσαρμογών UD δεικτών της Illumina και τις διατάξεις πλάκας, ανατρέξτε στο [Παράρτημα: Αλληλουχίες προσαρμογών UD δεικτών της Illumina στη σελίδα 68](#).

Υποστηριζόμενες πλεκτικότητες εμπλουτισμού

Τα αντιδραστήρια του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit έχουν διαμορφωθεί και ελεγχθεί σε 1-πλεκτικό και 12-πλεκτικό εμπλουτισμό. Παρότι είναι δυνατή η χρήση άλλων πλεκτικότητας εμπλουτισμού, ορισμένες πλεκτικότητες απαιτούν πρόσθετα αντιδραστήρια προετοιμασίας βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό και πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού.

Για την επίτευξη κατάλληλης απόδοσης εμπλουτισμού για μη τυπική πλεκτικότητα εμπλουτισμού, μπορεί να απαιτείται πρόσθετη βελτιστοποίηση. Δεν διασφαλίζεται η επίτευξη βέλτιστων αποτελεσμάτων.

- **Πλεκτικότητα εμπλουτισμού**– Ο αριθμός των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό (1–12) που ομαδοποιούνται μαζί σε μία αντίδραση εμπλουτισμού για υβριδισμό με τα πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού. Για παράδειγμα, ο συνδυασμός 12 βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό μαζί δημιουργεί μια ομάδα 12-πλεκτικού εμπλουτισμού.
- **Αντίδραση εμπλουτισμού**– Ο αριθμός των μοναδικών παρασκευασμάτων αντιδράσεων εμπλουτισμού, ανεξάρτητα από τον αριθμό των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό που ομαδοποιούνται ανά αντίδραση. Για παράδειγμα, μία αντίδραση εμπλουτισμού μπορεί να παραγάγει μια ομάδα 1-πλεκτικού ή 12-πλεκτικού εμπλουτισμού.

Για να υπολογίσετε τον συνολικό αριθμό βιβλιοθηκών μετά τον εμπλουτισμό, πολλαπλασιάστε την πλεκτικότητα εμπλουτισμού ανά αντίδραση με τον αριθμό των αντιδράσεων εμπλουτισμού. Για παράδειγμα, μία αντίδραση εμπλουτισμού μιας ομάδας 12-πλεκτικού εμπλουτισμού παράγει μια ομάδα 12 βιβλιοθηκών μετά τον εμπλουτισμό.

Κατά την ομαδοποίηση βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό, τα αντιδραστήρια του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit υποστηρίζουν τις ακόλουθες αντιδράσεις και πλεκτικότητα εμπλουτισμού.

Αντιδραστήρια του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Αντιδράσεις εμπλουτισμού	Πλεκτικότητα εμπλουτισμού
Κιτ 16 δειγμάτων	16 αντιδράσεις	1-πλεκτικός
Κιτ 96 δειγμάτων	8 αντιδράσεις	12-πλεκτικός

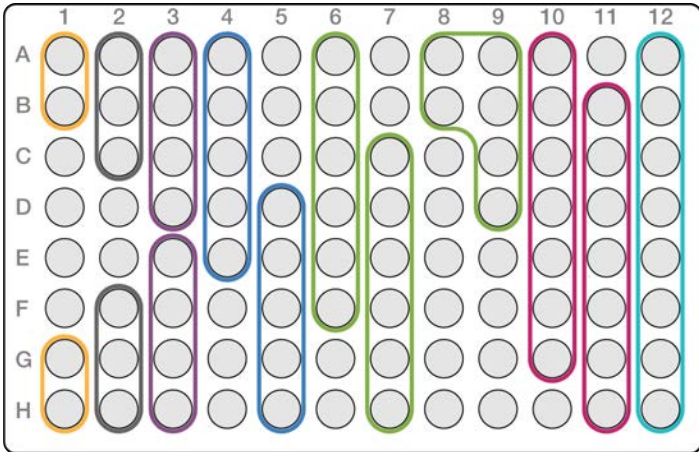
Στρατηγικές 2-πλεκτικής έως 8-πλεκτικής ομαδοποίησης

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται προσαρμογείς δεικτών (βοθρία) που μπορούν να συνδυαστούν σε 2-8-πλεκτική ομάδα, ενώ στο διάγραμμα με χρωματική κωδικοποίηση απεικονίζεται κάθε συνδυασμός.

Ομαδοποιήστε οποιαδήποτε πλεκτικότητα ≥ 2 από το επάνω ή το κάτω μέρος μιας στήλης. Μην εκτελέσετε ομαδοποίηση σε μια γραμμή.

Πλεκτικότητα	Συνδυασμοί	Χρώμα στο διάγραμμα
2	Τα δύο πρώτα ή τα δύο τελευταία βοθρία σε μια στήλη: <ul style="list-style-type: none">• A και B• G και H Οι γραμμές C-F δεν χρησιμοποιούνται.	Πορτοκαλί
3	Τα τρία πρώτα ή τα τρία τελευταία βοθρία σε μια στήλη: <ul style="list-style-type: none">• A-C• F-H Οι γραμμές D και E δεν χρησιμοποιούνται.	Γκρι
4	Τα τέσσερα πρώτα ή τα τέσσερα τελευταία βοθρία σε μια στήλη: <ul style="list-style-type: none">• A-D• E-H	Μοβ
5	Τα πέντε πρώτα ή τα πέντε τελευταία βοθρία σε μια στήλη: <ul style="list-style-type: none">• A-E• D-H	Μπλε
6	[Επιλογή 1] Τα έξι πρώτα ή τα έξι τελευταία βοθρία σε μια στήλη: <ul style="list-style-type: none">• A-F• C-H [Επιλογή 2] Τα δύο πρώτα βοθρία (A και B) ή τα δύο τελευταία βοθρία (G και H) σε μία στήλη και οποιαδήποτε τέσσερα βοθρία σε μια παρακείμενη στήλη.	Πράσινο

Πλεκτικότητα	Συνδυασμοί	Χρώμα στο διάγραμμα
7	Τα επτά πρώτα ή τα επτά τελευταία βοθρία σε μια στήλη: <ul style="list-style-type: none"> • A-G • B-H 	Ροζ
8	Ολόκληρη η στήλη.	Γαλαζοπράσινο

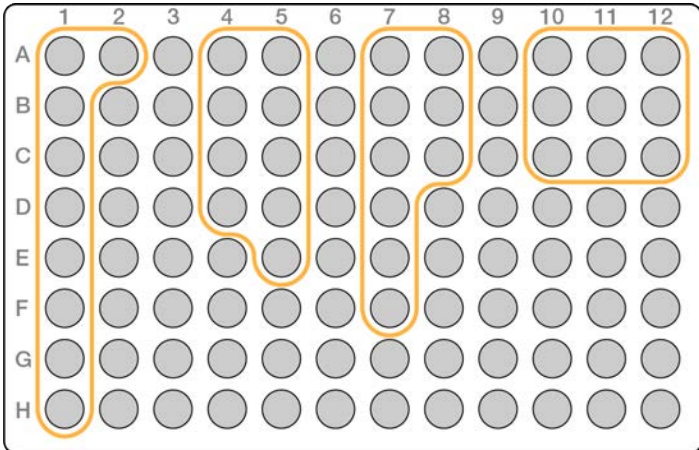


Στρατηγικές εννια-πλεκτικής ομαδοποίησης

Χρησιμοποιήστε προσαρμογείς δεικτών από οποιαδήποτε βοθρία που βελτιστοποιούν την ισορροπία χρώματος σε μια εκτέλεση αλληλούχησης, για παράδειγμα:

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

Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται και τα τέσσερα παραδείγματα.



Κατακερματισμός και προσθήκη ετικετών σε γονιδιωματικό DNA

Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται το μικρό BLT εμπλουτισμού (eBLTS) για τον κατακερματισμό του DNA και την προσθήκη ετικετών σε αυτό, διαδικασία κατά την οποία το DNA κατακερματίζεται και προστίθενται σε αυτό ετικέτες αλληλουχιών προσαρμογών.

Αναλώσιμα

- eBLTS (μικρό BLT εμπλουτισμού) (κίτρινο πώμα)
- TB1 (Ρυθμιστικό διάλυμα κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών 1)
- Νερό χωρίς νουκλεάσες
- Πλάκα PCR 96 βοθρίων
- Αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό
- Σωληνάκια μικροφυγοκέντρωσης 1,7 ml
- 8άδα σωληναρίων
- Άκρα πιπέτας
 - Πιπέτες πολλαπλών καναλιών 200 μl



ΠΡΟΣΟΧΗ

Το συγκεκριμένο σετ αντιδραστηρίων περιέχει δυνητικά επικίνδυνες χημικές ουσίες. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσει τραυματισμό. Φοράτε προστατευτικό εξοπλισμό, συμπεριλαμβανομένου εξοπλισμού προστασίας για τα μάτια, γάντια και εργαστηριακή ποδιά, κατάλληλο για τον κίνδυνο έκθεσης. Τα χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια πρέπει να αντιμετωπίζονται ως χημικά απόβλητα και να απορρίπτονται σύμφωνα με τους ισχύοντες περιφερειακούς, εθνικούς και τοπικούς νόμους και κανονισμούς. Για επιπλέον πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον, την υγεία και την ασφάλεια, ανατρέξτε στα φύλλα δεδομένων ασφαλείας (SDS), στη διεύθυνση support.illumina.com/sds.html.

Σχετικά με τα αντιδραστήρια

- Το eBLTS πρέπει να αποθηκεύεται σε θερμοκρασίες 2 °C έως 8 °C. Μην χρησιμοποιείτε eBLTS που έχει αποθηκευτεί σε θερμοκρασία κάτω από 2 °C.
- Μην υποβάλλετε σε φυγοκέντρηση το eBLTS.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αναλώσιμα:

Αντικείμενο	Αποθήκευση	Οδηγίες
eBLTS (κίτρινο πώμα)	2 °C έως 8 °C	Αφήστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε αμέσως πριν από τη χρήση για ανάμειξη. Μην φυγοκεντρήσετε προτού εφαρμόσετε την πιπέτα.
TB1	-25 °C έως -15 °C	Αφήστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη.

2. Αναδεύστε ή εφαρμόστε DNA με πιπέτα και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
3. Αποθηκεύστε το ακόλουθο πρόγραμμα TAG στον θερμικό κυκλοποιητή:
 - Επιλέξτε την επιλογή προθερμασμένου καπακιού και ορίστε τη θερμοκρασία στους 100 °C
 - Ορίστε τον όγκο αντίδρασης σε 50 μl
 - 55 °C για 5 λεπτά
 - Διατηρήστε στους 10 °C

Διαδικασία

1. Προσθέστε 2–30 μl DNA σε κάθε βοθρίο μιας πλάκας PCR 96 βοθρίων ώστε η συνολική ποσότητα υλικού εισόδου να είναι 50–1.000 ng.
Εάν ο όγκος DNA είναι < 30 μl, προσθέστε νερό χωρίς νουκλεάσες στα δείγματα DNA για να επιτύχετε συνολικό όγκο 30 μl.
2. Αναδεύστε το eBLTS σχολαστικά μέχρι τα σφαιρίδια να επανεναιωρηθούν πλήρως.
3. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους σε ένα σωληνάριο για την προετοιμασία του κύριου μείγματος κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών. Πολλαπλασιάστε κάθε όγκο με τον αριθμό των δειγμάτων που υποβάλλονται σε επεξεργασία.
 - eBLTS (11,5 μl)
 - TB1 (11,5 μl)Ο όγκος περιλαμβάνει επιπλέον ποσότητα αντιδραστηρίων.
4. Εφαρμόστε σχολαστικά την πιπέτα στο κύριο μείγμα κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών για ανάμειξη.
5. Χωρίστε τον όγκο του κύριου μείγματος προσθήκης ετικετών ισότοπα σε μια θάδα σωληναρίων.
6. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα πολλαπλών καναλιών των 200 μl, μεταφέρετε 20 μl κύριου μείγματος κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών σε κάθε βοθρίο της πλάκας PCR που περιέχει ένα δείγμα. Χρησιμοποιείτε νέα άκρα για κάθε στήλη ή γραμμή δείγματος.
7. Απορρίψτε την θάδα σωληναρίων μετά τη διανομή του κύριου μείγματος προσθήκης ετικετών.
8. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα πολλαπλών καναλιών των 200 μl την οποία έχετε ρυθμίσει στα 40 μl, εφαρμόστε σε κάθε δείγμα 10 φορές για ανάμειξη. Χρησιμοποιείτε νέα άκρα για κάθε στήλη δείγματος. Εναλλακτικά, στεγανοποιήστε την πλάκα PCR και χρησιμοποιήστε έναν αναδευτήρα πλακών σε ταχύτητα 1.600 rpm για 1 λεπτό.
9. Στεγανοποιήστε την πλάκα και, στη συνέχεια, τοποθετήστε πάνω στον εκ των προτέρων προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα TAG.
10. Περιμένετε έως ότου το πρόγραμμα επισήμανσης TAG φτάσει στους 10 °C ως θερμοκρασία διατήρησης και, στη συνέχεια, αφαιρέστε αμέσως την πλάκα.
11. Αφήστε την πλάκα PCR 96 βοθρίων να σταθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά και, στη συνέχεια, προχωρήστε στο επόμενο βήμα.

Εκκαθάριση μετά τον κατακερματισμό και την προσθήκη ετικετών

Σε αυτό το βήμα εκτελείται έκπλυση του DNA με ετικέτα προσαρμογέα στο eBLTS πριν από την ενίσχυση PCR.

