

SAMO ZA DIAGNOSTIČNO UPORABO IN VITRO

SAMO ZA IZVOZ

## Predvidena uporaba

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit je komplet reagentov in potrošnega materiala za pripravo knjižnic vzorcev iz genomskega DNK, pridobljenega iz človeških celic in tkiva. Za pripravo knjižnic, usmerjenih na določene genomske regije, potrebujete plošče s sondami, ki jih dobavi uporabnik. Ustvarjene knjižnice vzorcev so namenjene za uporabo s sistemom za sekvenciranje družbe Illumina.

## Načela postopka

Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je namenjen pripravi knjižnic za sekvenciranje DNK, obogatenih za ciljne regije iz genomskega DNK, pridobljenega iz človeških celic in tkiv.

Za obogatitev cilja so potrebne biotinitirane oligonukleotidne ploščice, ki jih dobavi uporabnik. Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z različnimi velikostmi ploščic, vključno z majhnimi ploščicami (< 20.000 sond) in velikimi ploščicami (> 200.000 sond). Ustvarjene obogatene knjižnice so namenjene za sekvenciranje s sistemi za sekvenciranje družbe Illumina.

Postopek Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vključuje te korake:

- **Označevanje genomskega DNK** – uporabljen je reagent Enrichment BLT Small (eBLTS) (BLT za obogatitev – majhen (eBLTS)) za označevanje vnosa DNK. Med označevanjem je gDNK fragmentiran in označen z vmesniki v enem koraku. Za saturacijo eBLTS v reakciji označevanja je potreben vnos DNK najmanj 50 ng. Ko je ustvarjena saturacija, eBLTS fragmentira določeno število molekul DNK in ustvari normalizirane knjižnice s konsistentno porazdelitvijo velikosti fragmentov.
- **Čiščenje po označevanju** – očiščen je DNK, označen z vmesnikom, v reagentu eBLTS, za uporabo pri pomnožitvi.
- **Pomnožitev označenega DNK** – pomnožen je označeni DNK s programom PCR z omejenim ciklom. Na koncu fragmentov DNK so dodana enolična dvojna (UD) indeksiranja, ki omogočajo dvojno enolično črtno kodiranje knjižnic DNK in ustvarjanje gruč med sekvenciranjem.
- **Čiščenje knjižnic** – uporabljen je postopek čiščenja s kroglicami za čiščenje in izbiro velikosti pomnoženih knjižnic DNK.
- **Združevanje knjižnic** – združene so knjižnice DNK z enoličnimi indeksi v eno združitvev z največ 12 knjižnicami. Knjižnice lahko združite glede na volumen ali maso.
- **Hibridizacija sond** – postopek vključuje hibridizacijsko reakcijo, med katero so denaturirane knjižnice DNK z dvema verigama, ploščica z biotinitiranimi sondami DNK pa je hibridizira na ciljne genomske regije.
  - Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z več ploščicami. Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne vključuje ploščice za obogatitev. Ploščice s sondami dobavi uporabnik in morajo biti v skladu z zahtevanimi specifikacijami. Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

združljivi z oligonukleotidnimi ploščicami za obogatitev DNK družbe Illumina in drugih izdelovalcev, ki so v skladu z zahtevanimi specifikacijami. Za informacije o zahtevanih specifikacijah za ploščice drugih izdelovalcev glejte [Zahteve za ploščico s sondo za obogatitev na strani 11](#).

- **Zajemanje hibridiziranih sond** – uporabljen je reagent Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) (Streptavidinske magnetne kroglice (SMB3)) za zajem biotinitiranih sond, hibridiziranih glede na ciljne regije.
- **Pomnožitev obogatenih knjižnic** – uporabljen je PCR za pomnožitev obogatenih knjižnic.
- **Čiščenje pomnoženih obogatenih knjižnic** – uporabljen je postopek čiščenja s kroglicami za namene prečiščevanja obogatenih knjižnic, pripravljenih za postopek sekvenciranja.
- **Sekvenciranje** – izvedeno je sekvenciranje obogatenih knjižnic v sistemu za sekvenciranje MiSeqDx, NextSeq 550Dx ali NovaSeq 6000Dx. Za sistema MiSeqDx in NextSeq 550Dx je integrirani modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager uporabljen za nastavitev izvedbe sekvenciranja, nadzor izvedbe in primarno analizo (ustvarjanje FASTQ iz dodelitve baze). Za sistem NovaSeq 6000Dx je aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx uporabljena za nastavitev izvedbe sekvenciranja in sekundarno analizo z več razpoložljivimi poteki dela.

## Omejitve postopka

- Samo za diagnostično uporabo *in vitro*.
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z genomskim DNK, pridobljenim iz človeških celic in tkiv.
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z vnosi gDNK z dvema verigama 50–1000 ng. Učinkovitost ni zagotovljena pri vnosih zunaj teh mejnih vrednosti.
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne vključuje reagentov za ekstrakcijo DNK. Rezultati analitičnega testiranja, vključno s testiranjem motenj, ki so navedeni v razdelku [Značilnosti delovanja na strani 57](#), so bili pridobljeni s polno krvjo in tkivom FFPE, kot reprezentativnima vrstama vzorcev, z reprezentativnimi kompleti za ekstrakcijo DNK. Za vse diagnostične teste, razvite za uporabo z reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, je treba izvesti celovito preverjanje vseh vidikov učinkovitosti postopkov, izvedenih z izbranim kompletom za ekstrakcijo DNK.
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ni priporočen za vzorce FFPE slabe kakovosti z vrednostjo  $\Delta Cq > 5$ . Uporaba vzorcev z vrednostjo  $\Delta Cq > 5$  poveča verjetnost neuspešne priprave knjižnice in zmanjša možnost učinkovitosti testa.
- Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so bili konfigurirani in testirani za vnos vzorca, reakcije obogatitve in združevanje, kot je navedeno v spodnji tabeli.

<b>Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit</b>	<b>Vnos vzorca</b>	<b>Reakcije obogatitve</b>	<b>Združitve obogatitve</b>
Komplet s 16 vzorci	Nizka kakovost (FFPE)	16 reakcij	1 združitev
Komplet s 96 vzorci	Visoka kakovost (npr. polna kri)	8 reakcij	12 združitev

- Obdelava vnosa FFPE je bila testirana in je priporočena izključno za reakcije obogatitve z 1 združitvijo z uporabo kompleta s 16 vzorci.
- Za komplet s 96 vzorci so možne nestandardne združitve (od 2 do 11 združitev), vendar zanje obstajajo te omejitve:
  - Obdelava vzorcev v reakcijah obogatitve z 2 do 11 združitvami zmanjša učinkovitost delovanja kompleta.
  - Optimalni rezultati niso zagotovljeni. Za doseganje ustreznega donosa obogatitve za nestandardne združitve je lahko potrebna dodatna optimizacija.
  - Pri strategijah združevanja z malo združitvami (od 2 do 8 združitev) morate izbrati vmesnike indeksiranja z različnimi sekvencami, da optimizirate barvno ravnovesje za uspešno sekvenciranje in analizo podatkov. Modul DNA GenerateFASTQ Dx v instrumentih MiSeqDx in NextSeq 550Dx možnosti za barvno uravnotežene indeksne kombinacije med nastavitvijo izvedbe sekvenciranja. Za več informacij o strategijah združevanja glejte [Metode združevanja na strani 33](#).
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je omejen na zagotavljanje obogatenih knjižnic, ki so sekvencirane samo v instrumentih MiSeqDx, NextSeq 550Dx in NovaSeq 6000Dx. Za uporabo sistemov za sekvenciranje je treba izvesti celovito preverjanje vseh vidikov učinkovitosti postopkov.
- Ploščice za obogatitev niso vključene kot del tega izdelka. Rezultati analitičnega preskušanja, ki so navedeni v razdelku [Značilnosti delovanja na strani 57](#), so bili pridobljeni z reprezentativnimi ploščicami za obogatitev in so na voljo samo za informativne namene. Značilnosti analitičnega delovanja služijo kot primer splošnih zmogljivosti testa in ne določajo zmogljivosti ali primernosti glede kakršnih koli določenih trditev v zvezi s testom. Za vse diagnostične teste, razvite za uporabo s temi reagenti, je treba izvesti celovito preverjanje vseh vidikov učinkovitosti postopkov.
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv s ploščicami za obogatitev družbe Illumina in drugih izdelovalcev. Vendar pa delovanje ploščic za obogatitev drugih izdelovalcev, ki ne izpolnjujejo zahtev glede ploščic, ni zagotovljeno. Za več informacij glede zahtev za ploščico glejte [Zahteve za ploščico s sondo za obogatitev na strani 11](#).
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit uporablja 2-urni čas hibridizacije. Uporaba daljšega časa hibridizacije lahko vpliva na metriko učinkovitosti delovanja.
- Moduli DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager za MiSeqDx in NextSeq 550Dx zagotavljajo samo datoteke FASTQ. Če uporabljate te module, morate izvesti preverjanje sekundarne analize.

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

- Aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je na voljo v sistemu NovaSeq 6000Dx. Aplikacija podpira več potekov dela sekundarne analize, vključno z ustvarjanjem datoteke FASTQ, ustvarjanjem datotek FASTQ in VCF za zaznavanje različice zarodne linije ter ustvarjanjem datotek FASTQ in VCF za zaznavanje somatske različice. Če porabljate aplikacijo za ustvarjanje datoteke VCF, vam ni treba izvesti preverjanja sekundarne analize.
- Za omejitve aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pri uporabi z instrumentom NovaSeq 6000Dx glejte *Navodila za uporabo za NovaSeq 6000Dx (dokument št. 200025276)*.

## Komponente izdelka

Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vključuje te komponente.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, kataloška št. 20051354 (16 vzorcev) ali št. 20051352 (96 vzorcev)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, kataloška št. 20051355 (16 vzorcev) ali št. 20051353 (96 vzorcev)
- Modul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx za NextSeq 550Dx, kataloška št. 20063024
- Modul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx za MiSeqDx, kataloška št. 20063022
- Aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za NovaSeq 6000Dx, kataloška št. 20074609

## Priloženi reagenti

Za dokončanje postopka Illumina DNA Prep with Enrichment Dx potrebujete komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A ali Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. S kompletom s 16 ali 96 vzorci lahko izvedete to število priprav knjižnic ali reakcij obogatitve.

<b>Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit</b>	<b>Vnos vzorca</b>	<b>Reakcije obogatitve</b>	<b>Združitev obogatitve</b>
Komplet s 16 vzorci	Nizka kakovost (FFPE)	16 reakcij	1 združitev
Komplet s 96 vzorci	Visoka kakovost (npr. polna kri)	8 reakcij	12 združitvev

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

### Reagenti Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, shranjevanje pri temperaturi od 15 °C do 30 °C

Ti reagenti so dobavljeni pri sobni temperaturi. Nemudoma shranite reagente v skladu z določenimi temperaturami za shranjevanje, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja.

Ime reagenta	Količina epruвет		Barva pokrovčka	Volumen napoljenosti	Aktivne sestavine
	16 vzorcev (št.20050020)	96 vzorcev (št.20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2) (Tagmentacijski pufer za ustavitev 2 (ST2))	1	4	Rdeča	350 µl	Raztopina detergenta v vodi.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2) (Tagmentacijski pufer za izpiranje 2 (TWB2))	1	1	Zelena	41 ml	Pufirana vodna raztopina, ki vsebuje detergent in sol.
Cleanup Beads (CB) (Kroglice za čiščenje (CB))	1	Ni na voljo*	Rdeča	10 ml	Paramagnetne kroglice trdne faze v pufirani vodni raztopini.

\* Kroglice za čiščenje za 96 vzorcev so vključene v komplet Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (št. 20050030).

### Kroglice za čiščenje Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 vzorcev), shranjevanje pri temperaturi od 15 °C do 30 °C

Za komplete s 96 vzorci so kroglice za čiščenje priložene reagentu Illumina Prep Dx Cleanup Beads (kataloška št. 20050030). Ta reagent je dobavljen pri sobni temperaturi. Nemudoma shranite reagente v skladu z določenimi temperaturami za shranjevanje, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja. Za komplete s 16 vzorci so kroglice za čiščenje priložene kompletu reagentov Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (kataloška št. 20050020).

Ime reagenta	Količina	Barva pokrovčka	Volumen napoljenosti	Aktivne sestavine
Cleanup Beads (CB) (Kroglice za čiščenje (CB))	4	Rdeča	10 ml	Paramagnetne kroglice trdne faze v pufrirani vodni raztopini.

## Reagenti Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, shranjevanje pri temperaturi od 2 °C do 8 °C

Ti reagenti so dobavljeni v hladilniku. Nemudoma shranite reagente v skladu z določenimi temperaturami za shranjevanje, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja. Epruveto z zalogo eBLTS hranite pokonci, tako da so kroglice vedno potopljene v pufru.

Ime reagenta	Količina epruвет		Barva pokrovčka	Volumen napoljenosti		Aktivne sestavine
	16 vzorcev (št. 20050021)	96 vzorcev (št. 20050026)		16 vzorcev	96 vzorcev	
Enrichment BLT Small (eBLTS) (BLT za obogatitev – majhen (eBLTS))	1	4	Rumena	200 µl	290 µl	Streptavidinske magnetne kroglice, povezane s transpozoni v pufrirani vodni raztopini, ki vsebuje glicerol, EDTA, ditiotritol, sol in detergent.
Resuspension Buffer (RSB) (Pufer za resuspendiranje (RSB))	1	4	Prozorno	1,8 ml	1,8 ml	Pufrirana vodna raztopina.

## Reagenti Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, shranjevanje pri temperaturi od -25 °C do -15 °C

Ti reagenti so dobavljeni zamrznjeni. Nemudoma shranite reagente v skladu z določenimi temperaturami za shranjevanje, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja.

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Ime reagenta	Količina epruвет		Barva pokrovčka	Volumen napolnjenosti		Aktivne sestavine
	16 vzorcev (št. 20050022)	96 vzorcev (št.20050027)		16 vzorcev	96 vzorcev	
Tagmentation Buffer 1 (TB1) (Tagmentacijski pufer 1 (TB1))	1	4	Prozorno	290 µl	290 µl	Pufirana vodna raztopina, ki vsebuje magnezijevo sol in dimetilformamid.
Enhanced PCR Mix (EPM) (Okrepljena mešanica PCR (EPM))	2	4	Prozorno	200 µl	610 µl	Polimeraza DNK in dNTP v pufirani vodni raztopini.

## Reagenti Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 vzorcev), shranjevanje pri temperaturi od 2 °C do 8 °C

Za komplete s 16 vzorci so v reagente Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloška št. 20050023) vključeni ti reagenti. Za komplete s 96 vzorci so v reagente Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloška št. 20050028) vključeni ti reagenti.

Ti reagenti so dobavljeni v hladilniku. Nemudoma shranite reagente v skladu z določenimi temperaturami za shranjevanje, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja.

Ime reagenta	Količina epruвет	Barva pokrovčka	Volumen napolnjenosti	Aktivne sestavine
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) (Streptavidinske magnetne kroglice (SMB3))	4	Prozorno	1,2 ml	Streptavidinske magnetne kroglice v pufirani vodni raztopini, ki vsebuje formamid, detergent in sol.
Resuspension Buffer (RSB) (Pufer za resuspendiranje (RSB))	1	Prozorno	1,8 ml	Pufirana vodna raztopina.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) (Obogatitveni hibridni pufer 2 (EHB2))	1	Prozorno	200 µl	Pufirana vodna raztopina, ki vsebuje detergent in sol.
Elute Target Buffer 2 (ET2) (Ciljni pufer za elucijo 2 (ET2))	1	Prozorno	200 µl	Pufirana vodna raztopina.

## Reagenti Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 vzorcev), shranjevanje pri temperaturi od 2 C do 8 °C

Za komplete s 96 vzorci so v reagente Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloška št. 20050028) vključeni ti reagenti. Za komplete s 16 vzorci so v reagente IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloška št. 20050023) vključeni ti reagenti.

Ti reagenti so dobavljeni v hladilniku. Nemudoma shranite reagente v skladu z določenimi temperaturami za shranjevanje, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja.

Ime reagenta	Količina epruвет	Barva pokrovčka	Volumen napolnjenosti	Aktivne sestavine
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) (Streptavidinske magnetne kroglice (SMB3))	2	Prozorno	1,2 ml	Streptavidinske magnetne kroglice v pufrirani vodni raztopini, ki vsebuje formamid, detergent in sol.
Resuspension Buffer (RSB) (Pufer za resuspendiranje (RSB))	4	Prozorno	1,8 ml	Pufrirana vodna raztopina.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) (Obogatitveni hibridni pufer 2 (EHB2))	1	Prozorno	200 µl	Pufrirana vodna raztopina, ki vsebuje detergent in sol.
Elute Target Buffer 2 (ET2) (Ciljni pufer za elucijo 2 (ET2))	1	Prozorno	200 µl	Pufrirana vodna raztopina.



## Reagenti Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, shranjevanje pri temperaturi od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$

Ti reagenti so dobavljeni zamrznjeni. Nemudoma shranite reagente v skladu z določenimi temperaturami za shranjevanje, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja.

Ime reagenta	Količina epruвет		Barva pokrovčca	Volumen napolnjenosti	Aktivne sestavine
	16 vzorcev (št. 20050024)	96 vzorcev (št. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1) (Obogatitveni pufer za elucijo 1 (EE1))	1	1	Prozorno	580 $\mu\text{l}$	Raztopina detergenta v vodi.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) (Okrepljeni obogatitveni pufer za izpiranje (EEW))	4	4	Janterna	4,1 ml	Pufirana vodna raztopina, ki vsebuje soli in detergent.
PCR Primer Cocktail (PPC) (Koktajl začetnikov PCR (PPC))	1	1	Prozorno	320 $\mu\text{l}$	Mešanica začetnikov PCR (oligonukleotidov).
2N NaOH (HP3)	1	1	Prozorno	200 $\mu\text{l}$	Raztopino natrijevega hidroksida 2N (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2) (Pufer HYB 2 + Blokatorji IDT NXT (NHB2))	2	1	Modra	480 $\mu\text{l}$	Pufirana vodna raztopina s Cot-1 DNA, sredstvom za zapiranje in formamidom.
Enhanced PCR Mix (EPM) (Okrepljena mešanica PCR (EPM))	2	1	Prozorno	200 $\mu\text{l}$	Polimeraza DNK in dNTP v pufirani vodni raztopini.

## Komplet indeksov Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, shranjevanje pri temperaturi od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$

Ti reagenti so dobavljeni zamrznjeni. Nemudoma shranite reagente v skladu z določenimi temperaturami za shranjevanje, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja. Za sekvence vmesnika indeksiranja glejte [Dodatek: sekvence vmesnika enoličnega dvojnega \(UD\) indeksiranja Illumina na strani 61](#).

Komponenta	Količina
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 indeksov), št. 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 indeksov), št. 20050039	1

## Reagenti, ki niso priloženi

### Potrebni reagenti, ki niso priloženi

- Reagenti za ekstrakcijo in čiščenje DNK
- Reagenti za kvantifikacijo DNK
- Etanol (molekularno biološke stopnje 200)
- Voda brez nukleaze
- 1M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- Raztopina 1N NaOH, molekularno biološke stopnje
- Če uporabljate sistem za sekvenciranje NextSeq 550Dx:
  - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (katalogška št. 20028871)
- Če uporabljate sistem za sekvenciranje MiSeqDx:
  - MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalogška št. 20037124)
- Če uporabljate sistem za sekvenciranje NovaSeq 6000Dx:
  - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (katalogška št. 20046931)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (katalogška št. 20046933)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalogška št. 20062292)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalogška št. 20062293)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalogška št. 20062290)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (katalogška št. 20062291)

## Zahteve za ploščico s sondo za obogatitev

Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so združljivi z oligonukleotidnimi ploščicami za obogatitev DNK družbe Illumina in drugih izdelovalcev. Če uporabljate biotinitirane sonde DNK drugih izdelovalcev (fiksne ploščice ali ploščice po meri), se prepričajte, da so skladne z določenimi specifikacijami.

Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je bil optimiziran in potrjen ob upoštevanju teh specifikacij, določenih za ploščice drugih izdelovalcev. Pri uporabi ploščic drugih izdelovalcev, ki ne ustrezajo specifikacijam, ni zagotovljena združljiva učinkovitost delovanja.

- Dolžina ploščice 80 bp ali 120 bp
- Od 500 do 675.000 sond
- DNK z eno ali dvema verigama
- Skupni vnos sonde  $\geq 3$  pmol za obogatitev pri združitvah od 1 do 12 združitvev

## Shranjevanje in ravnanje

- Sobna temperatura je določena kot temperatura od 15 °C do 30 °C.
- Reagenti so stabilni, če jih shranjujete v skladu z navodili do datuma poteka uporabnosti, navedenega na nalepkah kompleta. Za temperature za shranjevanje glejte [Priloženi reagenti na strani 4](#).
- Zamrznjeni reagenti so stabilni največ štiri cikle zamrzovanja in odmrzovanja pred navedenim datumom poteka uporabnosti.
- Postopek Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vključuje te točke varne ustavitve:
  - Po izvedbi postopka [Pomnožitev označenega DNK na strani 29](#) so pomnožene knjižnice stabilne največ 30 dni pri shranjevanju pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.
  - Po izvedbi postopka [Čiščenje knjižnic na strani 31](#) so očiščene pomnožene knjižnice stabilne največ 30 dni pri shranjevanju pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.
  - Po izvedbi postopka [Združevanje predhodno obogatenih knjižnic na strani 33](#) so združene knjižnice stabilne največ 30 dni pri shranjevanju pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.
  - Po izvedbi postopka [Pomnožitev obogatene knjižnice na strani 45](#) lahko ploščico z obogatenimi, pomnoženimi knjižnicami pustite v cikličnem termostatu največ 24 ur. Ploščico lahko shranite tudi pri temperaturi od 2 °C do 8 °C za največ 48 ur.
  - Končne očiščene obogatene knjižnice so stabilne največ 7 dni pri shranjevanju pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.
- Če je embalaža ali vsebina kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit poškodovana ali kakor koli drugače prizadeta, se obrnite na podporo za stranke družbe Illumina.
- Reagent Stop Tagment Buffer 2 (ST2) (Tagmentacijski pufer za ustavitev 2 (ST2)) lahko povzroči tvorbo vidnih precipitativ ali kristalov. Če opazite precipitate, segrevajte 10 minut pri temperaturi 37 °C in nato vrtinčite, dokler se precipitati ne raztopijo.

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

- Reagenta Hybridization Oligos (HYB) (Oligonukleotidi za hibridizacijo (HYB)) in Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) (Okrepljeni obogatitveni pufer za izpiranje (EEW)) morate predogreti na enako temperaturo, kot je temperatura zadržanja hibridizacije, uporabljena za posamezne vrste vzorcev in ploščice s sondo. Za več informacij o ravnanju z reagentoma NHB2 in EEW glejte [Opombe glede postopka na strani 16](#).
- Reagenta Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) (Obogatitveni hibridni pufer 2 (EHB2)) in HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) (Pufer HYB 2 + Blokatorji IDT NXT (NHB2)) lahko povzročita nastanek kristalov in motnost. Če opazite kristale in motnost, izvedite postopek vrtničenja ali pipetirajte gor in dol, dokler raztopina ni bistra. Pred izvedbo pipetiranja predogrejte NHB2.
- Pri ravnanju z reagentom Cleanup Beads (CB) (Kroglice za čiščenje (CB)) uporabite te najboljše prakse:
  - Nikoli ne zamrzujte kroglic.
  - Tik pred uporabo kroglice vrtničite, dokler niso resuspendirane in barva ni homogena.
- Pri ravnanju z reagentom Enrichment BLT Small (eBLTS) (BLT za obogatitev – majhen (eBLTS)) uporabite te najboljše prakse:
  - Epruveto z reagentom eBLTS hranite pokonci, tako da so kroglice vedno potopljene v pufru.
  - eBLTS temeljito vrtničite, dokler kroglice niso resuspendirane. Da preprečite ponovno usedanje kroglic, centrifugiranje pred pipetiranjem ni priporočljivo.
  - Če so kroglice prilepljene na stranico ali vrh ploščice s 96 vdolbinicami, centrifugirajte pri 280 × g 3 sekunde, nato pa jih pipetirajte, da se resuspendirajo.
- Pri ravnanju s ploščicami vmesnika indeksiranja upoštevajte te najboljše prakse:
  - Vzorcev ne dodajajte na ploščico vmesnika indeksiranja.
  - Vsaka vdolbinica na indeksni ploščici je namenjena samo za enkratno uporabo.

## Potrebna oprema in pripomočki, ki niso priloženi

Preden začnete izvajati protokol, se prepričajte, da imate poleg kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, na voljo tudi vso potrebno opremo in pripomočke.

### Oprema

Pred začetkom protokola se prepričajte, da imate pripravljeno potrebno opremo.

Protokol je bil optimiziran in potrjen z uporabo elementov z navedenimi specifikacijami. Pri uporabi opreme, ki ne ustreza specifikacijam, ni zagotovljena primerljiva učinkovitost delovanja.

Nekateri elementi so potrebni samo za določene delovne postopke. Ti elementi so navedeni v ločenih tabelah.

- Ciklični termostat s temi specifikacijami:
  - Ogrevan pokrov
  - Najmanjše območje nadzora temperature od 10 °C do 98 °C
  - Najmanjša temperaturna natančnost ±0,25 °C

- Največji volumen reakcije 100 µl
- Združljivo s ploščicami PCR s 96 vdolbinicami in polnim krilom
- Inkubator za mikrovzorke z temi specifikacijami:
  - Temperaturno območje okolja +5,0 °C do 99,0 °C
  - Združljivo s ploščicami MIDI s 96 vdolbinicami
- Vstavki za inkubator za mikrovzorke, združljivi s ploščicami MIDI s 96 vdolbinicami
- Visokohitrostni stresalnik mikroploščic z razponom hitrosti mešanja 200–3000 vrt./min
- Magnetno stojalo, združljivo s ploščicami PCR s 96 vdolbinicami
- Magnetno stojalo, združljivo s ploščicami MIDI s 96 vdolbinicami
- Fluorometer, združljiv z vašo metodo kvantifikacije
- Analizator fragmentov DNK
- Natančne pipete:
  - Enokanalne in večkanalne pipete 10 µl
  - Enokanalne in večkanalne pipete 20 µl
  - Enokanalne in večkanalne pipete 200 µl
  - Enokanalne pipete 1000 µl
  - Natančne pipete zagotavljajo natančno odmerjanje reagentov in vzorcev. Enokanalne ali večkanalne pipete lahko uporabljate, če jih redno umerjate in zagotavljajo natančnost do 5 % navedenega volumna.
- Centrifuga za mikroploščice
- Mikrocentrifuga
- Eden od teh sistemov za sekvenciranje družbe Illumina:
  - Instrument MiSeqDx, kataloška št. DX-410-1001
  - Instrument NextSeq 550Dx, kataloška št. 20005715
  - Instrument NovaSeq 6000Dx, kataloška št. 20068232
- [Izbirno] Vakuumski koncentrador
- [FFPE] Sistem za zaznavanje PCR v realnem času

## Pripomočki

Pred začetkom protokola se prepričajte, da imate pripravljeno potrebno opremo.