Αναλώσιμα

- ST2 (Ρυθμιστικό διάλυμα διακοπής κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών 2)

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

- TWB2 (Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών 2)
- Μαγνητική βάση πλάκας PCR 96 βοθρίων
- Αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό
- θάδα σωληναρίων
- Άκρα πιπέτας
 - Πιπέτες πολλαπλών καναλιών 20 μl
 - Πιπέτες πολλαπλών καναλιών 200 μl
- Προετοιμάστε για μεταγενέστερη διαδικασία:
 - EPM (Ενισχυμένο μείγμα PCR)
 - Πλάκα προσαρμογέων δείκτη

Σχετικά με τα αντιδραστήρια

- Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε την κατάλληλη μαγνητική βάση για την πλάκα σας. Η χρήση μαγνητικής βάσης πλάκας MIDI για πλάκα PCR θα μπορούσε να εμποδίσει την προσκόλληση του TWB2 στα σφαιρίδια.
- Εφαρμόστε αργά με πιπέτα το TWB2 για να ελαχιστοποιήσετε τη δημιουργία αφρού, ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο αναρρόφησης εσφαλμένου όγκου και ατελούς ανάμειξης.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αναλώσιμα:

Αντικείμενο	Αποθήκευση	Οδηγίες
EPM	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε πάγο για 1 ώρα. Αναστρέψτε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
ST2	15 °C έως 30 °C	Εάν παρατηρούνται ιζήματα, θερμάνετε στους 37 °C για 10 λεπτά και, στη συνέχεια, αναδεύστε μέχρι να διαλυθούν τα ιζήματα. Χρησιμοποιήστε σε θερμοκρασία δωματίου.
TWB2	15 °C έως 30 °C	Χρησιμοποιήστε σε θερμοκρασία δωματίου.
Πλάκα προσαρμογέων δείκτη	-25 °C έως -15 °C	Αφήστε να αποψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

Διαδικασία

1. Προσθέστε 10 μl ST2 σε κάθε αντίδραση κατακερματισμού και προσθήκης ετικετών. Εάν χρησιμοποιείτε πιπέτα πολλαπλών καναλιών, εφαρμόστε με πιπέτα το ST2 σε μια θάδα σωληναρίων και, στη συνέχεια, μεταφέρετε τους κατάλληλους όγκους στην πλάκα PCR. Χρησιμοποιείτε νέα άκρα για κάθε στήλη ή γραμμή δείγματος.

2. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα των 200 μl που έχει ρυθμιστεί στα 50 μl, εφαρμόστε αργά την πιπέτα σε κάθε βοθρίο 10 φορές για επανεναιώρηση των σφαιριδίων.
Εναλλακτικά, στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.600 rpm για 1 λεπτό. Επαναλάβετε ανάλογα με τις ανάγκες.
3. Στεγανοποιήστε την πλάκα και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 10 δευτερόλεπτα.
4. Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
5. Τοποθετήστε σε μια μαγνητική βάση πλάκας PCR και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (3 λεπτά).
6. [\leq 48 δείγματα] Εκπλύνετε τρεις φορές ως εξής.
 - a. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα πολλαπλών καναλιών των 200 μl που έχετε ρυθμίσει στα 60 μl, αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.
 - b. Αφαιρέστε από τη μαγνητική βάση.
 - c. Αμέσως μετά, προσθέστε αργά 100 μl TWB2 απευθείας πάνω στα σφαιρίδια.
 - d. Εφαρμόστε την πιπέτα αργά μέχρι τα σφαιρίδια να επαναιωρηθούν πλήρως. Εναλλακτικά, στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.600 rpm για 1 λεπτό.
 - e. Εάν προκύψει εκτίναξη, επιβραδύνετε στα 280 × g για 10 δευτερόλεπτα.
 - f. Τοποθετήστε σε μια μαγνητική βάση πλάκας PCR και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (3 λεπτά).
Αφήστε την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση και το TWB2 μέσα στα βοθρία, ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο υπερβολικής ξήρανσης κατά την εκτέλεση της τρίτης πλύσης. Αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό αφού προετοιμάσετε το κύριο μείγμα PCR.
 - g. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα πολλαπλών καναλιών των 200 μl που έχετε ρυθμίσει στα 100 μl, αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό.
 - h. Επαναλάβετε τα βήματα γ–στ δύο φορές για συνολικά τρεις εκπλύσεις.
7. [$>$ 48 δείγματα] Εκπλύνετε τρεις φορές ως εξής.
 - a. Εκτελέστε τα βήματα β και γ σε βήματα 1 στήλης και 2 στηλών μέχρι όλες οι στήλες να υποβληθούν σε επεξεργασία ώστε να αποτραπεί το ενδεχόμενο υπερβολικής ξήρανσης.
 - b. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα πολλαπλών καναλιών των 200 μl που έχετε ρυθμίσει στα 60 μl, αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό.
 - c. Αφαιρέστε από τη μαγνητική βάση.
 - d. Αμέσως μετά, διανείμετε αργά 100 μl TWB2 απευθείας πάνω στα σφαιρίδια.
 - e. Εφαρμόστε την πιπέτα αργά μέχρι τα σφαιρίδια να επαναιωρηθούν πλήρως. Εναλλακτικά, στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.600 rpm για 1 λεπτό.
 - f. Εάν προκύψει εκτίναξη, επιβραδύνετε στα 280 × g για 10 δευτερόλεπτα.
 - g. Τοποθετήστε σε μια μαγνητική βάση πλάκας PCR και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (3 λεπτά).
Αφήστε την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση και το TWB2 μέσα στα βοθρία, ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο υπερβολικής ξήρανσης κατά την εκτέλεση της τρίτης πλύσης. Αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό αφού προετοιμάσετε το κύριο μείγμα PCR.

- h. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα πολλαπλών καναλιών των 200 μl που έχετε ρυθμίσει στα 100 μl, αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό.
 - i. Αφαιρέστε από τη μαγνητική βάση και προσθέστε αργά 100 μl TWB2 απευθείας πάνω στα σφαιρίδια.
 - j. Επαναλάβετε τα βήματα η και θ σε βήματα της 1 στήλης ή 2 στηλών μέχρι όλες οι στήλες να υποβληθούν σε επεξεργασία.
 - k. Επαναλάβετε τα βήματα ε-η δύο φορές για συνολικά τρεις εκπλύσεις.
8. Διατηρήστε πάνω στη μαγνητική βάση μέχρι το βήμα 4 της ενότητας *Διαδικασία στην Ενίσχυση DNA που έχει κατακερματιστεί και επισημανθεί με ετικέτες*.
Το TWB2 παραμένει στα βοθρία ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο υπερβολικής ξήρανσης των σφαιριδίων.

Ενίσχυση DNA που έχει κατακερματιστεί και επισημανθεί με ετικέτες

Σε αυτό το βήμα ενισχύεται το DNA που έχει κατακερματιστεί και επισημανθεί με ετικέτες με τη χρήση ενός προγράμματος PCR περιορισμένου κύκλου. Το βήμα της PCR προσθέτει προσαρμογείς δεικτών 1 (i7), προσαρμογείς δεικτών 2 (i5) και αλληλουχίες που απαιτούνται για την αλληλούχιση και τη δημιουργία συστάδων.

Αναλώσιμα

- EPM (Ενισχυμένο μείγμα PCR)
- Πλάκα προσαρμογέων δείκτη
- Πλάκα PCR 96 βοθρίων
- Νερό χωρίς νουκλεάσες
- Αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό
- Σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης 1,5 ml
- Άκρα πιπέτας
 - Πιπέτες πολλαπλών καναλιών 20 μl
 - Πιπέτες πολλαπλών καναλιών 200 μl

Σχετικά με τα αντιδραστήρια

- Πλάκες προσαρμογέων δείκτη
 - Ένα βοθρίο μπορεί να περιέχει > 10 μl προσαρμογέων δείκτη.
 - Μην προσθέτετε δείγματα στην πλάκα προσαρμογέων δείκτη.
 - Κάθε βοθρίο της πλάκας δεικτών προορίζεται για μία μόνο χρήση.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αναλώσιμα:

Αντικείμενο	Αποθήκευση	Οδηγίες
EPM	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε στους 4 °C ή σε πάγο για 1 ώρα. Αναστρέψτε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
Πλάκα προσαρμογέων δείκτη	-25 °C έως -15 °C	Αφήστε να αποψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

2. Αποθηκεύστε το ακόλουθο πρόγραμμα PCR eBLTS σε έναν θερμικό κυκλοποιητή χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο αριθμό κύκλων PCR που αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα.

- Επιλέξτε την επιλογή προθερμασμένου καπακιού και ορίστε τη θερμοκρασία στους 100 °C
- Ορίστε τον όγκο αντίδρασης σε 50 μl
- 72 °C για 3 λεπτά
- 98 °C για 3 λεπτά
- Χ κύκλοι:
 - 98 °C για 20 δευτερόλεπτα
 - 60 °C για 30 δευτερόλεπτα
 - 72 °C για 1 λεπτό
- 72 °C για 3 λεπτά
- Διατηρήστε στους 10 °C

Ο συνολικός χρόνος εκτέλεσης είναι ~38 λεπτά για 9 κύκλους και ~46 λεπτά για 12 κύκλους.

Τύπος δείγματος εισόδου	Αριθμός κύκλων PCR (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1.000 ng gDNA	9
50–1.000 ng gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE	12
gDNA που έχει εξαχθεί από αίμα	9

Διαδικασία

1. Συνδυάστε τα ακόλουθα για την προετοιμασία του κύριου μείγματος PCR. Πολλαπλασιάστε κάθε όγκο με τον αριθμό των δειγμάτων που υποβάλλονται σε επεξεργασία.
 - EPM (23 μl)
 - Νερό χωρίς νουκλεάσες (23 μl)Ο όγκος περιλαμβάνει επιπλέον ποσότητα αντιδραστηρίων.
2. Εφαρμόστε την πιπέτα στο κύριο μείγμα PCR 10 φορές για να το αναμείξετε και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
3. Με την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση, χρησιμοποιήστε μια πιπέτα πολλαπλών καναλιών των 200 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε το TWB2.
Ο αφρός που παραμένει στα τοιχώματα των βοθρίων δεν επηρεάζει δυσμενώς τη βιβλιοθήκη.
4. Αφαιρέστε από τη μαγνητική βάση.
5. Προσθέστε αμέσως 40 μl κύριου μείγματος PCR απευθείας πάνω στα σφαιρίδια σε κάθε βοθρίο.
6. Εφαρμόστε αμέσως την πιπέτα για ανάμειξη μέχρι τα σφαιρίδια να επαναιωρηθούν πλήρως. Εναλλακτικά, στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.600 rpm για 1 λεπτό.
7. Στεγανοποιήστε την πλάκα δείγματος και φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 10 δευτερόλεπτα.
8. Φυγοκεντρήστε την πλάκα προσαρμογών δείκτη στα 1.000 × g για 1 λεπτό.
9. Προετοιμάστε την πλάκα προσαρμογών δείκτη.
 - [< 96 δείγματα] Τρυπήστε τη στεγανοποίηση αλουμινίου πάνω στην πλάκα προσαρμογών δείκτη με ένα νέο άκρο πιπέτας για κάθε βοθρίο μόνο για τον αριθμό των δειγμάτων που υποβάλλονται σε επεξεργασία.
 - [96 δείγματα] Ευθυγραμμίστε μια νέα κατά το ήμισυ επενδεδυμένη πλάκα PCR πάνω από την πλάκα προσαρμογών δείκτη και πιέστε προς τα κάτω για να τρυπήσετε τη στεγανοποίηση αλουμινίου. Απορρίψτε την πλάκα PCR που χρησιμοποιήσατε για να τρυπήσετε τη στεγανοποίηση αλουμινίου.
10. Χρησιμοποιώντας ένα νέο άκρο πιπέτας, προσθέστε 10 μl προσυζευγμένων προσαρμογών δείκτη σε κάθε βοθρίο.
11. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα που έχετε ρυθμίσει στα 40 μl, εφαρμόστε την πιπέτα 10 φορές για ανάμειξη. Εναλλακτικά, στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.600 rpm για 1 λεπτό.
12. Στεγανοποιήστε την πλάκα και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 10 δευτερόλεπτα.
13. Τοποθετήστε την πλάκα πάνω στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα PCR eBLTS.

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, αποθηκεύστε στους $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ για έως 30 ημέρες.

Εκκαθάριση βιβλιοθηκών

Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται διαδικασία καθαρισμού με σφαιρίδια διπλής όψης για τον καθαρισμό των ενισχυμένων βιβλιοθηκών.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Αναλώσιμα

- CB (Σφαιρίδια εκκαθάρισης)
- RSB (Ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης)
- Φρέσκια αιθανόλη 80% (EtOH)
- Πλάκα αποθήκευσης βοθρίων μεγάλου βάθους 96 βοθρίων των 0,8 ml από πολυπροπυλένιο (πλάκα MIDI)
- Πλάκα PCR 96 βοθρίων
- Μαγνητική βάση πλάκας MIDI
- Μαγνητική βάση πλάκας PCR
- Σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης 1,5 ml
- Νερό χωρίς νουκλεάσες

Σχετικά με τα αντιδραστήρια

- Σφαιρίδια εκκαθάρισης
 - Αναδεύστε πριν από κάθε χρήση.
 - Αναδεύετε συχνά για να βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια είναι ομοιόμορφα κατανομημένα.
 - Εκτελέστε αναρρόφηση και διανείμετε αργά λόγω του ιξώδους του διαλύματος.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αναλώσιμα:

Αντικείμενο	Αποθήκευση	Οδηγίες
CB	Θερμοκρασία δωματίου	Αναδεύστε και αναστρέψτε για ανάμειξη μέχρι το χρώμα του υγρού να γίνει ομοιογενές.
RSB	2 °C έως 8 °C	Αποψύξτε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη.

Διαδικασία

1. Αναδεύστε την πλάκα PCR 96 βοθρίων στα 1.800 rpm για 1 λεπτό και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
2. Τοποθετήστε σε μια μαγνητική βάση πλάκας PCR και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (1 λεπτό).
3. Αναδεύστε τα CB 3 φορές για 10 λεπτά και, στη συνέχεια, αναστρέψτε πολλές φορές για επανεναιώρηση.
4. Για υψηλής ποιότητας gDNA, ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα.
 - a. Προσθέστε 77 μl νερού χωρίς νουκλεάσες σε κάθε βοθρίο μιας νέας πλάκας MIDI.
 - b. Προσθέστε 88 μl CB σε κάθε βοθρίο της πλάκας MIDI.
 - c. Μεταφέρετε 45 μl υπερκείμενου υγρού από κάθε βοθρίο της πλάκας PCR στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας MIDI.