Nekateri elementi so potrebni samo za določene delovne postopke. Ti elementi so navedeni v ločenih tabelah.

Protokol je bil optimiziran in potrjen z uporabo navedenih elementov. Pri uporabi nadomestnih pripomočkov ni zagotovljena združljiva učinkovitost.

- Filtrirane konice za pipete
- Konične epruvete za centrifugiranje, 15 ml ali 50 ml

- Mikrocentrifugalne epruvete 1,5 ml
- Večkanalni rezervoarji za reagente brez RNase/DNase, za enkratno uporabo
- 8-tračne epruvete in pokrovčki brez RNase/DNase
- Serološke pipete
- Polipropilenska ploščica za shranjevanje s 96 globokimi vdolbinicami, 0,8 ml (ploščica MIDI)
- Ploščice PCR s 96 vdolbinicami s trdnim ohišjem in polnim krilom
- [FFPE] Ploščice qPCR, združljive z instrumentom qPCR
- Lepilna tesnila za ploščice s 96 vdolbinicami s temi specifikacijami:
  - Optično prozoren poliester, ki ga je mogoče odstraniti
  - Primerno za ploščice PCR s krilom
  - Močno lepilo, ki je obstojno na večkratne temperaturne spremembe od –40 °C do 110 °C
  - Brez DNase/RNase
- Plastični potrošni materiali, združljivi z izbranim načinom kvantifikacije
- Komplet za fluorometrično kvantifikacijo dsDNK, združljiv z izbranim sistemom za kvantifikacijo:
  - Za kvantifikacijo predhodno obogatenih pomnoženih knjižnic lahko uporabite komplet za kvantifikacijo širokega razpona.
  - Za kvantifikacijo obogatenih knjižnic je območje kompleta za kvantifikacijo odvisno od uporabljene ploščice s sondo.
- Komplet za analizo fragmentov za kvalifikacijo knjižnice z izbranim sistemom kvalifikacije:
  - Za kvalifikacijo predhodno obogatenih pomnoženih knjižnic lahko uporabite komplet širokega razpona.
  - Za kvalifikacijo obogatenih knjižnic je območje kompleta za kvalifikacijo odvisno od uporabljene ploščice s sondo.
- [Izbirno] Komplet za ekstrakcijo DNK iz človeških celic in tkiv. Uporabite lahko katero koli potrjeno metodo ekstrakcije.

## Zbiranje, prevoz in shranjevanje primerkov



### OPOZORILO

Z vsemi primerki ravnajte kot z morebitnimi povzročitelji okužb.

- Ta analiza je združljiva z genomskim DNK, pridobljenim iz človeških celic in tkiv.
- Pri komercialno dostopnem prečiščenem gDNK se prepričajte, da so bili vzorci transportirani v skladu z ustreznimi pogoji in shranjeni v skladu z navodili proizvajalca. Upoštevajte najboljše prakse za shranjevanje in cikle zamrzovanja ter odmrzovanja za gDNK.

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

- Pri vnosu polne krvi upoštevajte zahteve za zbiranje, prevoz in shranjevanje krvi, ki veljajo za izbrano metodo ekstrakcije DNK. Uporabite lahko katero koli potrjeno metodo ekstrakcije. Prevoz polne krvi mora biti v skladu z državnimi, zveznimi in lokalnimi predpisi za prevoz etioloških sredstev.
- Za ekstrakcijo DNK iz tkiva FFPE lahko uporabite katero koli potrjeno metodo ekstrakcije. Upoštevajte navodila in priporočila, ki veljajo za izbrano metodo ekstrakcije, za določanje teh postopkov:
  - Metoda fiksacije v formalinu in vklopa v parafin za tkiva za zagotavljanje najboljše kakovosti ekstrahiranega DNK.
  - Shranjevanje primerkov FFPE.
  - Zahteve glede potrebne opreme za začetek izvajanja postopka, kot sta število in debelina delcev FFPE. Pri večini metod čiščenja je priporočena uporaba sveže odrezanih delcev.

## Opozorila in previdnostni ukrepi

- Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vsebujejo morebitno nevarne kemikalije. Do telesnih poškodb lahko pride zaradi vdihavanja, zaužitja, stika s kožo in z očmi. Uporabljajte zaščitno opremo, vključno z zaščito za oči, rokavicami in laboratorijsko haljo, glede na tveganje izpostavljenosti. Uporabljene reagente obravnavajte kot kemične odpadke in jih zavržite v skladu z veljavnimi regijskimi, nacionalnimi in lokalnimi zakoni in uredbami. Za dodatne informacije o varovanju okolja in zdravja ter zagotavljanju varnosti glejte varnostne liste (SDS) na spletnem mestu [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- Z vsemi vzorci krvi ravnajte tako, kot da so znani povzročitelji virusa HIV (virus humane imunske pomanjkljivosti), virusa človeškega hepatitisa B (HBV) in drugih krvno prenosljivih patogenov (univerzalni previdnostni ukrepi).
- Uporabite običajne laboratorijske previdnostne ukrepe. Ne pipetirajte z usti. Ne jejte, pijte ali kadite na označenih delovnih mestih. Pri ravnanju z vzorci in reagenti iz kompleta nosite rokavice za enkratno uporabo in laboratorijske plašče. Ko nehate rokovati z vzorci in reagenti iz kompleta, si temeljito umijte roke.
- Da preprečite razgradnjo vzorca ali reagenta, se pred začetkom protokola prepričajte, da so vsi hlapi natrijevega hipoklorita, nastali pri čiščenju, popolnoma razpršeni.
- Kontaminacija vzorcev z drugimi produkti/amplikoni PCR lahko povzroči netočne in nezanesljive rezultate. Da preprečite kontaminacijo, uporabite te najboljše prakse:
  - Uporabljajte ustrezne laboratorijske prakse in ohranjajte ustrezno laboratorijsko higieno.
  - Izvedite korake poteka dela na označenih območjih za izvedbo postopka pred pomnožitvijo in po pomnožitvi.
  - Uporabljene reagente pred čiščenjem knjižnic shranite v prostoru za postopek pred pomnožitvijo.
  - Reagente za postopek pred pomnožitvijo ločite od reagentov za postopek po pomnožitvi.
  - Prepričajte se, da so območja za izvajanje postopka pred pomnožitvijo in po pomnožitvi opremljena z namensko opremo, kot so pipete, konice pipet, vrtnični mešalnik in centrifuga.

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

- Preprečite navzkrižno kontaminacijo. Pri posameznih vzorcih in doziranju posameznih reagentov uporabljajte sveže konice pipet. Z uporabo filtriranih konic zmanjšate tveganje prenosa amplikonov in navzkrižne kontaminacije med vzorci.
  - Ko dodajate ali prenašate vzorce ali glavne mešanice reagentov, zamenjajte konice pri vsakem vzorcu.
  - Ko dodajate vmesnike indeksiranja z večkanalno pipeto, zamenjajte konice pri vsaki vrstici ali vsakem stolpcu. Če uporabljate enokanalno pipeto, zamenjajte konice pri vsakem vzorcu.
  - Odstranite neuporabljene ploščice vmesnika indeksiranja z delovne površine.
- Pri postopkih izpiranja z etanolom uporabljajte te najboljše prakse:
  - Vedno pripravite svež 80-odstotni etanol. Etanol lahko absorbira vodo iz zraka, kar lahko vpliva na rezultate.
  - Prepričajte se, da med izpiranjem odstranite ves etanol z dna vdolbinic. Ostanke etanola lahko vplivajo na rezultate.
  - Upoštevajte čas sušenja, določenega za korake za uporabo magnetnega stojala, da zagotovite popolno izhlapevanje. Ostanke etanola lahko vplivajo na uspešnost nadaljnjih reakcij.
- Glavne mešanice vedno pripravite pred uporabo in nikoli ne shranjujte kombiniranih delovnih raztopin.
- Učinkovitost delovanja kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ni zagotovljena, če ne upoštevate postopkov, opisanih v navodilih za uporabo.
- Komponent kompleta ne uporabljajte po preteku roka uporabnosti, ki je naveden na nalepki kompleta.
- Ne zamenjajte komponent kompletov iz različnih kompletov Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Kompleti so označeni na nalepki kompleta.

## Opombe glede postopka

### Priporočila za vnos DNK

Protokol za komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z vnosi visokokakovostnega genomskega DNK z dvema verigama (gDNK) 50–1000 ng.

Prepričajte se, da začetni vzorec gDNK ne vsebuje > 1 mM EDTA in je brez organskih kontaminantov, kot sta fenol in etanol. Te snovi lahko ovirajo reakcijo označevanja in povzročijo neuspešno izvedbo testa.

Vnos gDNK  $\geq$  50 ng

Za vnose gDNK 50–1000 ng kvantifikacija in normalizacija začetnega vzorca gDNK nista potrebni.



## Vnos gDNK < 50 ng

Uporabljeni so lahko vnosi DNK 10–50 ng s temi prilagoditvami:

- Če uporabljate vnos 10–49 ng gDNK, je priporočljiva kvantifikacija začetnega vzorca gDNK za določitev števila ciklov PCR, ki so potrebni po označevanju. Uporabite fluorometrično metodo za kvantifikacijo vnosa gDNK z dvema verigama. Izogibajte se metodam, ki merijo celotno nukleinsko kislino, kot so NanoDrop ali druge UV absorpcijske metode.
- Ta protokol ne normalizira končnih donosov predhodno obogatenih knjižnic iz vnosa 10–49 ng gDNK, zato sta potrebni kvantifikacija in normalizacija knjižnic pred obogatitvijo in po obogatitvi.
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je označen in potrjen za vnose DNK 50–1000 ng. Enakovredne učinkovitosti izdelka ni mogoče zagotoviti za vnose vnos gDNK < 50 ng.

## Priporočila za vnos krvi

Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z gDNK, ki je pridobljen iz periferne polne krvi. Uporabite lahko katero koli potrjeno metodo ekstrakcije. Pri ekstrakciji gDNK iz polne krvi začetna kvantifikacija vnesenega DNK ni potrebna in Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ustvari normalizirane donose predhodno obogatene knjižnice.

Na količino DNK, pridobljeno iz vzorcev polne krvi, in posledično na normalizacijo knjižnice lahko negativno vplivajo ti dejavniki:

- Starost vzorca krvi
- Pogoji shranjevanja
- Zdravstvena stanja, ki vplivajo na število belih krvničk

## Priporočila za vnos vzorca tkiva FFPE

Za določitev ustreznega vnosa za uspešno pripravo knjižnice uporabite ta merila kakovosti FFPE DNK:

- Za vzorce FFPE z vrednostjo  $\Delta Cq \leq 5$  je priporočen vnos DNK 50–1000 ng.
- Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx ni priporočen za vzorce FFPE slabe kakovosti z vrednostjo  $\Delta Cq > 5$ . Uporaba vzorcev z vrednostjo  $\Delta Cq > 5$  je sicer mogoča, vendar je s tem povečana verjetnost neuspešne priprave knjižnice oziroma zmanjšana možnost učinkovitosti testa.

### Ekstrakcija FFPE

Uporabite metodo izolacije nukleinske kisline, ki ustvari visoke donose, zmanjša porabo vzorca in ohrani celovitost vzorca. Za ekstrakcijo DNK iz vzorcev FFPE lahko uporabite katero koli potrjeno metodo. Za gDNK, pridobljen iz tkiva FFPE, je potrebna začetna kvantifikacija vnesenega DNK in Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne ustvari normalizirane donose predhodno obogatene knjižnice.

## Kvalifikacija FFPE DNK

gDNK, pridobljen iz tkiva FFPE, je pred uporabo kvalificiran. Za zagotovitev optimalne učinkovitosti delovanja ocenite kakovost vzorca DNK z uporabo potrjene metode ekstrakcije za kvalifikacijo DNK, pridobljenega iz vzorcev FFPE. Protokol za komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je združljiv z vzorci FFPE DNK z vrednostjo  $\Delta Cq \leq 5$ . Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ni priporočen za vzorce FFPE slabe kakovosti z vrednostjo  $\Delta Cq > 5$ . Uporaba vzorcev z vrednostjo  $\Delta Cq > 5$  je sicer mogoča, vendar je s tem povečana verjetnost neuspešne priprave knjižnice oziroma zmanjšana možnost učinkovitosti testa.

## [Izbirno] Referenčni vzorci FFPE

Pri izvajanju protokola kot pozitivne kontrole uporabite določen referenčni material, kot je Horizon HD799 (DNA). Kot referenčne vzorce lahko uporabite tudi kvalificirane materiale FFPE iz ksenograftov, pridobljenih iz celičnih linij. Za kvantifikacijo referenčnih materialov pred uporabo uporabite fluorometrično metodo.

**OPOMBA** Izvajanje pozitivne kontrole referenčnega vzorca ali kontrole brez predloge porabi reagentne in zmanjša skupno število neznanih vzorcev, ki jih je mogoče obdelati.

## Priporočila za vnos vzorca

Priporočila za vnos vzorca za komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so povzeta v spodnji tabeli.

Tabela 1 Priporočila za vnos vzorca

Vrsta vnosa vzorca	Količina vnosa vzorca	Potrebna kvantifikacija vnosa DNK	Potrebna količina vnosa DNK	Normalizirani donos predhodno obogatene knjižnice
gDNK	10–49 ng	Da	Razmerje 260/280 1,8–2,0	Ne
gDNK	50–1000 ng	Ne	Razmerje 260/280 1,8–2,0	Da
gDNK iz krvi	50–1000 ng	Ne	Razmerje 260/280 1,8–2,0	Da
gDNK iz FFPE	50–1000 ng	Da	Vrednost $\Delta Cq \leq 5$	Ne

Priporočeni cikli PCR za program eBLTS PCR so prilagojeni glede na koncentracijo in kakovost vnosa vzorca. Za več informacij glejte [Pomnožitev označenega DNK na strani 29](#).

## Nasveti in tehnike

### Preprečevanje navzkrižne kontaminacije

- Ko dodajate ali prenašate vzorce, zamenjajte konice pri *vsakem vzorcu*.
- Ko dodajate vmesnike indeksiranja z večkanalno pipeto, zamenjajte konice *pri vsaki vrstici* ali *vsakem stolpcu*. Če uporabljate enokanalno pipeto, zamenjajte konice pri vsakem vzorcu.

### Zatesnitev ploščice

- Ploščico s 96 vdolbinicami vedno zatesnite z novim lepilnim tesnilom z uporabo gumenega valjčka, preden izvedete te korake v protokolu:
  - Koraki postopka pretresanja
  - Koraki postopka inkubiranja. Če ploščice ne zatesnite pravilno, lahko med inkubiranjem pride do izhlapevanja.
  - Koraki postopka centrifugiranja
  - Koraki postopka hibridizacije
- Prepričajte se, da so robovi in vdolbinice popolnoma zatesnjeni, da zmanjšate tveganje navzkrižne kontaminacije in izhlapevanja.
  - Če na tesnilu ali straneh vdolbinic na ploščici opazite morebitno tekočino ali kondenzacijo, pred odstranitvijo tesnila po potrebi centrifugirajte.
- Ploščico postavite na ravno površino in počasi odstranite tesnilo.

### Ravnanje z reagentom Enrichment BLT Small (eBLTS) (BLT za obogatitev – majhen (eBLTS))

- Epruveto z zalogo eBLTS hranite pokonci v hladilniku, tako da so kroglice vedno potopljene v pufru.
- Neposredno pred uporabo temeljito vrtinčite epruveto z zalogo eBLTS, dokler kroglice niso resuspendirane. Da preprečite ponovno usedanje kroglic, centrifugiranje pred pipetiranjem ni priporočljivo.
- Če so kroglice prilepljene na stranico ali vrh ploščice s 96 vdolbinicami, centrifugirajte pri 280 × g 3 sekunde, nato pa jih pipetirajte, da se resuspendirajo.
- Izpiranje reagenta eBLTS:
  - Uporabite ustrezno magnetno stojalo za ploščico.
  - Ploščico pustite na magnetnem stojalu, dokler vam je v skladu z navodili ni treba odstraniti.
  - Če so kroglice aspirirane v konice pipet, jih dozirajte nazaj v ploščico na magnetnem stojalu in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).

# Potek dela s kompletom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Spodnji diagram prikazuje potek dela s kompletom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Med koraki so označene točke varne ustavitve. Predvideni časi temeljijo na obdelavi 12 vzorcev pri obogatitvi z 12 združitvami.



## Navodila za uporabo

V tem poglavju je opisan protokol kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Preglejte potek dela celotnega načrtovanega postopka sekvenciranja, od vzorca do analize, da zagotovite združljivost izdelkov in parametrov poskusa.
- Preden nadaljujete, preglejte vsebino kompleta in se prepričajte, da so na voljo potrebne komponente, oprema in pripomočki.
  - Biotinilirane sonde drugih izdelovalcev morajo izpolnjevati določene zahteve. Če želite preveriti, ali sonde drugih izdelovalcev izpolnjujejo zahtev, glejte poglavje [Zahteve za ploščico s sondo za obogatitev na strani 11](#).
- Protokol izvajajte v prikazanem vrstnem redu ter pri tem uporabite določene volumne in parametre inkubacije.
- Če v protokolu ni določena točka varne ustavitve, takoj nadaljujte z naslednjim korakom.
- Pri ustvarjanju glavne mešanice je presežek vključen v navedene volumne.
- Prepričajte se, da uporabljate ustrezno magnetno stojalo za svojo vrsto ploščice.

## Priprava na združevanje

Ta korak je potreben za uspešno izvedbo sekvenciranja obogatenih knjižnic. Združevanje knjižnic lahko izvedete pred postopkom obogatitve in sekvenciranja.

**Pred postopkom obogatitve** – posamezne indeksirane pomnožene knjižnice so združene za obogatitev z ploščico s sondo. S tem je ustvarjen multipleksna združitev obogatenih knjižnic. Obdelava vnosa vzorca FFPE je bila testirana in je priporočena izključno za reakcije obogatitve z 1 združitvijo. Za visokokakovostni gDNK je bilo testiranih 12 združitev, možne pa so tudi od 2 do 11 združitev.

**Pred postopkom sekvenciranja** – obogatene knjižnice z 1 združitvijo in/ali obogatene knjižnice z več združitvami so združene pred sekvenciranjem. Število obogatenih knjižnic, ki jih je mogoče sekvencirati, je odvisno od ciljne globine odčitavanja za posamezne vzorce v vašem sistemu za sekvenciranje.

## Enolično dvojno indeksiranje

Komplet Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit uporablja enolične dvojne indekse.

- Knjižnice z dvojnimi indeksiranjem dodajo sekvence indeksa 1 (i7) in indeksa 2 (i5), da ustvarijo enolično označene knjižnice.
- Enolični dvojni (UD) indeksi imajo posebne, nepovezane indeksen sekvence za indeksni odčitavanji i7 in i5. Indeksi so dolgi 10 baz.

Z izbiro vmesnikov indeksiranja z različnimi sekvencami za združene knjižnice optimizirate barvno ravnovesje za uspešno sekvenciranje in analizo podatkov. Združevanja z  $\geq 10$  združitvami so inherentno barvno uravnotežena, zato lahko uporabite katero koli kombinacijo vmesnikov indeksiranja. Modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager med izvajanjem sekvenciranja ponudi možnosti za barvno uravnotežene kombinacije indeksov in vas obvesti, če izbrane kombinacije indeksov niso dovolj raznolike.

Za informacije o sekvencah vmesnika enoličnega dvojnega (UD) indeksiranja Illumina in postavitvah ploščice glejte [Dodatek: sekvence vmesnika enoličnega dvojnega \(UD\) indeksiranja Illumina na strani 61](#).

## Podprte združitve obogatitve

Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so konfigurirani in testirani pri obogatitvi z 1 združitvijo in 12 združitvami. Čeprav so možne tudi druge združitve obogatitve, nekatere bogatitve zahtevajo dodatne reagente za pripravo predhodno obogatene knjižnice in ploščic s sondo za obogatitev.

Za doseganje ustreznega donosa obogatitve za nestandardno združitev obogatitve je lahko potrebna dodatna optimizacija. Optimalni rezultati niso zagotovljeni.

- **Združitev obogatitve** – število predhodno obogatenih knjižnic (1–12), ki so združene v eno reakcijo obogatitve za hibridizacijo s ploščicami s sondo za obogatitev. Če na primer združite 12 predhodno obogatenih knjižnic, dobite obogatitev z 12 združitvami.
- **Reakcija obogatitve** – število enoličnih priprav reakcij obogatitve, ne glede na število predhodno obogatenih knjižnic, združenih na reakcijo. Z eno samo reakcijo obogatitve lahko na primer pripravite obogatitev z 1 združitvijo ali 12 združitvami.

Za izračun skupnega števila knjižnic po obogatitvi pomnožite združitev obogatitve na reakcijo s številom reakcij obogatitve. Z eno reakcijo obogatitve z 12 združitvami na primer ustvarite združitev 12 knjižnic po obogatitvi.

Pri združevanju predhodno obogatenih knjižnic reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit podpirajo te reakcije obogatitve in združitve.

Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Reakcije obogatitve	Združitve obogatitve
Komplet s 16 vzorci	16 reakcij	1 združitev
Komplet s 96 vzorci	8 reakcij	12 združitev

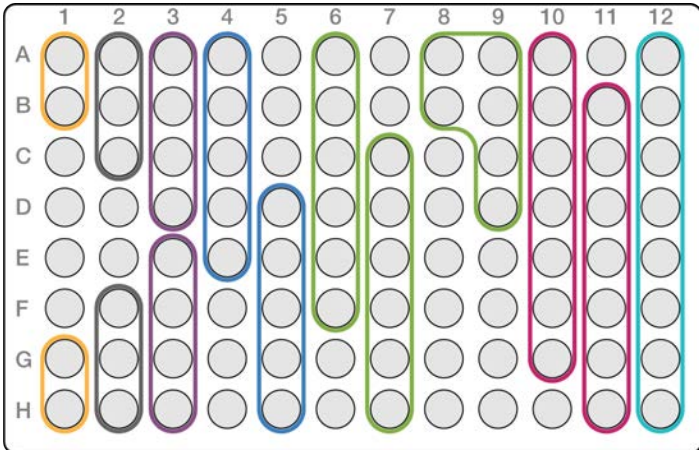
## Strategije združevanja od dveh do osmih elementov

V spodnji tabeli so prikazani vmesniki indeksiranja (vdolbinice), ki jih če ostanete na sestanku, se strinjate in privolite v snemanje.h je mogoče kombinirati v združevanju 2–8 elementov, barvno označena slika pa prikazuje posamezne kombinacije.

Združite kateri koli element  $\geq 2$  z zgornjega ali spodnjega stolpca. Ne združite prek vrstice.

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx illumina®

Združevanje elementov	Kombinacije	Barva na sliki
2	Prvi ali zadnji dve vdolbinico v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A in B</li> <li>• G in H</li> </ul> Vrstice C–F niso uporabljene.	Oranžna
3	Prve ali zadnje tri vdolbinice v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–C</li> <li>• F–H</li> </ul> Vrstici D in E nista uporabljeni.	Siva
4	Prve ali zadnje štiri vdolbinice v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–D</li> <li>• E–H</li> </ul>	Vijolična
5	Prvih ali zadnjih pet vdolbinic v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–E</li> <li>• D–H</li> </ul>	Modra
6	[Možnost 1] Prvih ali zadnjih šest vdolbinic v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–F</li> <li>• C–H</li> </ul> [Možnost 2] Prvi dve vdolbinici (A in B) ali zadnji dve vdolbinici (G in H) v enem stolpcu ali katere koli štiri vdolbinice v sosednjem stolpcu.	Zelena
7	Prvih ali zadnjih sedem vdolbinic v stolpcu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–G</li> <li>• B–H</li> </ul>	Roza
8	Celoten stolpec.	Zelenomodra

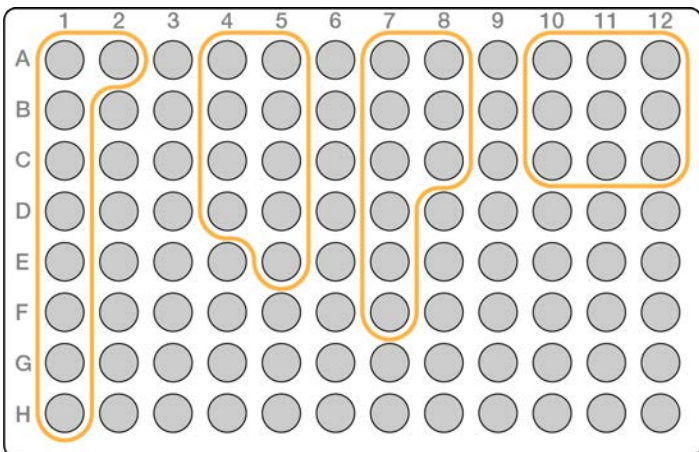


## Strategije združevanja devetih elementov

Uporabite vmesnike indeksiranja katerih koli vdolbinic, ki optimizirajo barvno ravnovesje pri izvedbi sekvenciranja, na primer:

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

Na spodnji sliki so prikazani vsi štirje primeri.



## Označevanje genomskega DNK

V tem koraku je za označevanje DNK uporabljen Enrichment BLT Small (eBLTS) (BLT za obogatitev – majhen (eBLTS)), ki je postopek, pri katerem je DNK fragmentiran in označen s sekvencami vmesnika.



## Potrošni material

- eBLTS (BLT za obogatitev – majhen) (rumen pokrovček)
- TB1 (Tagmentacijski pufer za ustavitev 1)
- Voda brez nukleaze
- Ploščica PCR s 96 vdolbinicami
- Lepilno tesnilo
- Mikrocentrifugalne epruvete 1,7 ml
- 8-tračne epruvete
- Konice za pipete
  - Večkanalne pipete 200 µl



## OPOZORILO

**Ta nabor reagentov vsebuje kemikalije, ki so lahko nevarne. Do telesnih poškodb lahko pride zaradi vdihavanja, zaužitja, stika s kožo in z očmi. Uporabljajte zaščitno opremo, vključno z zaščito za oči, rokavicami in laboratorijsko haljo, glede na tveganje izpostavljenosti. Uporabljene reagente obravnavajte kot kemične odpadke in jih zavržite v skladu z veljavnimi regijskimi, nacionalnimi in lokalnimi zakoni in uredbami. Za dodatne informacije o varovanju okolja in zdravja ter zagotavljanju varnosti glejte varnostne liste (SDS) na spletnem mestu [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**

## Več o reagentih

- eBLTS morate shranjevati pri temperaturi od 2 °C do 8 °C. Ne uporabljajte reagenta eBLTS, ki je bil shranjen pri temperaturi, nižji od 2 °C.
- Ne centrifugirajte eBLTS-ja.