- d. Απορρίψτε την πλάκα PCR.
 - e. Εφαρμόστε την πιπέτα σε κάθε βοθρίο 10 φορές για ανάμειξη. Εναλλακτικά, στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.800 rpm για 1 λεπτό.
 - f. Στεγανοποιήστε την πλάκα και επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
 - g. Ελέγξτε για φυσαλίδες αέρα. Εάν υπάρχουν, επιβραδύνετε.
 - h. Τοποθετήστε στη μαγνητική βάση πλάκας MIDI και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (5 λεπτά).
 - i. Κατά τη διάρκεια της επώασης, αναδεύστε καλά τα CB και, στη συνέχεια, προσθέστε 20 µl σε κάθε βοθρίο μιας νέας πλάκας MIDI.
 - j. Μεταφέρετε 200 µl υπερκείμενου υγρού από κάθε βοθρίο της πρώτης πλάκας MIDI στο αντίστοιχο βοθρίο της νέας πλάκας MIDI (που περιέχει 20 µl CB).
 - k. Απορρίψτε την πρώτη πλάκα MIDI.
 - l. Εφαρμόστε την πιπέτα σε κάθε βοθρίο της νέας πλάκας MIDI 10 φορές για ανάμειξη. Εναλλακτικά, στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.800 rpm για 1 λεπτό.
5. Για εξαχθέν FFPE, ακολουθήστε τα παρακάτω βήματα.
- a. Προσθέστε 81 µl CB σε κάθε βοθρίο μιας νέας πλάκας MIDI.
 - b. Μεταφέρετε 45 µl υπερκείμενου υγρού από κάθε βοθρίο της πλάκας PCR στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας MIDI.
 - c. Απορρίψτε την πλάκα PCR.
 - d. Εφαρμόστε την πιπέτα σε κάθε βοθρίο 10 φορές για ανάμειξη. Εναλλακτικά, στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.800 rpm για 1 λεπτό.
6. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
7. Ελέγξτε για φυσαλίδες αέρα. Εάν υπάρχουν, επιβραδύνετε.
8. Τοποθετήστε στη μαγνητική βάση πλάκας MIDI και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (5 λεπτά).
9. Χωρίς να διαταράξετε τα σφαιρίδια, αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό.
10. Εκπλύνετε τα σφαιρίδια ως εξής.
- a. Με την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση, προσθέστε 200 µl φρέσκια EtOH 80% χωρίς να αναμείξετε.
 - b. Επωάστε για 30 δευτερόλεπτα.
 - c. Χωρίς να διαταράξετε τα σφαιρίδια, αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό.
11. Εκπλύνετε τα σφαιρίδια μια **δεύτερη** φορά.
12. Αφήστε να στεγνώσουν στον αέρα πάνω στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
13. Ενώ στεγνώνετε με αέρα, χρησιμοποιήστε μια πιπέτα των 20 µl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε το υπόλειμμα EtOH.
14. Αφαιρέστε από τη μαγνητική βάση.
15. Προσθέστε 17 µl RSB στα σφαιρίδια.
16. Στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.800 rpm για 2 λεπτά.
17. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.

18. Ελέγξτε για φυσαλίδες αέρα. Εάν υπάρχουν, επιβραδύνετε.
19. Τοποθετήστε την πλάκα στη μαγνητική βάση πλάκας MIDI και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (2 λεπτά).
20. Μεταφέρετε 15 μl υπερκείμενου υγρού σε μια νέα πλάκα PCR 96 βοθρίων.

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα και αποθηκεύστε στους -25 °C έως -15 °C για έως 30 ημέρες.

Ομαδοποίηση βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό

Σε αυτό το βήμα συνδυάζονται βιβλιοθήκες DNA με μοναδικούς δείκτες σε μία ομάδα με έως και 12 βιβλιοθήκες.

Μέθοδοι ομαδοποίησης

Μπορείτε να ομαδοποιήσετε κατ' όγκο ή κατά μάζα. Χρησιμοποιήστε τον ακόλουθο πίνακα για να προσδιορίσετε την κατάλληλη μέθοδο για το υλικό εισόδου σας.

Πίνακας 2 Συνιστώμενες μέθοδοι ομαδοποίησης

Δείγμα εισόδου	Μέθοδος ομαδοποίησης
10–49 ng gDNA	Μάζα
50–1.000 ng gDNA	Όγκος
gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE	Μάζα
gDNA που έχει εξαχθεί από αίμα	Όγκος

- Για τον μονοπλεκτικό εμπλουτισμό, δεν απαιτείται ομαδοποίηση των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό. Ωστόσο, η προσθήκη RSB μπορεί να είναι απαραίτητη.
- Μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό, όλοι οι τύποι δειγμάτων εισόδου μπορούν να ομαδοποιηθούν κατά μάζα ώστε να επιτευχθεί βέλτιστη ισορροπία δείκτη.
- Η τελική απόδοση των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό που δημιουργούνται σε χωριστά πειραματικά παρασκευάσματα μπορεί να ποικίλλει. Συνεπώς, συνιστάται η ομαδοποίηση κατά μάζα ώστε να επιτευχθεί βέλτιστη ισορροπία δείκτη.
- Χρησιμοποιήστε 1-πλεκτικό εμπλουτισμό για τις ακόλουθες περιπτώσεις.
 - 10–49 ng gDNA
 - 50–1.000 ng gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE
 - Ανίχνευση χαμηλής συχνότητας υπολειπόμενου αλληλομόρφου για αντιστοίχιση σωματικής παραλλαγής.

Ομαδοποίηση κατά μάζα

Για τις ακόλουθες περιπτώσεις, προσδιορίστε ποσοτικά τις βιβλιοθήκες για να χρησιμοποιήσετε μια μάζα DNA ανά βιβλιοθήκη για εμπλουτισμό που καθορίζεται στην ενότητα [Ομαδοποίηση βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό σε ίση συγκέντρωση στη σελίδα 39](#).

- Δείγμα εισόδου gDNA 10–49 ng
- Δείγμα εισόδου gDNA που εξήχθη από FFPE 50–1.000 ng
- Ανίχνευση χαμηλής συχνότητας υπολειπόμενου αλληλομόρφου για αντιστοίχιση σωματικής παραλλαγής
- gDNA που εξήχθη από αίμα για βέλτιστη ισορροπία δείκτη

Ποσοτικός προσδιορισμός βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό

1. Εκτελέστε 1 μl των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού με βάση τον φθορισμό της προτίμησής σας η οποία χρησιμοποιεί χρωστική που παρεμβάλλεται στο dsDNA.
 - Για 50–1.000 ng υψηλής ποιότητας gDNA, να αναμένετε απόδοση βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό \geq 500 ng.
 - Για 50–1000 ng gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE, να αναμένετε απόδοση βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό 500–6.000 ng, ανάλογα με την ποιότητα του αρχικού δείγματος.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Για μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού με διαφορετικές μεροληψίες, προσδιορίστε τη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού για αυτήν τη ροή εργασιών. Τα αποτελέσματα συγκέντρωσης μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο.

Ομαδοποίηση βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό σε ίση συγκέντρωση

Χρησιμοποιήστε τον ακόλουθο πίνακα για να προσδιορίσετε την απαιτούμενη μάζα DNA ανά βιβλιοθήκη για τον εμπλουτισμό, ανάλογα με τον τύπο δείγματος και την πλεκτικότητα εμπλουτισμού. Δεν διασφαλίζεται η επίτευξη βέλτιστων αποδόσεων εμπλουτισμού και απόδοσης προσδιορισμού κατά τη χρήση χαμηλότερων αποδόσεων βιβλιοθήκης πριν από τον εμπλουτισμό από τις συνιστώμενες.

Η συνολική μάζα DNA στην αντίδραση εμπλουτισμού δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 6.000 ng.

Δείγμα εισόδου	Πλεκτικότητα εμπλουτισμού	Μάζα DNA ανά βιβλιοθήκη (ng)	Συνολική μάζα βιβλιοθηκών DNA (ng)
Υψηλής ποιότητας gDNA	12	250–500	3.000–6.000
gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE	1	200	200

1. Καταγράψτε τους δείκτες για τις βιβλιοθήκες που σκοπεύετε να ομαδοποιήσετε σε αυτό το βήμα.

2. Με βάση τη συγκέντρωση κάθε βιβλιοθήκης, υπολογίστε τον όγκο που πρέπει να προστεθεί στην αντίδραση εμπλουτισμού για να επιτύχετε την απαιτούμενη μάζα DNA.
 - Υψηλής ποιότητα gDNA: Υπολογίστε τον απαιτούμενο όγκο βιβλιοθήκης για υλικό εισόδου 250–500 ng.
 - gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE: Υπολογίστε τον απαιτούμενο όγκο βιβλιοθήκης για υλικό εισόδου 200 ng.
3. Προσθέστε τον υπολογισμένο όγκο για κάθε βιβλιοθήκη στο ίδιο βοθρίο της πλάκας PCR.
4. Εάν χρησιμοποιείτε υψηλής ποιότητας gDNA, εκτελέστε μία από τις ακόλουθες ενέργειες με βάση τον συνολικό όγκο των ομαδοποιημένων βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό:
 - Εάν ο όγκος των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό είναι = 30 μl, προχωρήστε στον [Υβριδισμός ανιχνευτών στη σελίδα 41](#).
 - Εάν ο όγκος των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό είναι < 30 μl, προσθέστε RSB για να επιτύχετε συνολικό όγκο 30 μl.
 - Εάν ο όγκος των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό είναι > 30 μl, χρησιμοποιήστε μια μέθοδο που βασίζεται σε σφαιρίδια ή έναν συμπυκνωτή κενού για να συγκεντρώσετε το ομαδοποιημένο δείγμα. Προσθέστε RSB στο συγκεντρωμένο ομαδοποιημένο δείγμα για να επιτύχετε συνολικό όγκο 30 μl.
5. Εάν χρησιμοποιείτε gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE, εκτελέστε μία από τις ακόλουθες ενέργειες με βάση τον συνολικό όγκο των ομαδοποιημένων βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό.
 - Εάν ο όγκος των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό είναι = 7,5 μl, προχωρήστε στον [Υβριδισμός ανιχνευτών στη σελίδα 41](#).
 - Εάν ο όγκος των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό είναι < 7,5 μl, προσθέστε RSB για να επιτύχετε συνολικό όγκο 7,5 μl.

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα και αποθηκεύστε στους 25 °C έως 15 °C για έως 30 ημέρες.

Ομαδοποίηση κατ' όγκο

Όταν το υλικό εισόδου είναι 50–1.000 ng gDNA, δεν απαιτούνται ποσοτικός προσδιορισμός και κανονικοποίηση μεμονωμένων βιβλιοθηκών που δημιουργήθηκαν στο ίδιο πείραμα.

Για την επίτευξη βέλτιστης απόδοσης, ομαδοποιήστε μόνο δείγματα βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό που έχουν προετοιμαστεί από τον ίδιο χρήστη, την ίδια παρτίδα αντιδραστηρίων και την ίδια πλάκα προσαρμογέα δείκτη.

1. Καταγράψτε τους δείκτες για τις βιβλιοθήκες που σκοπεύετε να ομαδοποιήσετε σε αυτό το βήμα.
2. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους βιβλιοθήκης πριν από τον εμπλουτισμό και RSB για την πλεκτικότητα του εμπλουτισμού σας στο ίδιο βοθρίο μιας νέας πλάκας PCR.
Ο όγκος που προκύπτει είναι 30 μl.

Πλεκτικότητα εμπλουτισμού *	Όγκος κάθε βιβλιοθήκης πριν από τον εμπλουτισμό (μl)	Όγκος RSB (μl)
1-πλεκτικός	14	16
2-πλεκτικός	14	2
3-πλεκτικός	10	0
4-πλεκτικός	7,5	0
5-πλεκτικός	6	0
6-πλεκτικός	5	0
7-πλεκτικός	4,2	0,6
8-πλεκτικός	3,7	0,4
9-πλεκτικός	3,3	0,3
10-πλεκτικός	3	0
11-πλεκτικός	2,7	0,3
12-πλεκτικός	2,5	0

*Για πληροφορίες σχετικά με μη τυπικές πλεκτικότητες (2-πλεκτική έως 11-πλεκτική), δείτε την ενότητα [Περιορισμοί της διαδικασίας στη σελίδα 2](#).

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα και αποθηκεύστε στους 25 °C έως 15 °C για έως 30 ημέρες.

[Προαιρετικό] Ποιοτικός προσδιορισμός βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό

Σε περίπτωση ομαδοποίησης κατ' όγκο, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό χρησιμοποιήστε μια μέθοδο με βάση τη φθορισμομετρία που χρησιμοποιεί χρωστική που παρεμβάλλεται στο dsDNA. Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των βιβλιοθηκών πριν από τον εμπλουτισμό, χρησιμοποιήστε έναν αναλυτή τμημάτων DNA με το κατάλληλο κιτ ανάλυσης τμημάτων.

Χρησιμοποιήστε συνολικά 1 μl για τον ποιοτικό προσδιορισμό των βιβλιοθηκών. Οι βιβλιοθήκες πριν από τον εμπλουτισμό είναι αρκετά συγκεντρωμένες ώστε να επιτρέπουν μικρές αραιώσεις για ποσοτικό προσδιορισμό ή ανάλυση τμημάτων.

Υβριδισμός ανιχνευτών

Σε αυτό το βήμα, δεσμεύονται στοχευμένες περιοχές του DNA με ανιχνευτές σύλληψης.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Τα αντιδραστήρια του Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι συμβατά με τα πάνελ ολιγονουκλεοτιδίων DNA εμπλουτισμού τόσο της Illumina όσο και άλλων κατασκευαστών. Για πληροφορίες σχετικά με τις απαιτούμενες προδιαγραφές για τα πάνελ άλλων κατασκευαστών, ανατρέξτε στην ενότητα [Απαιτήσεις για τα πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού στη σελίδα 12](#).