## Priprava

1. Pripravite ta potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
eBLTS (rumen pokrovček)	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo. Pred uporabo takoj postavite v vrtnični mešalnik, da se sestavine premešajo. Ne centrifugirajte pred pipetiranjem.
TB1	od –25 °C do –15 °C	Segrejte na sobno temperaturo. Postavite v vrtnični mešalnik, da se snovi premešajo.

2. Vrtinčite ali pipetirajte DNK, nato pa kratek čas centrifugirajte.
3. V ciklični termostati shranite ta program TAG:
  - Izberite možnost za predogrevanje pokrova in nastavite na 100 °C

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

- Nastavite volumen reakcije na 50 µl
- 55 °C za 5 minut
- Ohranite na 10 °C

## Postopek

1. Dodajte 2–30 µl DNK v posamezne vdolbinice na ploščici PCR s 96 vdolbinicami, tako da je skupna količina vnosa 50–1000 ng.  
Če je volumen DNK < 30 µl, dodajte vodo brez nukleaze vzorcem DNK, da je dosežen skupni volumen 30 µl.
2. eBLTS temeljito vrtinčite, dokler kroglice niso v celoti resuspendirane.
3. V epruveti združite te volumne, da pripravite glavno mešanico za tagmentacijo. Vsak volumen pomnožite s številom obdelanih vzorcev.
  - eBLTS (11,5 µl)
  - TB1 (11,5 µl)Presežek reagentov je vključen v volumen.
4. Natančno pipetirajte glavno mešanico za tagmentacijo, da se sestavine premešajo.
5. Enakomerno porazdelite volumen glavne mešanice za tagmentacijo v 8-tračne epruvete.
6. Z večkanalno pipeto 200 µl prenesite 20 µl glavne mešanice za tagmentacijo v posamezne vdolbinice na ploščici PCR z vzorcem. Za vsak stolpec ali vrstico vzorca uporabite sveže konice.
7. Po doziranju glavne mešanice za tagmentacijo zavrzite 8-tračne epruvete.
8. Z večkanalno pipeto 200 µl, nastavljeno na 40 µl, pipetirajte posamezne vzorce 10-krat, da se sestavine premešajo. Za vsak stolpec vzorca uporabite sveže konice.  
Ploščico PCR pa lahko tudi zatesnite in pretresate na stresalniku pri 1600 vrt./min 1 minuto.
9. Zatesnite ploščico in jo postavite na vnaprej programirani ciklični termostat ter zaženite program TAG.
10. Počakajte, da je v programu TAG dosežena temperatura zadržanja 10 °C, nato pa takoj odstranite ploščico.
11. Ploščico PCR s 96 vdolbinicami pustite stati na sobni temperaturi 2 minuti, nato pa nadaljujte na naslednji korak.

## Čiščenje po označevanju

V tem koraku je izpran DNK, označen z vmesnikom, v reagentu eBLTS, preden je izvedena pomnožitev PCR.

### Potrošni material

- ST2 (Tagmentacijski pufer za ustavitev 2)
- TWB2 (Tagmentacijski pufer za izpiranje 2)
- Magnetno stojalo za ploščico PCR s 96 vdolbinicami
- Lepilno tesnilo

- 8-tračne epruvete
- Konice za pipete
  - Večkanalne pipete 20 µl
  - Večkanalne pipete 200 µl
- Pripravite za nadaljnji postopek:
  - EPM (Okrepljena mešanica PCR)
  - Ploščica vmesnika indeksiranja

## Več o reagentih

- Prepričajte se, da uporabljate ustrezno magnetno stojalo za svojo ploščico. Če za ploščico PCR uporabljate magnetno stojalo za ploščico MIDI, se lahko zgodi, da se TWB2 ne prilepi na kroglice.
- Počasi pipetirajte TWB2, da zmanjšate penjenje ter preprečite aspiracijo napačnega volumna in nepopolno mešanje.

## Priprava

1. Pripravite ta potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
EPM	od -25 °C do -15 °C	Odmrzujte na ledu 1 uro. Obrnite, da se snovi premešajo, nato pa kratek čas centrifugirajte.
ST2	od 15 °C do 30 °C	Če opazite precipitate, segrevajte 10 minut pri temperaturi 37 °C in nato vrtinčite, dokler se precipitati ne raztopijo. Uporabite pri sobni temperaturi.
TWB2	od 15 °C do 30 °C	Uporabite pri sobni temperaturi.
Ploščica vmesnika indeksiranja	od -25 °C do -15 °C	Odmrzujte pri sobni temperaturi 30 minut.

## Postopek

1. Dodajte 10 µl ST2 posamezni reakciji označevanja. Če uporabljate večkanalno pipeto, pipetirajte ST2 v 8-tračne epruvete in nato prenesite ustrezne volumne na ploščico PCR. Za vsak stolpec ali vrstico vzorca uporabite sveže konice.
2. S pipeto 200 µl, nastavljeno na 50 µl, počasi pipetirajte posamezne vdolbinice 10-krat, da resuspendirate kroglice.  
Ploščico pa lahko tudi zatesnite in pretresate pri 1600 vrt./min 1 minuto. Po potrebi ponovite postopek.
3. Zatesnite ploščico in centrifugirajte pri 280 × g 10 sekund.
4. Inkubirajte pri sobni temperaturi 5 minut.

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

5. Postavite na magnetno stojalo za ploščico PCR in počakajte, dokler pokrov ni čist (3 minute).
6. [ $\leq$  48 vzorcev] Izperite trikrat v skladu s tem postopkom.
  - a. Z večkanalno pipeto 200  $\mu$ l, nastavljeno na 60  $\mu$ l, odstranite in zavržite ves supernatant, ne da bi se pri tem dotikali palete s kroglicami.
  - b. Odstranite z magnetnega stojala.
  - c. Takoj zatem počasi dodajte 100  $\mu$ l TWB2 neposredno na kroglice.
  - d. Počasi pipetirajte, dokler kroglice niso popolnoma resuspendirane. Ploščico pa lahko tudi zatesnite in pretresate pri 1600 vrt./min 1 minuto.
  - e. Če pride do brizganja, zavrtite navzdol pri 280  $\times$  g za 10 sekund.
  - f. Postavite na magnetno stojalo za ploščico PCR in počakajte, da se tekočina zbistri (3 minute). Pustite ploščico na magnetnem stojalu, TWB2 pa v vdolbinicah, da preprečite presušitev, ko izvajate tretje izpiranje. Ko pripravite glavno mešanico PCR, odstranite in zavržite supernatant.
  - g. Z večkanalno pipeto 200  $\mu$ l, nastavljeno na 100  $\mu$ l, odstranite in zavržite ves supernatant.
  - h. Dvakrat ponovite korake c–f za vsa tri izpiranja.
7. [ $>$  48 vzorcev] Izperite trikrat v skladu s tem postopkom.
  - a. Koraka b in c izvedite v korakih od stolpca 1 do stolpca 2, dokler ne obdelate vseh stolpcev, da preprečite presušitev.
  - b. Z večkanalno pipeto 200  $\mu$ l, nastavljeno na 60  $\mu$ l, odstranite in zavržite ves supernatant.
  - c. Odstranite z magnetnega stojala.
  - d. Takoj zatem počasi dozirajte 100  $\mu$ l TWB2 neposredno na kroglice.
  - e. Počasi pipetirajte, dokler kroglice niso popolnoma resuspendirane. Ploščico pa lahko tudi zatesnite in pretresate pri 1600 vrt./min 1 minuto.
  - f. Če pride do brizganja, zavrtite navzdol pri 280  $\times$  g za 10 sekund.
  - g. Postavite na magnetno stojalo za ploščico PCR in počakajte, da se tekočina zbistri (3 minute). Pustite ploščico na magnetnem stojalu, TWB2 pa v vdolbinicah, da preprečite presušitev, ko izvajate tretje izpiranje. Ko pripravite glavno mešanico PCR, odstranite in zavržite supernatant.
  - h. Z večkanalno pipeto 200  $\mu$ l, nastavljeno na 100  $\mu$ l, odstranite in zavržite ves supernatant.
  - i. Odstranite z magnetnega stojala in počasi dodajte 100  $\mu$ l TWB2 neposredno na kroglice.
  - j. Ponovite koraka h in i v korakih za stolpec 1 ali stolpec 2, dokler ne obdelate vseh stolpcev.
  - k. Dvakrat ponovite korake d–h za vsa tri izpiranja.
8. Pustite na magnetnem stojalu, dokler ne pridete do koraka 4 v razdelku *Postopek*, ki je opisan v poglavju *Povečanje označenega DNK*.  
TWB2 ostane v vdolbinicah za preprečevanje presušitve kroglic.

## Pomnožitev označenega DNK

V tem koraku je označeni DNK pomnožen s programom PCR z omejenim ciklom. V koraku PCR sta dodana vmesnika »Index 1 (i7)« (Indeks 1 (i7)) in »Index 2 (i5)« (Indeks 2 (i5)) ter sekvence, potrebne za ustvarjanje gruče za sekvenciranje.

### Potrošni material

- EPM (Okrepljena mešanica PCR)
- Ploščica vmesnika indeksiranja
- Ploščica PCR s 96 vdolbinicami
- Voda brez nukleaze
- Lepilno tesnilo
- Mikrocentrifugalne epruvete 1,5 ml
- Konice za pipete
  - Večkanalne pipete 20 µl
  - Večkanalne pipete 200 µl

### Več o reagentih

- Ploščice vmesnika indeksiranja
  - Vdolbinica lahko vsebuje > 10 µl vmesnikov indeksiranja.
  - Vzorcev ne dodajajte na ploščico vmesnika indeksiranja.
  - Vsaka vdolbinica na indeksni ploščici je namenjena samo za enkratno uporabo.

### Priprava

1. Pripravite ta potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
EPM	od -25 °C do -15 °C	Odmrzujte pri temperaturi 4 °C ali na ledu 1 uro. Obrnite, da se snovi premešajo, nato pa kratek čas centrifugirajte.
Ploščica vmesnika indeksiranja	od -25 °C do -15 °C	Odmrzujte pri sobni temperaturi 30 minut.

2. Shranite ta program eBLTS PCR v cikličnem termostatu z uporabo ustreznega števila ciklov PCR, ki je navedeno v spodnji tabeli.

- Izberite možnost za predogrevanje pokrova in nastavite na 100 °C
- Nastavite volumen reakcije na 50 µl
- 72 °C za 3 minute
- 98 °C za 3 minute
- X ciklov pri:
  - 98 °C za 20 sekund
  - 60 °C za 30 sekund
  - 72 °C za 1 minuto
- 72 °C za 3 minute
- Ohranite na 10 °C

Skupni čas delovanja je pribl. 38 minut za 9 ciklov in pribl. 46 minut za 12 ciklov.

Vrsta vnosa vzorca	Število ciklov PCR (X)
10–49 ng gDNK	12
50–1000 ng gDNK	9
50–1000 ng gDNK, pridobljen iz FFPE	12
gDNK, pridobljen iz krvi	9

## Postopek

1. Združite te elemente, da pripravite glavno mešanico PCR. Vsak volumen pomnožite s številom obdelanih vzorcev.
  - EPM (23 µl)
  - Voda brez nukleaze (23 µl)Presežek reagentov je vključen v volumen.
2. Pipetirajte glavno mešanico PCR 10-krat, da se premeša, nato pa kratek čas centrifugirajte.
3. Ko je ploščica na magnetnem stojalu, uporabite večkanalno pipeto 200 µl, da odstranite in zavržete TWB2. Pena, ki ostane na stenah vdolbinic, ne vpliva negativno na knjižnico.
4. Odstranite z magnetnega stojala.
5. Takoj dodajte 40 µl glavne mešanice PCR neposredno na kroglice v posameznih vdolbinicah.
6. Takoj pipetirajte, da se elementi premešajo in so kroglice v celoti resuspendirane. Ploščico pa lahko tudi zatesnite in pretresate pri 1600 vrt./min 1 minuto.

7. Zatesnite ploščico z vzorcem in centrifugirajte pri 280 × g 10 sekund.
8. Centrifugirajte ploščico vmesnika indeksiranja pri 1000 × g 1 minuto.
9. Pripravite ploščico vmesnika indeksiranja.
  - [< 96 vzorcev] Z novo konico pipete preluknjajte tesnilno folijo na ploščici vmesnika indeksiranja za vsako vdolbinico, vendar samo za toliko vzorcev, kot jih želite obdelati.
  - [96 vzorcev] Novo ploščico PCR s polkrožnim slojem poravnajte nad ploščico vmesnika indeksiranja in pritisnite navzdol, da preluknjate tesnilno folijo. Zavržite ploščico PCR, s katero ste preluknjali tesnilno folijo.
10. Z novo konico pipete dodajte 10 µl vnaprej pripravljenih parov vmesnikov indeksiranja v posamezne vdolbinice.
11. S pipeto, nastavljeno na 40 µl, pipetirajte 10-krat, da se elementi premešajo. Ploščico pa lahko tudi zatesnite in pretresate pri 1600 vrt./min 1 minuto.
12. Zatesnite ploščico in centrifugirajte pri 280 × g 10 sekund.
13. Postavite na ciklični termostat in zaženite program eBLTS PCR.

## TOČKA VARNE USTAVITVE

V primeru ustavitve shranite pri temperaturi od –25 °C do –15 °C za največ 30 dni.

## Čiščenje knjižnic

V tem koraku je za prečiščevanje pomnoženih knjižnic uporabljen postopek čiščenja z obojestranskimi kroglicami.

### Potrošni material

- CB (Kroglice za čiščenje)
- RSB (Puffer za resuspendiranje)
- Sveže pripravljene 80-odstotni etanol (EtOH)
- Polipropilenska ploščica za shranjevanje s 96 globokimi vdolbinicami 0,8 ml (ploščica MIDI)
- Ploščica PCR s 96 vdolbinicami
- Magnetno stojalo za ploščico MIDI
- Magnetno stojalo za ploščico PCR
- Mikrocentrifugalne epruvete 1,5 ml
- Voda brez nukleaze

## Več o reagentih

- Kroglice za čiščenje
  - Pred vsako uporabo postavite v vrtnični mešalnik.
  - Pogosto izvajajte postopek vrtničenja, da zagotovite ustrezno porazdelitev kroglic.
  - Aspirirajte in dozirajte počasi zaradi viskoznosti raztopine.

## Priprava

1. Pripravite ta potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
CB	Sobna temperatura	Premešajte s postopkom vrtničenja in obračanja, dokler ni barva tekočine homogena.
RSB	od 2 °C do 8 °C	Odmrzujte pri sobni temperaturi 30 minut. Postavite v vrtnični mešalnik, da se snovi premešajo.

## Postopek

1. Pretresajte ploščico PCR s 96 vdolbinicami pri 1800 vrt./min 1 minuto in jo kratek čas centrifugirajte.
2. Postavite na magnetno stojalo za ploščico PCR in počakajte, da se tekočina zbistri (1 minuta).
3. Vrtinčite CB 3-krat 10 sekund, nato pa nekajkrat obrnite, da se snovi resuspendirajo.
4. Za visokokakovostni gDNK naredite to.
  - a. Dodajte 77 µl vode brez nukleaze v posamezne vdolbinice na novi ploščici MIDI.
  - b. Dodajte 88 µl CB v posamezne vdolbinice na ploščici MIDI.
  - c. Prenesite 45 µl supernatanta iz posameznih vdolbinic na ploščici PCR v ustrezne vdolbinice na ploščici MIDI.
  - d. Zavržite ploščico PCR.
  - e. Pipetirajte posamezne vdolbinice 10-krat, da se snovi premešajo. Ploščico pa lahko tudi zatesnite in pretresate pri 1800 vrt./min 1 minuto.
  - f. Zatesnite ploščico in inkubirajte 5 minut pri sobni temperaturi.
  - g. Preverite prisotnost zračnih mehurčkov. Če jih opazite, zavrtite ploščico navzdol.
  - h. Postavite na magnetno stojalo za ploščico MIDI in počakajte, da se tekočina zbistri (5 minut).
  - i. Med postopkom inkubacije temeljito vrtinčite CB, nato pa dodajte 20 µl v posamezne vdolbinice na novi ploščici MIDI.
  - j. Prenesite 200 µl supernatanta iz posameznih vdolbinic na prvi ploščici MIDI v ustrezne vdolbinice na novi ploščici MIDI (ki vsebuje 20 µl CB).
  - k. Zavržite prvo ploščico MIDI.
  - l. Pipetirajte posamezne vdolbinice na novi ploščici MIDI 10-krat, da se snovi premešajo. Ploščico pa lahko tudi zatesnite in pretresate pri 1800 vrt./min 1 minuto.



5. Za pridobljeni FFPE naredite to.
  - a. Dodajte 81 µl CB v posamezne vdolbinice na novi ploščici MIDI.
  - b. Prenesite 45 µl supernatanta iz posameznih vdolbinic na ploščici PCR v ustrezne vdolbinice na ploščici MIDI.
  - c. Zavržite ploščico PCR.
  - d. Pipetirajte posamezne vdolbinice 10-krat, da se snovi premešajo. Ploščico pa lahko tudi zatesnite in pretresate pri 1800 vrt./min 1 minuto.
6. Inkubirajte pri sobni temperaturi 5 minut.
7. Preverite prisotnost zračnih mehurčkov. Če jih opazite, zavrtite ploščico navzdol.
8. Postavite na magnetno stojalo za ploščico MIDI in počakajte, da se tekočina zbistri (5 minut).
9. Odstranite in zavržite supernatant, ne da bi se pri tem dotikali kroglic.
10. Izperite kroglice v skladu s tem postopkom.
  - a. Ko je ploščica nameščena na magnetnem stojalu, dodajte 200 µl svežega 80-odstotnega EtOH brez mešanja.
  - b. Inkubirajte 30 sekund.
  - c. Odstranite in zavržite supernatant, ne da bi se pri tem dotikali kroglic.
11. Še **enkrat** izperite kroglice.
12. Sušite na zraku na magnetnem stojalu 5 minut.
13. Med sušenjem na zraku s pipeto 20 µl odstranite in zavržite preostali EtOH.
14. Odstranite z magnetnega stojala.
15. Dodajte 17 µl RSB-ja kroglicam.
16. Zatesnite ploščico in pretresajte pri 1800 vrt./min 2 minuti.
17. Inkubirajte pri sobni temperaturi 2 minuti.
18. Preverite prisotnost zračnih mehurčkov. Če jih opazite, zavrtite ploščico navzdol.
19. Postavite ploščico na magnetno stojalo za ploščico MIDI in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).
20. Prenesite 15 µl supernatanta na novo ploščico PCR s 96 vdolbinicami.

## TOČKA VARNE USTAVITVE

V primeru ustavitve zatesnite ploščico in shranite pri temperaturi od -25 °C do -15 °C za največ 30 dni.

## Združevanje predhodno obogatenih knjižnic

V tem koraku so knjižnice DNK združene z enoličnimi indeksi v eno združitev z največ 12 knjižnicami.

### Metode združevanja

Postopek združevanja lahko izvajate glede na volumen ali maso. Z uporabo spodnje tabele določite ustrezno metodo za vaš vnos.

Tabela 2 Priporočene metode združevanja

Vnos vzorca	Metoda združevanja
10–49 ng gDNK	Masa
50–1000 ng gDNK	Volumen
gDNK, pridobljen iz FFPE	Masa
gDNK, pridobljen iz krvi	Volumen

- Za obogatitev z eno združitvijo ni treba izvesti združevanja predhodno obogatenih knjižnic. Morda boste morali dodati RSB.
- Po kvantifikaciji predhodno obogatene knjižnice lahko vse vrste vnesenih vzorcev združite po masi, da dosežete optimalno ravnovesje indeksov.
- Končni donos predhodno obogatenih knjižnic, ustvarjenih v ločenih pripravah poskusov, se lahko razlikuje. Zato je za zagotavljanje optimalnega ravnovesja indeksov priporočljivo združevanje po masi.
- Obogatitev z 1 združitvijo uporabite v teh primerih.
  - 10–49 ng gDNK
  - 50–1000 ng gDNK, pridobljen iz FFPE
  - Zaznavanje nizke frekvence manjših alelov pri klicanju somatske različice.

## Združevanje po masi

V teh primerih izvedite kvantifikacijo knjižnic tako, da za obogatitev uporabite maso DNK za posamezno knjižnico, določeno v razdelku [Združevanje predhodno obogatenih knjižnic pri enaki koncentraciji na strani 35](#).

- Vnos vzorca 10–49 ng gDNK
- Vnos vzorca gDNK, pridobljenega iz FFPE, 50–1000 ng
- Zaznavanje nizke frekvence manjših alelov pri klicanju somatske različice
- gDNK, pridobljen iz krvi, za optimalno ravnovesje indeksov

## Kvantificiranje predhodno obogatenih knjižnic

1. Izvedite postopek z 1 µl predhodno obogatenih knjižnic z uporabo zelene fluorescenčne metode kvantifikacijske z interkalirajočim barvilom dsDNK.
  - Za visokokakovostni gDNK 50–1000 ng je pričakovan donos predhodno obogatene knjižnice  $\geq 500$  ng.
  - Za gDNK, pridobljen iz FFPE, 50–1000 ng je pričakovan donos predhodno obogatene knjižnice 500–6000 ng, odvisno od kakovosti začetnega vzorca.

**OPOMBA** Za metode kvantifikacije z različnimi pristranskostmi določite metodo kvantifikacije za ta potek dela. Rezultati koncentracije se lahko razlikujejo glede na uporabljeno metodo.

## Združevanje predhodno obogatenih knjižnic pri enaki koncentraciji

Za določanje mase DNK za posamezno knjižnico, potrebne za obogatitev, uporabite spodnjo tabelo glede na vrsto vzorca in združitve obogatitve. Optimalni donos obogatitve in učinkovitost testa niso zagotovljeni, če uporabite manjše donose predhodno obogatene knjižnice od priporočenih.

Skupna masa DNK pri reakciji obogatitve ne sme presežati 6000 ng.

Vnos vzorca	Združitve obogatitve	Masa DNK na knjižnico (ng)	Skupna masa DNK knjižnice (ng)
Visokokakovostni gDNK	12	250–500	3000–6000
gDNK, pridobljen iz FFPE	1	200	200

1. V tem koraku zabeležite indekse za knjižnice, ki jih želite združiti.
2. Na podlagi koncentracije posameznih knjižnic izračunajte volumen, ki ga morate dodati v reakcijo obogatitve, da zagotovite zahtevano maso DNK.
  - Visokokakovostni gDNK: izračunajte volumen knjižnice, ki je potrebna za vnos 250–500 ng.
  - gDNK, pridobljen iz FFPE: izračunajte volumen knjižnice, ki je potreben za vnos 200 ng.
3. Izračunani volumen za posamezne knjižnice dodajte v isto vdolbinico na ploščici PCR.
4. Če uporabljate visokokakovostni gDNK, izvedite enega od teh postopkov glede na skupni volumen združenih predhodno obogatenih knjižnic:
  - Če je volumen predhodno obogatene knjižnice = 30 µl, se pomaknite do razdelka [Hibridizacija sond na strani 37](#).
  - Če je volumen predhodno obogatene knjižnice < 30 µl, dodajte RSB, da zagotovite skupni volumen 30 µl.
  - Če je volumen predhodno obogatene knjižnice > 30 µl, uporabite metodo s kroglicami ali vakuumski koncentrador za koncentriranje združenega vzorca. Koncentriranemu združenemu vzorcu dodajte RSB, da zagotovite skupni volumen 30 µl.
5. Če uporabljate gDNK, pridobljen iz FFPE, izvedite enega od teh postopkov glede na skupni volumen združenih predhodno obogatenih knjižnic.
  - Če je volumen predhodno obogatene knjižnice = 7,5 µl, se pomaknite do razdelka [Hibridizacija sond na strani 37](#).
  - Če je volumen predhodno obogatene knjižnice < 7,5 µl, dodajte RSB, da zagotovite skupni volumen 7,5 µl.

## TOČKA VARNE USTAVITVE

V primeru ustavitve zatesnite ploščico in shranite pri temperaturi od –25 °C do –15 °C za največ 30 dni.

## Združevanje po volumnu

Kadar je vnos 50–1000 ng gDNK, ni treba izvesti postopka kvantifikacije in normalizacije posameznih knjižnic, ustvarjenih v istem poskusu.

Če želite zagotoviti optimalno učinkovitost delovanja, združite samo predhodno obogatene vzorce knjižnic, ki jih je pripravil isti uporabnik in za katere sta bili uporabljeni ista serija reagentov in ploščica vmesnika indeksiranja.

1. V tem koraku zabeležite indekse za knjižnice, ki jih želite združiti.
2. Združite te volumne predhodno obogatene knjižnice in RSB-ja za vašo združitev obogatitve v isto vdolbinico na novi ploščici PCR.  
Pridobljeni volumen je 30 µl.

Združitev obogatitve *	Volumen posamezne predhodno obogatene knjižnice (µl)	Volumen RSB (µl)
1 združitev	14	16
2 združitvi	14	2
3 združitve	10	0
4 združitve	7,5	0
5 združitev	6	0
6 združitev	5	0
7 združitev	4,2	0,6
8 združitev	3,7	0,4
9 združitev	3,3	0,3
10 združitev	3	0
11 združitev	2,7	0,3
12 združitev	2,5	0

\*Za informacije o nestandardnih združitvah (od 2 do 11 združitev) glejte [Omejitve postopka na strani 2](#).

## TOČKA VARNE USTAVITVE

V primeru ustavitve zatesnite ploščico in shranite pri temperaturi od –25 °C do –15 °C za največ 30 dni.

## [Izbirno] Kvalificiranje predhodno obogatenih knjižnic

Če izvajate združevanje po volumnu, za kvantifikacijo predhodno obogatenih knjižnic uporabite fluorometrično metodo z interkalirajočim barvilom dsDNK. Za kvalifikacijo predhodno obogatenih knjižnic uporabite analizator fragmentov DNK z ustreznim kompletom za analizo fragmentov.