Αναλώσιμα

- EHB2 (Ρυθμιστικό διάλυμα υβρ. εμπλουτισμού 2)
- NHB2 (Ρυθμιστικό διάλυμα HYB 2 + αποκλειστές NXT IDT) (μπλε πώμα)
- Πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού
- Πλάκα PCR 96 βοθρίων
- Αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό
- Προετοιμάστε για μεταγενέστερη διαδικασία:
 - SMB3 (Μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης)
 - EEW (Ενισχυμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης εμπλουτισμού) (πορτοκαλί πώμα)

Σχετικά με τα αντιδραστήρια

- Το NHB2 προκαλεί ιζηματοποίηση και διαχωρίζεται κατά την αποθήκευση.
- Το πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού αναφέρεται στο επιλεγμένο πάνελ ολιγονουκλεοτιδίων εμπλουτισμού από τον προμηθευτή Illumina.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αναλώσιμα:

Αντικείμενο	Αποθήκευση	Οδηγίες
EHB2	2°C έως 8°C	Αφήστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη. Εάν παρατηρούνται κρύσταλλοι και θολερότητα, επαναλάβετε την ανάδευση ή εφαρμόστε την πιπέτα προς τα πάνω και προς τα κάτω για ανάμειξη μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.
Πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού	-25 °C έως -15 °C (Illumina)	Για τα πάνελ τόσο της Illumina όσο και άλλων κατασκευαστών, αφήστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη.

Αντικείμενο	Αποθήκευση	Οδηγίες
NHB2 (μπλε πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Όταν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, προθερμάνετε σε συσκευή επώασης μικροδειγμάτων στην ίδια θερμοκρασία με τον ανιχνευτή που χρησιμοποιείτε για 5 λεπτά. Αναδεύστε στη μέγιστη ταχύτητα 3 φορές για 10 δευτερόλεπτα έκαστη για επανεναιώρηση. Φυγοκεντρήστε σύντομα. Εφαρμόστε την πιπέτα προς τα πάνω και προς τα κάτω από το κάτω μέρος του σωληναρίου. Εάν παρατηρούνται κρύσταλλοι και θολρότητα, επαναλάβετε την ανάδευση ή εφαρμόστε την πιπέτα προς τα πάνω και προς τα κάτω για ανάμειξη μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Χρησιμοποιήστε ενόσω είναι θερμό ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο να σχηματιστεί ξανά ίζημα.
SMB3*	2°C έως 8°C	Εάν προχωρήσετε στην επόμενη διαδικασία αμέσως μετά την 90λεπτη διατήρηση στο πρόγραμμα HYB, αφήστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου τουλάχιστον 2 ώρες πριν από την έναρξη του προγράμματος HYB.
EEW* (πορτοκαλί σωληνάριο)	-25 °C έως -15 °C	Εάν προχωρήσετε στην επόμενη διαδικασία αμέσως μετά την 90λεπτη διατήρηση στο πρόγραμμα HYB, αφήστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου τουλάχιστον 2 ώρες πριν από την έναρξη του προγράμματος HYB. Όταν έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, προθερμάνετε σε συσκευή επώασης μικροδειγμάτων ώστε να επιτευχθεί ο σχετικός υβριδισμός και καταγράψτε τη θερμοκρασία για 30 λεπτά πριν από τη λήξη του προγράμματος HYB.

*Εάν διακόπτετε πριν από την επόμενη διαδικασία, καθυστερήστε την προετοιμασία αυτού του αντιδραστηρίου μέχρι να ξεκινήσετε αυτήν τη διαδικασία.

2. Αποθηκεύστε το ακόλουθο πρόγραμμα HYB στον θερμικό κυκλοποιητή χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο αριθμό κύκλων, οι οποίοι αναφέρονται στον [Πίνακα 3](#).
 - Επιλέξτε την επιλογή προθερμασμένου καπακιού και ορίστε τη θερμοκρασία στους 100 °C
 - Ορίστε τον όγκο αντίδρασης
 - [Υψηλής ποιότητας gDNA] 100 μl
 - [gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE] 25 μl
 - 98°C για 5 λεπτά
 - Χ κύκλοι διάρκειας 1 λεπτού έκαστος, ξεκινώντας στους 98 °C για τον πρώτο κύκλο και, στη συνέχεια, μειώνοντας στους 2 °C ανά κύκλο
 - Διατηρήστε για 90 λεπτά στη σχετική θερμοκρασία:
 - [gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE] 58 °C
 - [Πάνελ 80-μερών ανιχνευτών] 58 °C
 - [Αντιστοίχιση σωματικής παραλλαγής] 58 °C
 - [Όλα τα υπόλοιπα] 62 °C

Ο συνολικός χρόνος εκτέλεσης είναι ~115 λεπτά.

Πίνακας 3 Αριθμός κύκλων ανά δείγμα ή πάνελ

Τύπος δείγματος και πάνελ	Αριθμός κύκλων (X)
gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE (ανεξάρτητα από τον τύπο πάνελ)	20
Πάνελ 80-μερών ανιχνευτών (ανεξάρτητα από τον τύπο δείγματος)	20
Αντιστοίχιση σωματικής παραλλαγής	20
Όλα τα υπόλοιπα δείγματα και πάνελ	18

Διαδικασία

1. [Υψηλής ποιότητας gDNA] Προσθέστε τα ακόλουθα αντιδραστήρια *με τη σειρά που παρατίθενται* σε κάθε ομαδοποιημένη βιβλιοθήκη στην πλάκα PCR.
Μην δημιουργήσετε κύριο μείγμα. Η δημιουργία κύριου μείγματος NHB2 και EHB2 επηρεάζει αρνητικά την απόδοση του εμπλουτισμού.
 - NHB2 (μπλε πώμα) (50 μl)
 - Πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού (10 μl)
 - EHB2 (10 μl)
2. [Υψηλής ποιότητας gDNA] Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα που έχει ρυθμιστεί στα 90 μl, εφαρμόστε την πιπέτα σε κάθε βοθρίο 10 φορές για ανάμειξη.
3. [gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE] Προσθέστε τα ακόλουθα αντιδραστήρια *με τη σειρά που παρατίθενται* σε κάθε ομαδοποιημένη βιβλιοθήκη στην πλάκα PCR.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Μην δημιουργήσετε κύριο μείγμα. Η δημιουργία κύριου μείγματος NHB2 και EHB2 επηρεάζει αρνητικά την απόδοση του εμπλουτισμού.

- NHB2 (μπλε πώμα) (12,5 μl)
 - Πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού (2,5 μl)
 - EHB2 (2,5 μl)
4. **[gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE]** Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα που έχει ρυθμιστεί στα 20 μl, εφαρμόστε την πιπέτα σε κάθε βοθρίο 10 φορές για ανάμειξη.
 5. Στεγανοποιήστε την πλάκα και φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 10 δευτερόλεπτα.
 6. Τοποθετήστε την πλάκα δείγματος πάνω στον εκ των προτέρων προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα HYB.
 7. Προχωρήστε αμέσως στην επόμενη διαδικασία όταν ο χρόνος διατήρησης θερμοκρασίας του προγράμματος HYB λήξει.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Δημιουργείται ίζημα εάν η θερμοκρασία της αντίδρασης υβριδισμού πέσει κάτω από τη θερμοκρασία δωματίου.

Σύλληψη υβριδισμένων ανιχνευτών

Στο βήμα αυτό χρησιμοποιούνται μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (SMB3) για την παγίδευση ανιχνευτών που έχουν υβριδιστεί στις στοχευμένες περιοχές ενδιαφέροντος.

Αναλώσιμα

- EEW (Ενισχυμένο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης εμπλουτισμού) (πορτοκαλί πώμα)
- EE1 (Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης εμπλουτισμού 1)
- ET2 (Ρυθμιστικό διάλυμα στόχου έκλουσης 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης)
- Σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης 1,5 ml
- Πλάκα MIDI 96 βοθρίων
- Πλάκα PCR 96 βοθρίων
- Αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό
- Μαγνητική βάση πλάκας MIDI
- Προετοιμάστε για μεταγενέστερη διαδικασία:
 - Ενισχυμένο μείγμα PCR (EPM)
 - Μείγμα εκκινητών PCR (PPC)

Σχετικά με τα αντιδραστήρια

- EEW
 - Φροντίστε να αποψύξετε το EEW σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 2 ώρες πριν από την προθέρμανση σε συσκευή επώασης μικροδειγμάτων.
 - Φροντίστε να θερμάνετε το EEW σε συσκευή επώασης μικροδειγμάτων για 30 λεπτά πριν από τη λήξη του προγράμματος HYB.
 - Αφήστε το EEW στη συσκευή επώασης μικροδειγμάτων όταν δεν χρησιμοποιείται. Το EEW θα πρέπει να παραμείνει θερμασμένο καθ' όλη τη διάρκεια του πρωτοκόλλου.
 - Μπορεί να είναι θολό μετά την επίτευξη θερμοκρασίας δωματίου.
 - Μπορεί να έχει κίτρινο χρώμα.
- SMB3
 - Το SMB3 πρέπει να είναι σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αναλώσιμα.

Αντικείμενο	Αποθήκευση	Οδηγίες
SMB3	2°C έως 8°C	Αφήστε για 2 ώρες ώστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Αναστρέψτε και, στη συνέχεια, αναδεύστε μέχρι να επανεναιωρηθεί πλήρως.
EEW (πορτοκαλί σωληνάριο)	-25 °C έως -15 °C	Μετά από 2 ώρες επώαση σε θερμοκρασία δωματίου, προθερμάνετε σε συσκευή επώασης μικροδειγμάτων ώστε να επιτευχθεί ο σχετικός υβριδισμός και καταγράψτε τη θερμοκρασία για 30 λεπτά πριν από τη λήξη του προγράμματος HYB.
EE1	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου και, στη συνέχεια, αναδεύστε.
HP3	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου και, στη συνέχεια, αναδεύστε.
ET2	2°C έως 8°C	Αφήστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη.
EPM	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε πάγο για μία ώρα. Αναστρέψτε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Αφήστε στην άκρη σε πάγο.
PPC	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε πάγο για μία ώρα. Αναδεύστε για ανάμειξη, στη συνέχεια φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Αφήστε στην άκρη σε πάγο.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

2. Προθερμάνετε μία συσκευή επώασης μικροδειγμάτων με ένθετο συστοιχιών θερμαντικής συσκευής MIDI για να επωάσετε την πλάκα δείγματος σε μία από τις ακόλουθες θερμοκρασίες. Μια προαιρετική δεύτερη συσκευή επώασης μικροδειγμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την προθέρμανση του EEW. Αφήστε το EEW στο πάνω μέρος του ενθέτου συστοιχιών θερμαντικής συσκευής MIDI.
 - [FFPE] 58 °C
 - [Πάνελ 80-μερών ανιχνευτών] 58 °C
 - [Αντιστοίχιση σωματικής παραλλαγής] 58 °C
 - [Όλα τα υπόλοιπα] 62 °C

Διαδικασία

Σύλληψη

1. Προσθέστε SMB3 στο αντίστοιχο βοθρίο μιας νέας πλάκας MIDI ως εξής.
 - [Υψηλής ποιότητας gDNA] Προσθέστε 250 μl SMB3.
 - [gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE] Προσθέστε 62,5 μl SMB3.
2. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα που έχει ρυθμιστεί στα 100 μl για υψηλής ποιότητας gDNA ή στα 25 μl για FFPE, μεταφέρετε κάθε ομαδοποιημένη βιβλιοθήκη από την πλάκα PCR 96 βοθρίων στο αντίστοιχο βοθρίο της νέας πλάκας MIDI.
3. Στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.200 rpm για 4 λεπτά.
4. Εάν προκύψει εκτίναξη, φυγοκεντρήστε την πλάκα για σύντομο διάστημα.
5. Τοποθετήστε την πλάκα ομαδοποιημένων βιβλιοθηκών στο ένθετο συστοιχιών θερμαντικής συσκευής MIDI στη συσκευή επώασης μικροδειγμάτων, κάτω από το σωληνάριο EEW, κλείστε το καπάκι και, στη συνέχεια, επωάστε για 15 λεπτά στη σχετική θερμοκρασία:
 - [FFPE] 58 °C
 - [Πάνελ 80-μερών ανιχνευτών] 58 °C
 - [Αντιστοίχιση σωματικής παραλλαγής] 58 °C
 - [Όλα τα υπόλοιπα] 62 °C
6. Αφαιρέστε την πλάκα ομαδοποιημένων βιβλιοθηκών και φυγοκεντρήστε στα 280 x g για 30 δευτερόλεπτα.
7. Τοποθετήστε αμέσως σε μια μαγνητική βάση πλάκας MIDI και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (2 λεπτά).
8. [Υψηλής ποιότητας gDNA] Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα που έχει ρυθμιστεί στα 200 μl, αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.
9. [gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE] Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα που έχει ρυθμιστεί στα 90 μl, αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων.
10. Αφαιρέστε και απορρίψτε όλα τα υπολείμματα υπερκείμενου υγρού.

Έκπλυση

1. Αφαιρέστε από τη μαγνητική βάση.
2. [Υψηλής ποιότητας gDNA] Αφαιρέστε γρήγορα το EEW από τη συσκευή επώασης μικροδειγμάτων και προσθέστε 200 μl σε κάθε βοθρίο.
3. [gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE] Αφαιρέστε γρήγορα το EEW από τη συσκευή επώασης μικροδειγμάτων και προσθέστε 50 μl σε κάθε βοθρίο.
4. Επιστρέψτε το αχρησιμοποίητο EEW στο σύστημα επώασης μικροδειγμάτων και διατηρήστε το θερμασμένο.
5. Στεγανοποιήστε και αναδεύστε στα 1.800 rpm για 4 λεπτά.
6. Τοποθετήστε την πλάκα δείγματος στο ένθετο συστοιχίων θερμαντικής συσκευής MIDI στη συσκευή επώασης μικροδειγμάτων, κάτω από το σωληνάριο EEW, κλείστε το καπάκι και, στη συνέχεια, επωάστε για 5 λεπτά στη σχετική θερμοκρασία:
 - [FFPE] 58 °C
 - [Πάνελ 80-μερών ανιχνευτών] 58 °C
 - [Αντιστοίχιση σωματικής παραλλαγής] 58 °C
 - [Όλα τα υπόλοιπα πάνελ] 62 °C
7. Τοποθετήστε αμέσως σε μια μαγνητική βάση πλάκας MIDI και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (2 λεπτά).
8. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα που έχει ρυθμιστεί στα 200 μl για υψηλής ποιότητας gDNA ή στα 50 μl για FFPE, αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο.
9. Επαναλάβετε τα βήματα 1–8 δύο φορές για συνολικά τρεις εκπλύσεις.