Za kvalifikacijo knjižnice uporabite skupaj 1 µl. Predhodno obogatene knjižnice so dovolj koncentrirane, da omogočajo majhne razredčitve za kvantifikacijo ali analizo fragmentov.

## Hibridizacija sond

V tem koraku so ciljne regije DNK povezane sondami za zajemanje.

Reagenti Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit so združljivi z oligonukleotidnimi ploščicami za obogatitev DNK družbe Illumina in drugih izdelovalcev. Za informacije o zahtevanih specifikacijah za ploščice drugih izdelovalcev glejte [Zahteve za ploščico s sondo za obogatitev na strani 11](#).

### Potrošni material

- EHB2 (Obogatitveni hibridni pufer 2)
- NHB2 (Pufer HYB 2 + Blokatorji IDT NXT) (moder pokrovček)
- Ploščica s sondo za obogatitev
- Ploščica PCR s 96 vdolbinicami
- Lepilno tesnilo
- Pripravite za nadaljnji postopek:
  - SMB3 (Streptavidinske magnetne kroglice)
  - EEW (Okrepljeni obogatitveni pufer za izpiranje) (janterni pokrovček)

### Več o reagentih

- Pri skladiščenju reagenta NHB2 pride do precipitacije in ločevanja.
- Ploščica s sondo za obogatitev ustreza izbrani oligonukleotidni ploščici za obogatitev ponudnika Illumina.

### Priprava

1. Pripravite ta potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
EHB2	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo. Postavite v vrtnični mešalnik, da se snovi premešajo. Če opazite kristale in motnost, ponovite postopek vrtničenja ali pipetirajte gor in dol, dokler raztopina ni bistra.
Ploščica s sondo za obogatitev	od -25 °C do -15 °C (Illumina)	Za ploščice družbe Illumina in drugih izdelovalcev segrejte na sobno temperaturo. Postavite v vrtnični mešalnik, da se snovi premešajo.

Element	Shranjevanje	Navodila
NHB2 (moder pokrovček)	od -25 °C do -15 °C	<p>Odmrzujte pri sobni temperaturi.</p> <p>Ko je element segret na sobno temperaturo, ga predogrevajte 5 minut v inkubatorju za mikrovzorke na enako temperaturo, kot jo ima sonda, ki jo uporabljate. Izvedite 3-kratni postopek vrtnčenja pri največji hitrosti po 10 sekund, da se snovi resuspendirajo. Kratek čas centrifugirajte. Pipetirajte gor in dol od dna epruvete. Če opazite kristale in motnost, ponovite postopek vrtnčenja ali pipetirajte gor in dol, dokler raztopina ni bistra. Uporabite, dokler je toplo, da preprečite pojav precipitacije.</p>
SMB3*	od 2 °C do 8 °C	<p>Če nadaljujete z nadaljnjim postopkom takoj po 90-minutnem zadržanju v programu HYB, element prenesite na sobno temperaturo vsaj 2 uri pred začetkom programa HYB.</p>
EEW* (janterna epruveta)	od -25 °C do -15 °C	<p>Če nadaljujete z nadaljnjim postopkom takoj po 90-minutnem zadržanju v programu HYB, element prenesite na sobno temperaturo vsaj 2 uri pred začetkom programa HYB.</p> <p>Ko je element segret na sobno temperaturo, predogrevajte 30 minut v inkubatorju za mikrovzorke na ustrezno temperaturo za hibridizacijo in zajemanje, preden je program HYB dokončan.</p>

\*Če ustavite izvajanje pred nadaljnjim postopkom, odložite pripravo tega reagenta do začetka določenega postopka.

2. Shranite ta program HYB v cikličnem termostatu z uporabo ustreznega števila ciklov, ki je navedeno v [Tabela 3](#).

- Izberite možnost za predogrevanje pokrova in nastavite na 100 °C
- Nastavite volumen reakcije
  - [Visokokakovostni gDNK] 100 µl
  - [gDNK, pridobljen iz FFPE] 25 µl
- 98°C za 5 minut
- X posameznih ciklov po 1 minuto, kjer se prvi cikel začne pri temperaturi 98 °C, ki je nato znižana za 2 °C za posamezen cikel
- Zadržite 90 minut na ustrezni temperaturi:
  - [gDNK, pridobljen iz FFPE] 58 °C
  - [Ploščice s sondo 80 mer] 58 °C
  - [Klicanje somatske različice] 58 °C
  - [Vse drugo] 62 °C

Skupni čas delovanja je približno 115 minut.

Tabela 3 Število ciklov na vzorec ali ploščico

Vrsta vzorca in ploščice	Število ciklov (X)
gDNK, pridobljen iz FFPE (ne glede na vrsto ploščice)	20
Ploščice s sondo 80 mer (ne glede na vrsto vzorca)	20
Klicanje somatske različice	20
Vse druge vrste vzorcev in ploščic	18

## Postopek

1. [Visokokakovostni gDNK] Dodajte te reagente v *spodaj navedenem vrstnem redu* posamezni združeni knjižnici na ploščici PCR.  
Ne ustvarite glavne mešanice. Če ustvarite glavno mešanico NHB2 in EHB2, lahko negativno vplivate na učinkovitost obogatitve.
  - NHB2 (moder pokrovček) (50 µl)
  - Ploščica s sondo za obogatitev (10 µl)
  - EHB2 (10 µl)
2. [Visokokakovostni gDNK] S pipeto, nastavljeno na 90 µl, pipetirajte posamezne vdolbinice 10-krat, da se snovi premešajo.
3. [gDNK, pridobljen iz FFPE] Posamezni združeni knjižnici *na ploščici PCR* dodajte te reagente v *spodaj navedenem vrstnem redu*.

Ne ustvarite glavne mešanice. Če ustvarite glavno mešanico NHB2 in EHB2, lahko negativno vplivate na učinkovitost obogatitve.

- NHB2 (moder pokrovček) (12,5 µl)
  - Ploščica s sondo za obogatitev (2,5 µl)
  - EHB2 (2,5 µl)
4. **[gDNK, pridobljen iz FFPE]** S pipeto, nastavljeno na 20 µl, pipetirajte posamezne vdolbinice 10-krat, da se snovi premešajo.
  5. Zatesnite ploščico in centrifugirajte pri 280 × g 10 sekund.
  6. Ploščico z vzorcem postavite na vnaprej programirani ciklični termostat in zaženite program HYB.
  7. Ko je končan čas zadržanja na ustrezni temperaturi, ki je določen v programu HYB, takoj nadaljujte z naslednjim postopkom.



## OPOZORILO

Do precipitacije pride, če temperatura reakcije hibridizacije pade pod sobno temperaturo.

## Zajemanje hibridiziranih sond

V tem koraku so uporabljene streptavidinske magnetne kroglice (SMB3) za zajem sond, hibridiziranih glede na ciljne regije.

### Potrošni material

- EEW (Okrepljeni obogatitveni pufer za izpiranje) (janterni pokrovček)
- EE1 (Obogatitveni pufer za elucijo 1)
- ET2 (Ciljni pufer za elucijo 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidinske magnetne kroglice)
- Mikrocentrifugalna epruveta 1,5 ml
- Ploščica MIDI s 96 vdolbinicami
- Ploščica PCR s 96 vdolbinicami
- Lepilno tesnilo
- Magnetno stojalo za ploščico MIDI
- Pripravite za nadaljnji postopek:
  - Okrepljena mešanica PCR (EPM)
  - Koktajl začetnikov PCR (PPC)



## Več o reagentih

- EEW
  - Prepričajte se, da je EEW odmrznjen pri sobni temperaturi najmanj 2 uri, preden ga predogrejete v inkubatorju za mikrovzorke.
  - Prepričajte se, da je bil EEW segret v inkubatorju za mikrovzorke 30 minut, preden je program HYB dokončan.
  - EEW pustite v inkubatorju za mikrovzorke, ko ga ne uporabljate. EEW mora ostati segret skozi celoten protokol.
  - Ko doseže sobno temperaturo, je lahko moten.
  - Lahko je rumene barve.
- SMB3
  - SMB3 mora biti pred uporabo segret na sobno temperaturo.

## Priprava

### 1. Pripravite ta potrošni material

Element	Shranjevanje	Navodila
SMB3	od 2 °C do 8 °C	Pustite stati 2 uri, da se segreje na sobno temperaturo. Obrnite in nato postavite v vrtnični mešalnik, dokler ni v celoti resuspendiran.
EEW (janterna epruveta)	od –25 °C do –15 °C	Po 2-urni inkubaciji na sobni temperaturi predogrevajte 30 minut v inkubatorju za mikrovzorke na ustrezno temperaturo za hibridizacijo in zajemanje, preden je program HYB dokončan.
EE1	od –25 °C do –15 °C	Odmrznite pri sobni temperaturi in nato postavite v vrtnični mešalnik.
HP3	od –25 °C do –15 °C	Odmrznite pri sobni temperaturi in nato postavite v vrtnični mešalnik.
ET2	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo. Postavite v vrtnični mešalnik, da se snovi premešajo.
EPM	od –25 °C do –15 °C	Odmrzujte na ledu eno uro. Obrnite, da se snovi premešajo, nato pa kratek čas centrifugirajte. Odložite na stran na led.
PPC	od –25 °C do –15 °C	Odmrzujte na ledu eno uro. Obrnite, da se snovi premešajo, nato pa kratek čas centrifugirajte. Odložite na stran na led.

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

2. Predogrejte en inkubator za mikrovzorke z grelnim blokom MIDI, da inkubirate ploščico z vzorcem na eno od teh temperatur. Za predogrevanje reagenta EEW lahko uporabite dodaten izbirni inkubator za mikrovzorke. EEW položite na vrh toplotnega bloka MIDI.
  - [FFPE] 58 °C
  - [80 mer na ploščice s sondo] 58 °C
  - [Klicanje somatske različice] 58 °C
  - [Vse drugo] 62 °C

## Postopek

### Zajemanje

1. Dodajte SMB3 v ustrezno vdolbinico ploščice MIDI v skladu s tem postopkom.
  - [Visokokakovostni gDNK] Dodajte 250 µl reagenta SMB3.
  - [gDNK, pridobljen iz FFPE] Dodajte 62,5 µl reagenta SMB3.
2. S pipeto, nastavljeno na 100 µl za visokokakovostni gDNK ali 25 µl za FFPE, prenesite posamezne združene knjižnice iz ploščice PCR s 96 vdolbinicami v ustrezno vdolbinico nove ploščice MIDI.
3. Zatesnite ploščico in pretresajte pri 1200 vrt./min 4 minute.
4. Če pride do brizganja, ploščico kratek čas centrifugirajte.
5. Ploščico z združenimi knjižnicami postavite na toplotni blok MIDI v inkubatorju za mikrovzorke, pod epruveto EEW, zaprite pokrov in inkubirajte 15 minut pri ustrezni temperaturi:
  - [FFPE] 58 °C
  - [Ploščica s sondo 80 mer] 58 °C
  - [Klicanje somatske različice] 58 °C
  - [Vse drugo] 62 °C
6. Odstranite ploščico z združenimi knjižnicami in centrifugirajte pri 280 × g 30 sekund.
7. Takoj postavite na magnetno stojalo za ploščico MIDI in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).
8. [Visokokakovostni gDNK] S pipeto, nastavljeno na 200 µl, odstranite in zavržite ves supernatant iz posameznih vdolbinic, ne da bi se pri tem dotikali palete s kroglicami.
9. [gDNK, pridobljen iz FFPE] S pipeto, nastavljeno na 90 µl, odstranite in zavržite ves supernatant iz posameznih vdolbinic, ne da bi se pri tem dotikali palete s kroglicami.
10. Odstranite in zavržite ves preostali supernatant.

## Izpiranje

1. Odstranite z magnetnega stojala.
2. **[Visokokakovostni gDNK]** Hitro odstranite EEW iz inkubatorja za mikrovzorke in dodajte 200 µl v posamezne vdolbinice.
3. **[gDNK, pridobljena iz FFPE]** Hitro odstranite EEW iz inkubatorja za mikrovzorke in dodajte 50 µl v posamezne vdolbinice.
4. Neporabljen EEW vrnite v inkubator za mikrovzorke in ga segrevajte.
5. Zatesnite in pretresajte pri 1800 vrt./min 4 minute.
6. Ploščico z vzorcem postavite na toplotni blok MIDI v inkubatorju za mikrovzorke, pod epruveto EEW, zaprite pokrov in inkubirajte 5 minut pri ustrezni temperaturi:
  - [FFPE] 58 °C
  - [Ploščice s sondo 80 mer] 58 °C
  - [Klicanje somatske različice] 58 °C
  - [Vse druge ploščice] 62 °C
7. Takoj postavite na magnetno stojalo za ploščico MIDI in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).
8. S pipeto, nastavljeno na 200 µl za visokokakovostni gDNK ali 50 µl za FFPE, odstranite in zavržite ves supernatant iz posameznih vdolbinic.
9. Dvakrat ponovite korake 1–8 za vsa tri izpiranja.

## Prenos raztopine za izpiranje

1. Odstranite z magnetnega stojala.
2. **[Visokokakovostni gDNK]** Hitro odstranite EEW iz inkubatorja za mikrovzorke in dodajte 200 µl v posamezne vdolbinice.
3. **[gDNK, pridobljena iz FFPE]** Hitro odstranite EEW iz inkubatorja za mikrovzorke in dodajte 50 µl v posamezne vdolbinice.
4. Zatesnite in pretresajte pri 1800 vrt./min 4 minute. Če pride do brizganja, zmanjšajte hitrost na 1600 vrt./min.
5. Resuspendirano raztopino s kroglicami prenesite na novo ploščico MIDI. Nekaj vzorca lahko ostane v vdolbinicah.