Μεταφορά έκπλυσης

1. Αφαιρέστε από τη μαγνητική βάση.
2. [Υψηλής ποιότητας gDNA] Αφαιρέστε γρήγορα το EEW από τη συσκευή επώασης μικροδειγμάτων και προσθέστε 200 μl σε κάθε βοθρίο.
3. [gDNA που έχει εξαχθεί από FFPE] Αφαιρέστε γρήγορα το EEW από τη συσκευή επώασης μικροδειγμάτων και προσθέστε 50 μl σε κάθε βοθρίο.
4. Στεγανοποιήστε και αναδεύστε στα 1.800 rpm για 4 λεπτά. Εάν προκύψει εκτίναξη, μειώστε την ταχύτητα στα 1.600 rpm.
5. Μεταφέρετε το επανεναιωρημένο διάλυμα σφαιριδίων σε μια νέα πλάκα MIDI. Μπορεί να παραμένει ορισμένη ποσότητα δείγματα στα βοθρία.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Η μεταφορά του αντιδραστηρίου ελαχιστοποιεί τη μεταφορά υπολειμμάτων αντιδραστηρίων που μπορούν να εμποδίσουν την καθοδική PCR.

6. Τοποθετήστε την πλάκα δείγματος στο ένθετο συστοιχιών θερμαντικής συσκευής MIDI στη συσκευή επώασης μικροδειγμάτων, κλείστε το καπάκι και, στη συνέχεια, επώαστε για 5 λεπτά στη σχετική θερμοκρασία:
 - [FFPE] 58 °C
 - [Πάνελ 80-μερών ανιχνευτών] 58 °C
 - [Αντιστοίχιση σωματικής παραλλαγής] 58 °C
 - [Όλα τα υπόλοιπα] 62 °C
7. Τοποθετήστε αμέσως σε μια μαγνητική βάση πλάκας MIDI και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (2 λεπτά).
8. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα που έχει ρυθμιστεί στα 200 μl για υψηλής ποιότητας gDNA ή στα 50 μl για FFPE, αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο.
9. Φυγοκεντρήστε την πλάκα στα 280 × g για 30 δευτερόλεπτα.
10. Τοποθετήστε σε μια μαγνητική βάση πλάκας MIDI για 10 δευτερόλεπτα.
11. Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα των 20 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε το υπολειπόμενο υγρό από κάθε βοθρίο.
12. Προχωρήστε αμέσως στην ενότητα [Έκλυση στη σελίδα 49](#), ώστε να αποτραπεί το ενδεχόμενο υπερβολικής ξήρανσης των σφαιριδίων και απώλειας απόδοσης των βιβλιοθηκών.

Έκλυση

1. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους για να προετοιμάσετε ένα κύριο μείγμα έκλυσης. Πολλαπλασιάστε κάθε όγκο με τον αριθμό των ομαδοποιημένων βιβλιοθηκών που υποβάλλονται σε επεξεργασία.
 - EE1 (28,5 μl)
 - HP3 (1,5 μl)Ο όγκος περιλαμβάνει επιπλέον ποσότητα αντιδραστηρίων.
2. Αναδεύστε και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
3. Αφαιρέστε την πλάκα MIDI από τη μαγνητική βάση.
4. Προσθέστε 23 μl κύριου μείγματος έκλυσης σε κάθε βοθρίο.
5. Στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.800 rpm για 2 λεπτά.
6. Επώαστε την πλάκα σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
7. Φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 30 δευτερόλεπτα.
8. Τοποθετήστε σε μια μαγνητική βάση πλάκας MIDI και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (2 λεπτά).
9. Μεταφέρετε 21 μl υπερκείμενου υγρού από την πλάκα MIDI στο αντίστοιχο βοθρίο μιας νέας πλάκας PCR 96 βοθρίων.
10. Απορρίψτε την πλάκα MIDI.
11. Προσθέστε 4 μl ET2 σε κάθε βοθρίο που περιέχει 21 μl υπερκείμενου υγρού.
12. Ρυθμίστε την πιπέτα στα 20 μl και εφαρμόστε αργά την πιπέτα σε κάθε βοθρίο 10 φορές για ανάμειξη.

13. Στεγανοποιήστε την πλάκα και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 10 δευτερόλεπτα.
14. Επιάστε την πλάκα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.

Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης

Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται PCR για την ενίσχυση της εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης.

Αναλώσιμα

- EPM (Ενισχυμένο μείγμα PCR)
- PPC (Μείγμα εκκινητών PCR)
- Αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αναλώσιμα:

Αντικείμενο	Αποθήκευση	Οδηγίες
EPM	-25 °C έως -15 °C	Αποφύξτε στους 4 °C ή σε πάγο για μία ώρα. Αναστρέψτε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Αφήστε στην άκρη σε πάγο.
PPC	-25 °C έως -15 °C	Αποφύξτε στους 4 °C ή σε πάγο για μία ώρα. Αναδεύστε για ανάμειξη, στη συνέχεια φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Αφήστε στην άκρη σε πάγο.

2. Αποθηκεύστε το ακόλουθο πρόγραμμα AMP στον θερμικό κυκλοποιητή, χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο αριθμό κύκλων PCR, οι οποίοι αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.
 - Επιλέξτε την επιλογή προθερμασμένου καπακιού και ορίστε τη θερμοκρασία στους 100 °C
 - Ορίστε τον όγκο αντίδρασης σε 50 μl
 - 98 °C για 45 δευτερόλεπτα
 - (X) κύκλοι:
 - 98 °C για 30 δευτερόλεπτα
 - 60 °C για 30 δευτερόλεπτα
 - 72°C για 30 δευτερόλεπτα
 - 72 °C για 5 λεπτά
 - Διατηρήστε στους 10 °CΟ συνολικός χρόνος εκτέλεσης είναι ~35 λεπτά.

Τύπος δείγματος και πάνελ	(X) Κύκλοι
FPPE	14
Πάνελ εξώματος της Illumina (CEX) για υψηλής ποιότητας gDNA	10
Πάνελ εξώματος της Illumina (CEX) για FFPE	12
Όλα τα υπόλοιπα δείγματα και πάνελ	12 ¹²³⁴

¹ Μπορεί να προσαρμοστεί έως 15 κύκλους για μικρά πάνελ άλλων κατασκευαστών μέσω μεταγενέστερης βελτιστοποίησης. Εάν χρησιμοποιείται FFPE, ο αριθμός κύκλων μπορεί να προσαρμοστεί έως 17.

² Μπορεί να προσαρμοστεί έως 17 κύκλους για πάνελ άλλων κατασκευαστών που έχουν μόνο 500 ανιχνευτές. Εάν χρησιμοποιείται FFPE, ο αριθμός κύκλων μπορεί να προσαρμοστεί έως 19.

³ Μπορεί να προσαρμοστεί έως 14 κύκλους για δείγματα FFPE.

⁴ Η αύξηση του αριθμού των κύκλων PCR μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερο ποσοστό διπλότυπων αποτελεσμάτων και μικρότερα μεγέθη τμημάτων για τα δείγματα FFPE.

Διαδικασία

1. Προσθέστε 5 μl PPC σε κάθε βοθρίο.
2. Προσθέστε 20 μl EPM σε κάθε βοθρίο.
3. Στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.200 rpm για 1 λεπτό.
4. Φυγοκεντρήστε την πλάκα στα 280 × g για 10 δευτερόλεπτα.
5. Τοποθετήστε την πλάκα πάνω στον εκ των προτέρων προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα AMP.

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, αποθηκεύστε στους 2 °C έως 8 °C για έως δύο ημέρες. Εναλλακτικά, αφήστε πάνω στον θερμικό κυκλοποιητή για έως και 24 ώρες.

Εκκαθάριση ενισχυμένης εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης

Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιούνται σφαιρίδια εκκαθάρισης για τον καθαρισμό της εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης και την αφαίρεση ανεπιθύμητων προϊόντων.

Αναλώσιμα

- CB (Σφαιρίδια εκκαθάρισης)
- RSB (Ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης)
- Φρέσκια αιθανόλη 80% (EtOH)
- Αυτοκόλλητες στεγανοποιήσεις
- Πλάκα MIDI 96 βοθρίων
- Πλάκα PCR 96 βοθρίων
- Μαγνητική βάση πλάκας MIDI

Σχετικά με τα αντιδραστήρια

- Σφαιρίδια εκκαθάρισης
 - Αναδεύστε πριν από κάθε χρήση.
 - Αναδεύετε συχνά για να βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα.
 - Εκτελέστε αναρρόφηση και διανείμετε αργά λόγω του ιξώδους του διαλύματος.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αναλώσιμα.

Αντικείμενο	Αποθήκευση	Οδηγίες
CB	Θερμοκρασία δωματίου	Αναδεύστε και αναστρέψτε για ανάμειξη μέχρι το χρώμα του υγρού να γίνει ομοιογενές.
RSB	2 °C έως 8 °C	Αφήστε να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Αναδεύστε για ανάμειξη.

2. Προετοιμάστε φρέσκια EtOH 80% από απόλυτη αιθανόλη.

Διαδικασία

1. Φυγοκεντρήστε την πλάκα PCR στα 280 × g για 10 δευτερόλεπτα.
2. Αναδεύστε τα CB 3 φορές για 10 λεπτά και, στη συνέχεια, αναστρέψτε.
3. Προσθέστε 40,5 μl CB σε κάθε βοθρίο μιας νέας πλάκας MIDI.
4. Μεταφέρετε 45 μl από κάθε βοθρίο της πλάκας PCR στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας MIDI.
5. Στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.800 rpm για 1 λεπτό.
6. Επώαστε την πλάκα MIDI σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
7. Φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 10 δευτερόλεπτα.
8. Τοποθετήστε σε μια μαγνητική βάση πλάκας MIDI και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (5 λεπτά).
9. Χρησιμοποιώντας μια πιπέτα που έχει ρυθμιστεί στα 95 μl, αφαιρέστε και απορρίψτε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο.
10. Εκπλύνετε δύο φορές ως εξής.
 - a. Με την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση, προσθέστε 200 μl φρέσκια EtOH 80% χωρίς να αναμείξετε.
 - b. Επώαστε για 30 δευτερόλεπτα.
 - c. Χωρίς να διαταράξετε τα σφαιρίδια, αφαιρέστε και απορρίψτε το υπερκείμενο υγρό.
11. Αφήστε να στεγνώσουν στον αέρα πάνω στη μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
12. Ενώ στεγνώνετε με αέρα, χρησιμοποιήστε μια πιπέτα των 20 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε το υπόλειμμα EtOH από κάθε βοθρίο.
13. Αφαιρέστε από τη μαγνητική βάση και προσθέστε 32 μl RSB σε κάθε βοθρίο.
14. Στεγανοποιήστε την πλάκα και αναδεύστε στα 1.800 rpm για 1 λεπτό.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

illumina®

15. Επιάστε την πλάκα σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
16. Φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 10 δευτερόλεπτα.
17. Τοποθετήστε σε μια μαγνητική βάση πλάκας MIDI και περιμένετε μέχρι το υγρό να γίνει διαυγές (2 λεπτά).
18. Μεταφέρετε 30 μl υπερκείμενου υγρού από την πλάκα MIDI 96 βοθρίων στο αντίστοιχο βοθρίο μιας νέας πλάκας PCR.
19. Απορρίψτε την πλάκα MIDI.

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν διακόψετε, στεγανοποιήστε την πλάκα και αποθηκεύστε στους -25 °C έως -15 °C για έως 7 ημέρες.

Έλεγχος εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών

Για να προσδιορίσετε ποσοτικά το υλικό εισόδου gDNA διπλής αλυσίδας, χρησιμοποιήστε μια μέθοδο με βάση τον φθορισμό που χρησιμοποιεί χρωστική παρεμβολής. Αποφύγετε τη χρήση μεθόδων που μετρούν το ολικό νουκλεϊκό οξύ, όπως η μέθοδος NanoDrop ή άλλες μέθοδοι απορρόφησης UV.

1. Εκτελέστε 1 μl των εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού σας.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Η συνολική μοριακότητα κατ' όγκο των ανιχνευτών επηρεάζει την απόδοση των βιβλιοθηκών μετά τον εμπλουτισμό.

Να αναμένετε μέσο μέγεθος τμήματος 125–235 bp και κατανομή τμημάτων DNA με εύρος μεγέθους από ~200 bp έως ~1.000 bp.

Αραίωση βιβλιοθηκών στη συγκέντρωση έναρξης

Σε αυτό το βήμα αραιώνονται βιβλιοθήκες στη συγκέντρωση έναρξης για το σύστημα αλληλούχισής σας. Πρόκειται για το πρώτο βήμα σε διαδοχικές αραιώσεις. Μετά την αραιώση στη συγκέντρωση έναρξης, οι βιβλιοθήκες είναι έτοιμες να αποδιαταχθούν και να αραιωθούν στην τελική συγκέντρωση φόρτωσης.

Για την αλληλούχιση, ανεξάρτητα από το πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού που χρησιμοποιείτε, η Illumina συνιστά τη ρύθμιση μιας εκτέλεσης συζευγμένων άκρων με 151 κύκλους ανά ανάγνωση (2 × 151) και 10 κύκλους ανά ανάγνωση δείκτη. Εάν θέλετε λιγότερες αλληλοεπικαλυπτόμενες αναγνώσεις ή μικρότερη ακατέργαστη κάλυψη, μπορείτε να μειώσετε τον αριθμό των κύκλων και να εκτελέσετε αλληλούχιση με 2 × 126 ή 2 × 101.

- Υπολογίστε την τιμή της μοριακότητας κατ' όγκο της βιβλιοθήκης ή των ομαδοποιημένων βιβλιοθηκών χρησιμοποιώντας τον ίδιο τύπο.
 - Για τις βιβλιοθήκες που έχουν προσδιοριστεί ποιοτικά σε αναλυτή τμημάτων DNA, χρησιμοποιείτε το μέσο μέγεθος που ελήφθη για τη βιβλιοθήκη.
 - Για όλες τις άλλες μεθόδους ποιοτικού προσδιορισμού, χρησιμοποιείτε 350 bp ως μέσο μέγεθος βιβλιοθήκης.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{μέσο μέγεθος βιβλιοθήκης (bp)}} = \frac{\text{Μοριακότητα}}{\text{κατ' όγκο (nM)}}$$

Για παράδειγμα, εάν η συγκέντρωση βιβλιοθήκης σας είναι 20 ng/μl και το μέσο μέγεθος είναι 350 bp, η τιμή της μοριακότητας κατ' όγκο που προκύπτει είναι 86,58 nM.

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

- Χρησιμοποιώντας την τιμή της μοριακότητας κατ' όγκο, υπολογίστε τους όγκους RSB και βιβλιοθήκης που απαιτούνται για την αραιώση των βιβλιοθηκών στη συγκέντρωση έναρξης για το σύστημά σας.

Σύστημα αλληλούχισης	Ελάχιστος απαιτούμενος όγκος βιβλιοθήκης (μl)	Συγκέντρωση έναρξης (nM)	Τελική συγκέντρωση φόρτωσης (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) ή 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM είναι η συγκέντρωση έναρξης για τελική συγκέντρωση φόρτωσης 350 pM. Αν είναι απαραίτητο, προσαρμόστε την τελική συγκέντρωση φόρτωσης χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο πίνακα.

Τελική συγκέντρωση φόρτωσης (pM)	Συγκέντρωση ομαδοποιημένης βιβλιοθήκης (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Αραιώστε βιβλιοθήκες χρησιμοποιώντας RSB:

- **Βιβλιοθήκες που έχουν ποσοτικοποιηθεί ως ομάδα πολυπλεγμένων βιβλιοθηκών**—Αραιώστε την ομάδα στην αρχική συγκέντρωση για το σύστημά σας.
- **Βιβλιοθήκες που έχουν ποσοτικοποιηθεί μεμονωμένα**—Αραιώστε κάθε βιβλιοθήκη στην αρχική συγκέντρωση για το σύστημά σας. Προσθέστε 10 μl κάθε αραιωμένης βιβλιοθήκης σε ένα σωληνάριο για να δημιουργήσετε μια ομάδα πολυπλεγμένων βιβλιοθηκών.

4. Ακολουθήστε τις οδηγίες αποδιάταξης και αραιώσης για το σύστημά σας για να αραιώσετε στην τελική συγκέντρωση φόρτωσης.

- Για το σύστημα NextSeq 550Dx System, ανατρέξτε στην ενότητα [Προετοιμασία αλληλούχισης στο NextSeq 550Dx στη σελίδα 55](#).
- Για το σύστημα MiSeqDx System, ανατρέξτε στην ενότητα [Προετοιμασία αλληλούχισης στο MiSeqDx στη σελίδα 57](#).
- Για το σύστημα NovaSeq 6000Dx System, ανατρέξτε στην ενότητα [Προετοιμασία αλληλούχισης NovaSeq 6000Dx στη σελίδα 59](#).

Οι τελικές συγκεντρώσεις φόρτωσης είναι ένα σημείο εκκίνησης και αποτελούν γενική οδηγία.

Βελτιστοποιήστε τις συγκεντρώσεις για τη ροή εργασιών και τη μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού σας στις επόμενες εκτελέσεις αλληλούχισης ή με τιτλοποίηση κυψελίδων ροής.

Προετοιμασία αλληλούχισης στο NextSeq 550Dx

Ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες για την αποδιάταξη και την αραιώση βιβλιοθηκών για αλληλούχιση στο σύστημα αλληλούχισης NextSeq 550Dx.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Αναλώσιμα

- HT1 (Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού)
- 1 N NaOH
- 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

Προετοιμασία

Προετοιμάστε ένα φρέσκο διάλυμα αραιώσης 0,2N NaOH, για την αποδιάταξη βιβλιοθηκών για αλληλούχιση. Για να μην επιτραπεί σε μικρά σφάλματα εφαρμογής πιπέτας να επηρεάσουν την τελική συγκέντρωση NaOH, προετοιμάζεται επιπλέον όγκος.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Το φρέσκο αραιωμένο 0,2N NaOH είναι ουσιώδες για τη διαδικασία αποδιάταξης. Με την ακατάλληλη αποδιάταξη, μπορεί να μειωθεί η απόδοση.

1. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης, για να αραιώσετε 1N NaOH σε 0,2N NaOH:

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αναλώσιμα.

Αντικείμενο	Αποθήκευση	Οδηγίες
HT1	-25 °C έως -15 °C	Αποφύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Αποθηκεύστε στους 2 °C έως 8 °C μέχρι να είστε έτοιμοι να αραιώσετε τις αποδιατεταγμένες βιβλιοθήκες.

2. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης για την προετοιμασία φρέσκου διαλύματος NaOH:

- Νερό εργαστηριακής ποιότητας (800 μl)
- 1N NaOH (200 μl)

Το αποτέλεσμα είναι 1 ml 0,2 N NaOH.

3. Αναστρέψτε το σωληνάριο αρκετές φορές για ανάμιξη.

4. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης για την προετοιμασία 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

- Νερό εργαστηριακής ποιότητας (800 μl)
- 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 μl)

Το αποτέλεσμα είναι 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Διατηρήστε το σωληνάριο πωματισμένο. Χρησιμοποιήστε το φρέσκο αραιωμένο διάλυμα εντός **12 ωρών**.

Αποδιάταξη βιβλιοθηκών

1. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους βιβλιοθήκης και φρέσκου αραιωμένου 0,2 N NaOH σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης.
 - Βιβλιοθήκη 10 μl
 - 10 μl 0,2 N NaOH
2. Αναδεύστε σύντομα και κατόπιν φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό.
3. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
4. Προσθέστε 10 μl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Αραίωση αποδιατεταγμένων βιβλιοθηκών σε 20 pM

1. Προσθέστε 970 μl προψυγμένου HT1 στο σωληνάριο με τις αποδιατεταγμένες βιβλιοθήκες. Το αποτέλεσμα είναι αποδιατεταγμένη βιβλιοθήκη 20 pM.
2. Αναδεύστε σύντομα και κατόπιν φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό.
3. Τοποθετήστε τις βιβλιοθήκες 20 pM σε πάγο μέχρι να είστε έτοιμοι να προχωρήσετε στην τελική αραίωση.

Αραίωση βιβλιοθηκών στη συγκέντρωση φόρτωσης

1. Προσθέστε τους ακόλουθους όγκους για να αραιώσετε το διάλυμα αποδιατεταγμένων βιβλιοθηκών 20 pM σε 1,2 pM.
 - Διάλυμα αποδιατεταγμένων βιβλιοθηκών (78 μl)
 - Προψυγμένο HT1 (1222 μl)Ο συνολικός όγκος είναι 1,3 ml σε 1,2 pM.
2. Αναστρέψτε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, υποβάλετε σε παλμική φυγοκέντρωση.
3. Προχωρήστε στην αλληλούχιση. Για οδηγίες, ανατρέξτε στο έγγραφο *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου 1000000009513).

Προετοιμασία αλληλούχισης στο MiSeqDx

Ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες για την αποδιάταξη και την αραίωση βιβλιοθηκών για αλληλούχιση στο σύστημα αλληλούχισης MiSeqDx.

Αναλώσιμα

- HT1 (Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού)
- 1 N NaOH

Προετοιμασία

Προετοιμάστε ένα φρέσκο διάλυμα αραιώσης 0,2N NaOH, για την αποδιάταξη βιβλιοθηκών για αλληλούχιση. Για να μην επιτραπεί σε μικρά σφάλματα εφαρμογής πιπέτας να επηρεάσουν την τελική συγκέντρωση NaOH, προετοιμάζεται επιπλέον όγκος.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Το φρέσκο αραιωμένο 0,2N NaOH είναι ουσιώδες για τη διαδικασία αποδιάταξης. Με την ακατάλληλη αποδιάταξη, μπορεί να μειωθεί η απόδοση.

1. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης, για να αραιώσετε 1N NaOH σε 0,2N NaOH:
1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αναλώσιμα.

Αντικείμενο	Αποθήκευση	Οδηγίες
HT1	-25 °C έως -15 °C	Αποφύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Αποθηκεύστε στους 2 °C έως 8 °C μέχρι να είστε έτοιμοι να αραιώσετε τις αποδιατεταγμένες βιβλιοθήκες.

2. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης για την προετοιμασία φρέσκου διαλύματος NaOH:
 - Νερό εργαστηριακής ποιότητας (800 μl)
 - 1N NaOH (200 μl)Το αποτέλεσμα είναι 1 ml 0,2 N NaOH.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Διατηρήστε το σωληνάριο πωματισμένο. Χρησιμοποιήστε το φρέσκο αραιωμένο διάλυμα εντός **12 ωρών**.

Αποδιάταξη βιβλιοθήκης 4 nM

1. Συνδυάστε τους παρακάτω όγκους σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης.
 - Βιβλιοθήκη 4 nM (5 μl)
 - 0,2N NaOH (5 μl)
2. Αναδεύστε σύντομα και κατόπιν φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό.
3. Επώαστε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
4. Προσθέστε 990 μl προψυγμένου HT1 στο σωληνάριο που περιέχει την αποδιατεταγμένη βιβλιοθήκη. Το αποτέλεσμα είναι 1 ml αποδιατεταγμένης βιβλιοθήκης 20 pM.

Αραίωση αποδιατεταγμένης βιβλιοθήκης 20 pM

1. Αραιώστε στην επιθυμητή συγκέντρωση χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους όγκους.

Συγκέντρωση	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Βιβλιοθήκη 20 pM	180 μl	240 μl	300 μl	330 μl	360 μl	450 μl	600 μl
Προφυγμένο HT1	420 μl	360 μl	300 μl	270 μl	240 μl	150 μl	0 μl

2. Αναστρέψτε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, υποβάλετε σε παλμική φυγοκέντρηση.
3. Προχωρήστε στην αλληλούχιση. Για οδηγίες, ανατρέξτε στο έγγραφο *Οδηγός αναφοράς οργάνου MiSeqDx για το MOS έκδ. 4 (αρ. εγγράφου 1000000157953)*.

Προετοιμασία αλληλούχισης NovaSeq 6000Dx

Ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες για την αποδιάταξη και την αραιώση βιβλιοθηκών για αλληλούχιση στο σύστημα αλληλούχισης NovaSeq 6000Dx.

Αναλώσιμα

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (Ρυθμιστικό διάλυμα επανεναιώρησης)
- 1 N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- Σωληνάριο βιβλιοθήκης NovaSeq 6000Dx

Προετοιμασία

Προετοιμάστε ένα φρέσκο διάλυμα αραιώσης 0,2N NaOH, για την αποδιάταξη βιβλιοθηκών για αλληλούχιση. Για να μην επιτραπεί σε μικρά σφάλματα εφαρμογής πιπέτας να επηρεάσουν την τελική συγκέντρωση NaOH, προετοιμάζεται επιπλέον όγκος.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Το φρέσκο αραιωμένο 0,2N NaOH είναι ουσιώδες για τη διαδικασία αποδιάταξης. Με την ακατάλληλη αποδιάταξη, μπορεί να μειωθεί η απόδοση.

1. Συνδυάστε τους ακόλουθους όγκους σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης, για να αραιώσετε 1N NaOH σε 0,2N NaOH:

Πίνακας 4 Λειτουργία S2

Αντιδραστήριο	Όγκος για μία κυψελίδα ροής (μl)	Όγκος για δύο κυψελίδες ροής (μl)
Νερό εργαστηριακής ποιότητας	40	80
Απόθεμα 1N NaOH	10	20

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

illumina®

Με αυτούς τους όγκους προκύπτουν 50 µl 0,2N NaOH για μία κυψελίδα ροής ή 100 µl 0,2N NaOH για δύο κυψελίδες ροής.

Πίνακας 5 Λειτουργία S4

Αντιδραστήριο	Όγκος για μία κυψελίδα ροής (µl)	Όγκος για δύο κυψελίδες ροής (µl)
Νερό εργαστηριακής ποιότητας	80	160
Απόθεμα 1N NaOH	20	40

Με αυτούς τους όγκους προκύπτουν 100 µl 0,2N NaOH για μία κυψελίδα ροής ή 200 µl 0,2N NaOH για δύο κυψελίδες ροής.

2. Αναστρέψτε αρκετές φορές για ανάμειξη, ή αναδεύστε σχολαστικά.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Διατηρήστε το σωληνάριο πωματισμένο. Χρησιμοποιήστε το φρέσκο αραιωμένο διάλυμα εντός **12 ωρών**.

Δημιουργία κανονικοποιημένης ομάδας βιβλιοθηκών

Η συγκέντρωση φόρτωσης μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις μεθόδους προετοιμασίας, ποσοτικοποίησης και κανονικοποίησης βιβλιοθήκης.

Για κανονικοποίηση βιβλιοθηκών στην κατάλληλη συγκέντρωση και, στη συνέχεια, ομαδοποίηση, χρησιμοποιήστε τις ακόλουθες οδηγίες. Οι βιβλιοθήκες που έχουν υποβληθεί σε αλληλούχιση στην ίδια κυψελίδα ροής πρέπει να συνδυάζονται σε μία κανονικοποιημένη ομάδα.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Ο μέγιστος αριθμός δειγμάτων που μπορούν να εκτελεστούν ανά λωρίδα με το Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit είναι 192. Αυτό το όριο οφείλεται στον συνολικό αριθμό δεικτών UD στα Σετ A και B.

Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών για ομαδοποίηση

1. Προσδιορίστε την απαιτούμενη ομαδοποιημένη συγκέντρωση βιβλιοθήκης βάσει της επιθυμητής τελικής συγκέντρωσης φόρτωσης.
 - Για τελική συγκέντρωση φόρτωσης 350 pM, η απαιτούμενη ομαδοποιημένη συγκέντρωση βιβλιοθήκης είναι 1,75 nM.
 - Για να προσδιορίσετε την ομαδοποιημένη συγκέντρωση βιβλιοθήκης για διαφορετική τελική συγκέντρωση φόρτωσης, ανατρέξτε στην ενότητα [Αραίωση βιβλιοθηκών στη συγκέντρωση έναρξης στη σελίδα 54](#).
2. Κανονικοποιήστε βιβλιοθήκες στην επιθυμητή ομαδοποιημένη συγκέντρωση βιβλιοθήκης, χρησιμοποιώντας 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Για βοήθεια κατά την αραίωση βιβλιοθηκών στην κατάλληλη συγκέντρωση, ανατρέξτε στην ενότητα [Πρόγραμμα υπολογισμού ομαδοποίησης](#) στον ιστότοπο της Illumina.

Συνιστώμενες συγκεντρώσεις φόρτωσης

Η βέλτιστη συγκέντρωση φόρτωσης DNA εξαρτάται από τον τύπο της βιβλιοθήκης και το μέγεθος του ενθέτου. Για βιβλιοθήκες > 450 bp, ενδέχεται να είναι απαραίτητες υψηλότερες συγκεντρώσεις φόρτωσης.

Ομαδοποίηση κανονικοποιημένων βιβλιοθηκών και προσθήκη προαιρετικού διαλύματος ελέγχου PhiX Control

1. Συνδυάστε τον κατάλληλο όγκο κάθε κανονικοποιημένης βιβλιοθήκης σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης, για να καταλήξετε σε έναν από τους ακόλουθους τελικούς όγκους:

Λειτουργία	Τελικός όγκος (μl)
S2	150
S4	310

2. **[Προαιρετικά]** Ενοφθαλμίστε 1% μη αποδιατεταγμένο διάλυμα PhiX> ως εξής.
 - a. Αραιώστε 10 nM PhiX σε 2,5 nM χρησιμοποιώντας 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
 - b. Προσθέστε τον κατάλληλο όγκο μη αποδιατεταγμένου διαλύματος 2,5 nM PhiX στο σωληνάριο της μη αποδιατεταγμένης ομάδας βιβλιοθηκών.

Λειτουργία	Μη αποδιατεταγμένο διάλυμα 2,5 nM PhiX (μl)	Μη αποδιατεταγμένη ομάδα βιβλιοθηκών (μl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Κατά τον ενοφθαλμισμό διαλύματος PhiX, η συνιστώμενη ποσότητα για καλά ισορροπημένες βιβλιοθήκες είναι 1%. Για βιβλιοθήκες χαμηλής ποικιλομορφίας, μπορεί να απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα. Για να χρησιμοποιήσετε ένα διάλυμα ελέγχου PhiX με βιβλιοθήκες χαμηλής ποικιλομορφίας, επικοινωνήστε για καθοδήγηση με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.

Αποδιάταξη ομάδας βιβλιοθηκών και προαιρετικού διαλύματος ελέγχου PhiX

1. Προσθέστε 0,2N NaOH στο σωληνάριο της μη αποδιατεταγμένης ομάδας βιβλιοθηκών και του προαιρετικού διαλύματος PhiX ως εξής.

Κυψελίδα ροής	0,2N NaOH	Μη αποδιατεταγμένη ομάδα βιβλιοθηκών (μl)	Προκύπτων όγκος
S2	37	150	187 μl ή 187,9 μl με PhiX
S4	77	310	387 μl ή 388,9 μl με PhiX

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

2. Πωματίστε και, στη συνέχεια, αναδεύστε για σύντομο διάστημα.
3. Φυγοκεντρήστε στα 280 × g για έως 1 λεπτό.
4. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 8 λεπτά, για αποδιάταξη.
5. Προσθέστε 400 mM Tris-HCl, με pH 8,0 ως εξής, για εξουδετέρωση.

Λειτουργία	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (μl)	Προκύπτων όγκος
S2	38	225 μl ή 225,9 μl με PhiX
S4	78	465 μl ή 466,9 μl με PhiX

6. Πωματίστε και, στη συνέχεια, αναδεύστε για σύντομο διάστημα.
7. Φυγοκεντρήστε στα 280 × g για έως 1 λεπτό.
8. Μεταφέρετε ολόκληρο τον όγκο αποδιατεταγμένης βιβλιοθήκης ή αποδιατεταγμένης βιβλιοθήκης και PhiX στο σωληνάριο βιβλιοθήκης NovaSeq 6000Dx.
9. Προχωρήστε στην αλληλούχιση. Για οδηγίες, ανατρέξτε στο έγγραφο *Τεκμηρίωση προϊόντος οργάνου NovaSeq 6000Dx* (αρ. εγγράφου 200010105).

Αντιμετώπιση προβλημάτων

Χρησιμοποιήστε τον ακόλουθο πίνακα για την αντιμετώπιση προβλημάτων στη ροή εργασιών. Εάν μια εκτέλεση αλληλούχισης ή προετοιμασία βιβλιοθηκών για ένα δείγμα αποτύχει δύο φορές, ενδέχεται να απαιτούνται πρόσθετες ενέργειες για την αντιμετώπιση προβλημάτων. Επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.

Παρατήρηση	Πιθανή αιτία	Συνιστώμενη ενέργεια
Η εκτέλεση αλληλούχισης δεν ικανοποιεί τις προδιαγραφές ελέγχου ποιότητας της εκτέλεσης	Σφάλμα χρήσης ή εργαστηριακού εξοπλισμού στη ροή εργασιών του προσδιορισμού	<p>Προσδιορίστε ποιοτικά τις εμπλουτισμένες βιβλιοθήκες για να εξασφαλίσετε κατάλληλη απόδοση βιβλιοθηκών και κατανομή μεγέθους τμημάτων. Επαναλάβετε την προετοιμασία βιβλιοθηκών από ένα από τα ακόλουθα βήματα ανάλογα με το σημείο στο οποίο προέκυψε το πιθανό σφάλμα χρήσης ή εξοπλισμού. Εάν δεν είναι γνωστό ή προέκυψαν άλλα σφάλματα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina για την αντιμετώπιση του προβλήματος στην εκτέλεσή σας.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Υποβάλετε εκ νέου τις βιβλιοθήκες σε αλληλούχιση. Ανατρέξτε στην ενότητα Προετοιμασία αλληλούχισης στο NextSeq 550Dx στη σελίδα 55, Προετοιμασία αλληλούχισης στο MiSeqDx στη σελίδα 57 ή Προετοιμασία αλληλούχισης NovaSeq 6000Dx στη σελίδα 59. • Εμπλουτίστε εκ νέου τις βιβλιοθήκες. Ανατρέξτε στην ενότητα Υβριδισμός ανιχνευτών στη σελίδα 41. • Ξεκινήστε την προετοιμασία βιβλιοθηκών από την αρχή της ροής εργασιών. Ανατρέξτε στις Οδηγίες χρήσης στη σελίδα 24.
	Πρόβλημα οργάνου	Επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.
Σφάλμα με τη δημιουργία FASTQ ή γενικό σφάλμα συστήματος αλληλούχισης (π.χ. σφάλμα δικτύου, σφάλμα κατά τη φόρτωση/εκφόρτωση αντιδραστηρίων κ.λπ.)	Πρόβλημα συστήματος ή οργάνου	<p>Ανατρέξτε στο έγγραφο <i>Οδηγός λογισμικού Local Run Manager</i> (αρ. εγγράφου 10000002702) για βοήθεια με τη δημιουργία FASTQ ή ανατρέξτε στο έγγραφο <i>Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx</i> (αρ. εγγράφου 100000009513), <i>Οδηγός αναφοράς οργάνου MiSeqDx για το MOS έκδ. 4</i> (αρ. εγγράφου 1000000157953) ή <i>Τεκμηρίωση προϊόντος οργάνου NovaSeq 6000Dx</i> (αρ. εγγράφου 200010105).</p> <p>Επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina για περισσότερη βοήθεια.</p>

Παρατήρηση	Πιθανή αιτία	Συνιστώμενη ενέργεια
<p>Η βιβλιοθήκη DNA δεν δημιουργεί επαρκή απόδοση για αλληλούχιση φόρτωσης</p>	<p>Οι απαιτήσεις για το δείγμα εισόδου δεν ικανοποιήθηκαν</p>	<p>Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει το κατάλληλο δείγμα εισόδου και επαναλάβετε την προετοιμασία βιβλιοθηκών. Ανατρέξτε στην ενότητα Συστάσεις για το δείγμα εισόδου στη σελίδα 20.</p>
	<p>Σφάλμα χρήσης ή εξοπλισμού στη ροή εργασιών του προσδιορισμού</p>	<p>Επαναλάβετε την προετοιμασία βιβλιοθηκών από ένα από τα ακόλουθα βήματα ανάλογα με το σημείο στο οποίο προέκυψε το πιθανό σφάλμα χρήσης ή εξοπλισμού. Εάν δεν είναι γνωστό ή προέκυψαν άλλα σφάλματα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina για την αντιμετώπιση του προβλήματος στην εκτέλεσή σας.</p> <ul style="list-style-type: none"> Υποβάλετε εκ νέου τις βιβλιοθήκες σε αλληλούχιση. Ανατρέξτε στην ενότητα Προετοιμασία αλληλούχισης στο NextSeq 550Dx στη σελίδα 55, Προετοιμασία αλληλούχισης στο MiSeqDx στη σελίδα 57 ή Προετοιμασία αλληλούχισης NovaSeq 6000Dx στη σελίδα 59. Εμπλουτίστε εκ νέου τις βιβλιοθήκες. Ανατρέξτε στην ενότητα Υβριδισμός ανιχνευτών στη σελίδα 41. Ξεκινήστε την προετοιμασία βιβλιοθηκών από την αρχή της ροής εργασιών. Ανατρέξτε στις Οδηγίες χρήσης στη σελίδα 24.
	<p>Οι απαιτήσεις για το πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού δεν ικανοποιήθηκαν</p>	<p>Βεβαιωθείτε ότι υπάρχει το κατάλληλο πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού και επαναλάβετε την προετοιμασία βιβλιοθηκών. Ανατρέξτε στην ενότητα Απαιτήσεις για τα πάνελ ανιχνευτών εμπλουτισμού στη σελίδα 12.</p>

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Τα χαρακτηριστικά απόδοσης της εφαρμογής DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application για το σύστημα NovaSeq 6000Dx παρέχεται στο Ένθετο συσκευασίας NovaSeq 6000Dx Instrument (αρ. εγγράφου 200025276).

Απόδοση με πάνελ ολικού εξώματος

Η απόδοση πάνελ εξώματος ελέγχθηκε με τη χρήση της χαμηλότερης (50 ng) και της υψηλότερης (1.000 ng) συνιστώμενης τιμής υλικού εισόδου για το gDNA από κυτταρικές σειρές NA12878 Coriell, με γνωστό σύνολο αληθείας για την ανίχνευση παραλλαγών βλαστικής σειράς (Coriell platinum genome). Χρησιμοποιήθηκαν ως

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

αντιπροσωπευτικά πάνελ το πάνελ εξώματος 1 (45 Mb) και το πάνελ εξώματος 2 (36,8 Mb). 24 τεχνικά αντίγραφα υποβλήθηκαν σε εξέταση μέσω του προσδιορισμού Illumina DNA Prep with Enrichment Dx με τη χρήση του πάνελ εξώματος 1 (45 Mb) σε δύο 12-πλεκτικές αντιδράσεις εμπλουτισμού. 12 τεχνικά αντίγραφα υποβλήθηκαν σε εξέταση μέσω του προσδιορισμού Illumina DNA Prep with Enrichment Dx με τη χρήση του πάνελ εξώματος 2 (36,8 Mb) σε μία 12-πλεκτική αντίδραση εμπλουτισμού. Οι εμπλουτισμένες βιβλιοθήκες υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση στο σύστημα αλληλούχισης NextSeq 550Dx με τη μονάδα DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μέσες τιμές της δευτερεύουσας αλληλούχισης και οι μετρήσεις απόδοσης για την αντιστοίχιση παραλλαγών για τα τεχνικά αντίγραφα που υποβλήθηκαν σε εξέταση με κάθε πάνελ.

Πίνακας 6 Απόδοση προσδιορισμού με δύο πάνελ ολικού εξώματος

Πάνελ	Ενισχυμένος εμπλουτισμός μοναδικής ανάγνωσης	Ομοιομορφία κάλυψης	Διάμεσος μήκος τμήματος	Ανάκληση SNV ¹	Ακρίβεια SNV ²	Ανάκληση Indel ¹	Ακρίβεια Indel ²
Πάνελ εξώματος 1 (45 Mb)	80%	96%	186 bp	96%	99%	90%	89%
Πάνελ εξώματος 2 (36,8 Mb)	93%	98%	188 bp	96%	99%	92%	93%

¹Ανάκληση=Θετικά/(αληθώς θετικά + ψευδώς αρνητικά)

²Ακρίβεια=Αληθώς θετικά/(αληθώς θετικά + ψευδώς θετικά)

Όριο ανίχνευσης

Για τον έλεγχο του ορίου ανίχνευσης, χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο αναφοράς Horizon HD799 DNA. Το HD799 αποτελείται από μετρίως διακυβευμένο DNA σε φορμόλη με γνωστές SNV σε συχνότητες αλληλόμορφων που κυμαίνονται από 1–24,5%. Χρησιμοποιήθηκε το χαμηλότερο συνιστώμενο υλικό εισόδου DNA (50 ng) και αξιολογήθηκε ο ρυθμός ανίχνευσης των SNV με συχνότητα αλληλομόρφου παραλλαγής (VAF) $\geq 5,0\%$. Δεκαέξι τεχνικά αντίγραφα υποβλήθηκαν σε εξέταση μέσω του προσδιορισμού Illumina DNA Prep with Enrichment Dx με χρήση της ροής εργασιών FFPE, εμπλουτίστηκαν με πάνελ εμπλουτισμού για πολλαπλούς τύπους καρκίνου (1,94 Mb) σε 16 (1-πλεκτικούς) εμπλουτισμούς και, στη συνέχεια, υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση σε όργανο NextSeq 550Dx με τη μονάδα DNA GenerateFASTQ Dx.

Όλα τα δείγματα ικανοποίησαν τις ειδικές για κάθε πάνελ απαιτήσεις απόδοσης δείγματος όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7 Απόδοση δειγμάτων για το όριο ανίχνευσης

Πάνελ	Ποσοστό ανίχνευσης παραλλαγής SNV \geq 5,0% VAF	Μέσος όρος Ομοιομορφία κάλυψης
Πάνελ εμπλουτισμού για πολλαπλούς τύπους καρκίνου (1,94 Mb, 523 γονίδια)	100%	99%

Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Ο αντίκτυπος δυνητικά παρεμβαλλόμενων ουσιών αξιολογήθηκε στο Illumina DNA Prep with Enrichment Dx με την αξιολόγηση της απόδοσης του προσδιορισμού παρουσία παρεμβαλλόμενων ουσιών.

Παρεμβολές σε ολικό αίμα

Η παρακεταμόλη (εξωγενής ένωση, φάρμακο), η κρεατινίνη και τα τριγλυκερίδια (ενδογενείς μεταβολίτες) υποβλήθηκαν σε εξέταση με προσθήκη τους σε δείγματα ανθρώπινου ολικού αίματος πριν από την εκχύλιση DNA. Για την αξιολόγηση των παρεμβολών που προκύπτουν από τη συλλογή αίματος (σύντομη αιμοληψία), προστέθηκε επίσης EDTA σε δείγματα ολικού αίματος. Επιπλέον, για την αξιολόγηση των παρεμβολών που προκύπτουν από την προετοιμασία του δείγματος, προστέθηκε αιθανόλη μοριακού βαθμού καθαρότητας σε DNA που εξήχθη από ολικό αίμα.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ανά παρεμβαλλόμενη ουσία.

Πίνακας 8 Δυνητικά παρεμβαλλόμενες ουσίες και συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν σε ολικό αίμα

Εξεταζόμενη ουσία	Συγκέντρωση εξέτασης
Ακεταμινοφαίνη	15,6 mg/dL* Τρεις φορές την υψηλότερη αναμενόμενη συγκέντρωση μετά τη χορήγηση θεραπευτικής δόσης του φαρμάκου.
Κρεατινίνη	15 mg/dL* Υψηλότερη παρατηρηθείσα συγκέντρωση στον πληθυσμό.
Τριγλυκερίδια	1,5 g/dL* Υψηλότερη παρατηρηθείσα συγκέντρωση στον πληθυσμό.
EDTA	6 mg/mL Τρεις φορές την αναμενόμενη συγκέντρωση στο αίμα, συλλέχθηκε σε σωληνάρια EDTA.
Αιθανόλη μοριακού βαθμού καθαρότητας	15% v/v Στο έκλουσμα μετά την εκχύλιση DNA.

*Σύμφωνα με το έγγραφο EP37-ED1:2018 του CLSI

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Ανά παρεμβαλλόμενη ουσία, 12 τεχνικά αντίγραφα υποβλήθηκαν σε εξέταση μέσω του προσδιορισμού Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, εμπλουτίστηκαν με πάνελ εξώματος 1 (45 Mb) σε μονό (12-πλεκτικό) εμπλουτισμό και, στη συνέχεια, υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση στο όργανο NextSeq 550Dx με τη μονάδα DNA GenerateFASTQ Dx.

Για τις ουσίες που εξετάστηκαν, και τα 12 δείγματα πληρούσαν τις απαιτήσεις απόδοσης δείγματος και δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή στην απόδοση του προσδιορισμού.

Παρεμβολές σε ιστό FFPE

Δύο ορθοκοκικά δείγματα FFPE υποβλήθηκαν σε εξέταση παρουσία και απουσία αιμοσφαιρίνης σε ποσότητα 0,1 mg ανά τομή FFPE 10 μm ώστε να αντιπροσωπευτεί το χειρότερο σενάριο της επιμόλυνσης δείγματος ιστού FFPE κατά 50% με αίμα με υψηλό επίπεδο αιμοσφαιρίνης. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε εξέταση μέσω του προσδιορισμού Illumina DNA Prep with Enrichment Dx με τη χρήση του πάνελ εμπλουτισμού για πολλαπλούς τύπους καρκίνου 1 (1,94 Mb) ως αντιπροσωπευτικού πάνελ σε μονοπλεκτικούς εμπλουτισμούς. Οι εμπλουτισμένες βιβλιοθήκες υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε αλληλούχιση στο όργανο NextSeq 550Dx με τη μονάδα DNA GenerateFASTQ Dx. Όλα τα δείγματα πληρούσαν τις απαιτήσεις απόδοσης δείγματος και καταδείχθηκε ότι η αιμοσφαιρίνη δεν δημιουργεί παρεμβολή στην απόδοση του προσδιορισμού.

Για την αξιολόγηση της παρεμβολής που προκύπτει από την προετοιμασία των δειγμάτων, δύο εξωγενείς ενώσεις προστέθηκαν σε DNA που εξήχθη από δείγμα ιστού FFPE με καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Οι εξωγενείς ουσίες που υποβλήθηκαν σε εξέταση είναι διαλύματα εκχύλισης που χρησιμοποιούνται ευρέως κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης DNA και παρατίθενται με τις εξετασθείσες ποσότητες στον παρακάτω πίνακα.

Τα διαλύματα ουσιών που εξετάστηκαν διατίθενται στο εμπόριο σε κιτ απομόνωσης DNA με βάση στήλες.

Πίνακας 9 Δυνητικά παρεμβαλλόμενες εξωγενείς ουσίες και συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν σε FFPE

Εξεταζόμενη ουσία	Συγκέντρωση εξέτασης (μl / 30 μl εκλούσματος)
Διάλυμα αποπαραφίνωσης	113×10^{-6}
Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης AW2	0,417

Ανά παρεμβαλλόμενη ουσία, οκτώ τεχνικά αντίγραφα μέσω του προσδιορισμού Illumina DNA Prep with Enrichment Dx υποβλήθηκαν σε εξέταση, εμπλουτίστηκαν με πάνελ εμπλουτισμού για πολλαπλούς τύπους καρκίνου (1,94 Mb) σε μονοπλεκτικούς εμπλουτισμούς και, στη συνέχεια, υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση στο όργανο NextSeq 550Dx με τη μονάδα DNA GenerateFASTQ Dx.

Και για τις δύο ουσίες που εξετάστηκαν, και τα οκτώ δείγματα πληρούσαν τις απαιτήσεις απόδοσης δείγματος και δεν παρατηρήθηκε παρεμβολή στην απόδοση του προσδιορισμού.

Διασταυρούμενη μόλυνση

gDNA από κυτταρικές σειρές NA12878 Coriell (θηλυκό, 10 δείγματα), gDNA από κυτταρικές σειρές NA12877 Coriell (αρσενικό, 12 δείγματα) και αρνητικοί μάρτυρες (NTC, 2 δείγματα) υποβλήθηκαν σε εξέταση μέσω του προσδιορισμού Illumina DNA Prep with Enrichment Dx σε διάταξη σκακιέρας (checkerboard). Σε όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη συνιστώμενη τιμή (1.000 ng) για το υλικό εισόδου gDNA ως η αυστηρότερη προϋπόθεση για την αξιολόγηση της διασταυρούμενης επιμόλυνσης των δειγμάτων. Ο έλεγχος διενεργήθηκε δύο φορές από δύο διαφορετικούς χειριστές. Χρησιμοποιήθηκε πάνελ εξώματος 1 (45 Mb) σε αντιδράσεις 12-πλεκτικού εμπλουτισμού. Οι εμπλουτισμένες βιβλιοθήκες υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση στο NextSeq 550Dx με το DNA GenerateFASTQ Dx. Η εκτίμηση πραγματοποιήθηκε με αξιολόγηση της κάλυψης του αρρενο-ειδικού χρωμοσώματος Y στα θηλυκά δείγματα με σύγκριση με τα επίπεδα βάσης μιας πλήρους πλάκας θηλυκών δειγμάτων, καθώς και της εκπροσώπησης δεικτών των δειγμάτων NTC.

Πίνακας 10 Αποτελέσματα για τη διασταυρούμενη επιμόλυνση

Θηλυκά δείγματα με κάλυψη αρρενο-ειδικού χρωμοσώματος Y σε < 3x θόρυβο γραμμής βάσης	Εκπροσώπηση δεικτών σε NTC
100%	< 0,0005%

Παράρτημα: Αλληλουχίες προσαρμογών UD δεικτών της Illumina

Αυτοί οι προσαρμογείς μοναδικών διπλών (UD) δεικτών είναι τοποθετημένοι στην πλάκα για την επιβολή της συνιστώμενης στρατηγικής σύζευξης. Οι προσαρμογείς δεικτών έχουν μήκος 10 βάσεων αντί του τυπικού μήκους των οκτώ βάσεων.

Προσαρμογείς δείκτη 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Προσαρμογείς δεικτών 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Η παρακάτω αλληλουχία χρησιμοποιείται για την περικοπή προσαρμογών στην ανάγνωση 1 και στην ανάγνωση 2.

CTGTCTCTTATACACATCT

Προσαρμογείς δεικτών πλάκας A/σετ 1

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

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

illumina®

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

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

illumina®

Όνομα δείκτη	Βάσεις i7 σε προσαρμογέα	Βάσεις i5 σε προσαρμογέα
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	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

Όνομα δείκτη	Βάσεις i7 σε προσαρμογέα	Βάσεις i5 σε προσαρμογέα
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGAAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Προσαρμογείς δεικτών πλάκας B/σετ 2

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

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

illumina®

Όνομα δείκτη	Βάσεις i7 σε προσαρμογέα	Βάσεις i5 σε προσαρμογέα
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
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

illumina®

Όνομα δείκτη	Βάσεις i7 σε προσαρμογέα	Βάσεις i5 σε προσαρμογέα
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGTAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA

Ένθετο συσκευασίας Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

illumina®

Όνομα δείκτη	Βάσεις i7 σε προσαρμογέα	Βάσεις i5 σε προσαρμογέα
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTA CT

Ιστορικό αναθεώρησης

Έγγραφο	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 200019584 έκδ. 02	Σεπτέμβριος 2022	Προστέθηκε περιεχόμενο ώστε να υποστηριχτεί η αλληλούχιση στο όργανο NovaSeq 6000Dx Instrument.
Αρ. εγγράφου 200019584 έκδ. 01	Μάιος 2022	Προστέθηκαν ονόματα και αριθμοί καταλόγου των συστημάτων αλληλούχισης. Αφαιρέθηκαν οι πληροφορίες μοναδικής διπλής ευρετηρίασης για τις βιβλιοθήκες με μονό δείκτη.
Αρ. εγγράφου 200019584 έκδ. 00	Μάιος 2022	Αρχική δημοσίευση.

Διπλώματα ευρεσιτεχνίας και εμπορικά σήματα

Το παρόν έγγραφο και τα περιεχόμενά του αποτελούν ιδιοκτησία της Illumina, Inc. και των συνδεδεμένων εταιρειών της («Illumina») και προορίζονται αποκλειστικά για τη συμβατική χρήση του πελάτη της σε συνδυασμό με τη χρήση του προϊόντος/των προϊόντων που περιγράφεται/-ονται στο παρόν έγγραφο και για κανέναν άλλον σκοπό. Απαγορεύεται η χρήση ή η διανομή του παρόντος εγγράφου και των περιεχομένων του για οποιονδήποτε άλλον σκοπό ή/και άλλη κοινοποίηση, αποκάλυψη ή αναπαραγωγή τους με οποιονδήποτε τρόπο χωρίς την πρότερη έγγραφη συναίνεση της Illumina. Η Illumina δεν μεταβιβάζει διά του παρόντος εγγράφου καμία άδεια δυνάμει διπλώματος ευρεσιτεχνίας, εμπορικού σήματος, πνευματικού δικαιώματος ή δικαιωμάτων κοινού δικαίου της.

Οι οδηγίες στο παρόν έγγραφο πρέπει να τηρούνται αυστηρά και με ακρίβεια από ειδικευμένο και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό, προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθή και ασφαλή χρήση του προϊόντος/των προϊόντων που περιγράφεται/-ονται στο παρόν. Όλα τα περιεχόμενα του παρόντος εγγράφου πρέπει να αναγνωσθούν και να γίνουν πλήρως κατανοητά πριν από τη χρήση του εν λόγω προϊόντος/των εν λόγω προϊόντων.

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΜΗ ΠΛΗΡΟΥΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΡΗΣΗΣ ΜΕ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΟΔΗΓΙΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ, ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΡΟΚΛΗΘΕΙ ΖΗΜΙΑ ΣΤΟ ΠΡΟΪΟΝ/ΣΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ, ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΧΡΗΣΤΩΝ Ή ΑΛΛΩΝ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗ ΥΛΙΚΗ ΖΗΜΙΑ, ΚΑΙ ΘΑ ΚΑΤΑΣΤΕΙ ΑΚΥΡΗ Η ΕΓΓΥΗΣΗ ΠΟΥ ΙΣΧΥΕΙ ΓΙΑ ΤΟ ΠΡΟΪΟΝ/ΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.

Η ILLUMINA ΔΕΝ ΑΝΑΛΑΜΒΑΝΕΙ ΚΑΜΙΑ ΕΥΘΥΝΗ ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΕΕΙ ΑΠΟ ΕΣΦΑΛΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ/ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΑΦΕΤΑΙ/-ΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ [ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ/ΤΟΥΣ Ή ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ].

© 2022 Illumina, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Όλα τα εμπορικά σήματα είναι ιδιοκτησία της Illumina, Inc. ή των αντίστοιχων κατόχων τους. Για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τα εμπορικά σήματα, επισκεφτείτε την ηλεκτρονική διεύθυνση www.illumina.com/company/legal.html.

Στοιχεία επικοινωνίας



Illumina

5200 Illumina Way

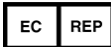
San Diego, California 92122 Η.Π.Α.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (εκτός Βορείου Αμερικής)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Κάτω Χώρες

Χορηγός στην Αυστραλία

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Αυστραλία

Επισήμανση προϊόντος

Για μια πλήρη αναφορά των συμβόλων που εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση του προϊόντος, ανατρέξτε στο υπόμνημα συμβόλων στη διεύθυνση support.illumina.com στην καρτέλα *Documentation* (Τεκμηρίωση) του κιτ σας.