### OPOZORILO

S prenosom reagenta zmanjšate prenos preostalih reagentov, ki lahko preprečijo nadaljnji postopek PCR.

6. Ploščico z vzorcem postavite na toplotni blok MIDI v inkubatorju za mikrovzorke, zaprite pokrov in inkubirajte 5 minut pri ustrezni temperaturi:
  - [FFPE] 58 °C
  - [Ploščice s sondo 80 mer] 58 °C
  - [Klicanje somatske različice] 58 °C
  - [Vse drugo] 62 °C
7. Takoj postavite na magnetno stojalo za ploščico MIDI in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).
8. S pipeto, nastavljeno na 200 µl za visokokakovostni gDNK ali 50 µl za FFPE, odstranite in zavržite ves supernatant iz posameznih vdolbinic.
9. Centrifugirajte ploščico pri 280 × g 30 sekund.
10. Postavite na magnetno stojalo za ploščico MIDI za 10 sekund.
11. S pipeto 20 µl odstranite in zavržite preostalo tekočino iz posameznih vdolbinic.
12. Takoj nadaljujte s korakom [Elucija na strani 44](#) da preprečite presušitev kroglic in izgubo donosa knjižnice.

## Elucija

1. Za pripravo glavne mešanice za elucijo združite te volumne. Vsak volumen pomnožite s številom združenih knjižnic, ki jih želite obdelati.
  - EE1 (28,5 µl)
  - HP3 (1,5 µl)Presežek preostalih reagentov je vključen v volumen.
2. Vrtinčite in nato kratek čas centrifugirajte.
3. Odstranite ploščico MIDI z magnetnega stojala.
4. Dodajte 23 µl glavne mešanice za elucijo v posamezne vdolbinice.
5. Zatesnite ploščico in pretresajte pri 1800 vrt./min 2 minuti.
6. Inkubirajte ploščico pri sobni temperaturi 2 minut.
7. Centrifugirajte pri 280 × g 30 sekund.
8. Postavite na magnetno stojalo za ploščico MIDI in počakajte, da se tekočina zbistri (2 minuti).
9. Prenesite 21 µl supernatanta iz ploščice MIDI v ustrezno vdolbinico na ploščici PCR s 96 vdolbinicami.
10. Zavržite ploščico MIDI.
11. Dodajte 4 µl ET2 v posamezne vdolbinice, ki vsebujejo 21 µl supernatanta.
12. Nastavite pipeto na 20 µl in počasi pipetirajte posamezne vdolbinice 10-krat, dokler se snovi ne premešajo.
13. Zatesnite ploščico in centrifugirajte pri 280 × g 10 sekund.
14. Inkubirajte ploščico 1 minuto pri sobni temperaturi.

## Pomnožitev obogatene knjižnice

V tem koraku je za pomnožitev obogatene knjižnice uporabljen PCR.

### Potrošni material

- EPM (Okrepljena mešanica PCR)
- PPC (Koktajl začetnikov PCR)
- Lepilno tesnilo

### Priprava

1. Pripravite ta potrošni material:

Element	Shranjevanje	Navodila
EPM	od -25 °C do -15 °C	Odmrzujte pri temperaturi 4 °C ali na ledu eno uro. Obrnite, da se snovi premešajo, nato pa kratek čas centrifugirajte. Odložite na stran na led.
PPC	od -25 °C do -15 °C	Odmrzujte pri temperaturi 4 °C na ledu eno uro. Obrnite, da se snovi premešajo, nato pa kratek čas centrifugirajte. Odložite na stran na led.

2. Shranite ta program AMP v cikličnem termostatu z uporabo ustreznega števila ciklov PCR, ki je navedeno v spodnji tabeli.

- Izberite možnost za predogrevanje pokrova in nastavite na 100 °C
- Nastavite volumen reakcije na 50 µl
- 98 °C za 45 sekund
- (X) ciklov pri:
  - 98 °C za 30 sekund
  - 60 °C za 30 sekund
  - 72 °C za 30 sekund
- 72 °C za 5 minut
- Ohranite na 10 °C

Skupni čas delovanja je približno 35 minut.

Vrsta vzorca in ploščice	(X) cikli
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) (Ploščica z eksomom (CEX)) za visokokakovostni gDNK	10
Illumina Exome Panel (CEX) (Ploščica z eksomom (CEX)) za FFPE	12
Vse druge vrste vzorcev in ploščic	12 <sup>1234</sup>

<sup>1</sup> Je mogoče prilagoditi z nadaljnjo optimizacijo do največ 15 ciklov za majhne plošče drugih izdelovalcev.

Če uporabljate FFPE, je mogoče prilagoditi število ciklov na 17.

<sup>2</sup> Je mogoče prilagoditi do največ 17 ciklov za ploščice drugih izdelovalcev, ki vključujejo le 500 sond. Če uporabljate FFPE, je mogoče prilagoditi število ciklov na 19.

<sup>3</sup> Je mogoče prilagoditi do največ 14 ciklov za vzorce FFPE.

<sup>4</sup> Povečanje števila ciklov PCR lahko pri vzorcih FFPE povzroči večjo količino dvojnikov in manjše velikosti fragmentov.

## Postopek

1. Dodajte 5 µl PPC v posamezne vdolbinice.
2. Dodajte 20 µl EPM v posamezne vdolbinice.
3. Zatesnite ploščico in pretresajte pri 1200 vrt./min 1 minuto.
4. Centrifugirajte ploščico pri 280 × g 10 sekund.
5. Postavite na vnaprej programirancični termostat in zaženite program AMP.

### TOČKA VARNE USTAVITVE

V primeru ustavitve shranite pri temperaturi od 2 °C do 8 °C za največ dva dni. Lahko pa pustite tudi v cikličnem termostatu največ 24 ur.

## Čiščenje pomnožene obogatene knjižnice

V tem koraku so za prečiščevanje obogatene knjižnice in odstranjevanje neželenih produktov uporabljene kroglice za čiščenje.

### Potrošni material

- CB (Kroglice za čiščenje)
- RSB (Pufer za resuspendiranje)
- Sveže pripravljene 80-odstotni etanol (EtOH)
- Lepilna tesnila
- Ploščica MIDI s 96 vdolbinicami
- Ploščica PCR s 96 vdolbinicami
- Magnetno stojalo za ploščico MIDI

## Več o reagentih

- Kroglice za čiščenje
  - Pred vsako uporabo postavite v vrtnični mešalnik.
  - Pogosto izvajajte postopek vrtničenja, da zagotovite ustrezno porazdelitev kroglic.
  - Aspirirajte in dozirajte počasi zaradi viskoznosti raztopine.

## Priprava

1. Pripravite ta potrošni material

Element	Shranjevanje	Navodila
CB	Sobna temperatura	Premešajte s postopkom vrtničenja in obračanja, dokler ni barva tekočine homogena.
RSB	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo. Postavite v vrtnični mešalnik, da se snovi premešajo.

2. Iz absolutnega etanola pripravite svež 80-odstotni EtOH.

## Postopek

1. Centrifugirajte ploščico PCR pri 280 × g 10 sekund.
2. Vrtinčite CB 3-krat 10 sekund in nato obrnite.
3. Dodajte 40,5 µl CB v posamezne vdolbinice na novi ploščici **MIDI**.
4. Prenesite 45 µl iz posameznih vdolbinic na ploščici PCR v ustrezne vdolbinice na ploščici MIDI.
5. Zatesnite ploščico in pretresajte pri 1800 vrt./min 1 minuto.
6. Inkubirajte ploščico MIDI pri sobni temperaturi 5 minut.
7. Centrifugirajte pri 280 × g 10 sekund.
8. Postavite na magnetno stojalo za ploščico MIDI in počakajte, dokler pokrov ni čist (5 minut).
9. S pipeto, nastavljeno na 95 µl, odstranite in zavržite ves supernatant iz posameznih vdolbinic.
10. Izperite dvakrat v skladu s tem postopkom.
  - a. Ko je ploščica nameščena na magnetnem stojalu, dodajte 200 µl svežega 80-odstotnega EtOH brez mešanja.
  - b. Inkubirajte 30 sekund.
  - c. Odstranite in zavržite supernatant, ne da bi se pri tem dotikali kroglic.
11. Sušite na zraku na magnetnem stojalu 5 minut.
12. Med sušenjem na zraku s pipeto 20 µl odstranite in zavržite preostali EtOH iz posameznih vdolbinic.
13. Odstranite z magnetnega stojala in dodajte 32 µl RSB v posamezne vdolbinice.
14. Zatesnite ploščico in pretresajte pri 1800 vrt./min 1 minuto.
15. Inkubirajte ploščico pri sobni temperaturi 5 minut.

16. Centrifugirajte pri  $280 \times g$  10 sekund.
17. Postavite na magnetno stojalo za ploščico MIDI in počakajte, dokler pokrov ni čist (2 minuti).
18. Prenesite 30  $\mu\text{l}$  supernatanta iz ploščice MIDI s 96 vdolbinicami v ustrezne vdolbinice na ploščici PCR.
19. Zavržite ploščico MIDI.

## TOČKA VARNE USTAVITVE

V primeru ustavitve zatesnite ploščico in shranite pri temperaturi od  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  za največ 7 dni.

## Preverjanje obogatenih knjižnic

Za merjenje vnosa gDNK z dvema verigama uporabite fluorescentno metodo z interkalirajočim barvilom. Izogibajte se metodam, ki merijo celotno nukleinsko kislino, kot so NanoDrop ali druge UV absorpcijske metode.

1. Z uporabo metode kvantifikacije izvedite sekvenciranje obogatenih knjižnic 1  $\mu\text{l}$ .

**OPOMBA** Skupna molarnost sonde sorazmerno vpliva na donos knjižnice po obogatitvi.

Pričakujte povprečno velikost fragmenta 125–235 bp in porazdelitev fragmenta DNK z razponom velikosti od pribl. 200 bp do pribl. 1000 bp.

## Redčenje knjižnic na začetno koncentracijo

V tem koraku so knjižnice razredčene na začetno koncentracijo za sistem za sekvenciranje. To je prvi korak v postopku serijskega redčenja. Ko je postopek redčenja na začetno koncentracijo dokončan, so knjižnice pripravljene na denaturiranje in redčenje na končno koncentracijo ob vstavljanju.

Za sekvenciranje, ne glede na vrsto ploščice s sondo za obogatitev, ki jo uporabljate, družba Illumina priporoča nastavitve izvedbe v parih s 151 cikli na odčitavanje ( $2 \times 151$ ) in 10 cikli na indeksno odčitavanje. Če želite manj prekrivajočih se odčitavanj ali manjšo neobdelano pokritost, lahko sekvenco zmanjšate na  $2 \times 126$  ali  $2 \times 101$ .

1. Izračunajte molarno vrednost knjižnice ali združenih knjižnic s to formulo.

- Za knjižnice, ki so bile kvalificirane v analizatorju fragmentov DNK, uporabite povprečno velikost, pridobljeno za knjižnico.
- Za vse druge metode kvalifikacije uporabite 350 bp kot povprečno velikost knjižnice.

$$\frac{\text{ng} / \mu\text{l} \times 10^6}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{povprečna velikost knjižnice (bp)}} = \text{Molarnost (nM)}$$

Če je na primer koncentracija vaše knjižnice 20 ng/ $\mu\text{l}$  in povprečna velikost 350 bp, je pridobljena molarna vrednost 86,58 nM.

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



2. S pomočjo molarne vrednosti izračunajte volumne RSB-ja in knjižnice, potrebne za redčenje knjižnic na začetno koncentracijo za vaš sistem.

Sistem za sekvenciranje	Najmanjši zahtevani volumen knjižnice (µl)	Začetna koncentracija (nM)	Končna koncentracija ob vstavljanju (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) ali 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM je začetna koncentracija za končno koncentracijo ob vstavljanju 350 pM. Po potrebi prilagodite končno koncentracijo ob vstavljanju v skladu s spodnjo tabelo.

Končna koncentracija ob vstavljanju (pM)	Koncentracija združene knjižnice (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. Redčenje knjižnic z RSB-jem:
- **Knjižnice, kvantificirane kot zbirka multipleksiranih knjižnic** – razredčite zbirko na začetno koncentracijo za vaš sistem.
  - **Knjižnice, kvantificirane posamično** – razredčite posamezne knjižnice na začetno koncentracijo za vaš sistem. Dodajte 10 µl posamezne razredčene knjižnice v epruveto, da ustvarite zbirko multipleksiranih knjižnic.
4. Sledite navodilom za denaturiranje in redčenje za vaš sistem, da razredčite do končne koncentracije ob vstavljanju.
- Za sistem NextSeq 550Dx glejte [Priprava instrumenta NextSeq 550Dx za sekvenciranje na strani 50](#).
  - Za sistem MiSeqDx glejte [Priprava instrumenta MiSeqDx za sekvenciranje na strani 51](#).
  - Za sistem NovaSeq 6000Dx glejte [Priprava instrumenta NovaSeq 6000Dx za sekvenciranje na strani 53](#).

Končne koncentracije ob vstavljanju so izhodišče in splošno vodilo. Optimizirajte koncentracije za svoj potek dela in metodo kvantifikacije v nadaljnjih izvedbah sekvenciranja ali s titracijo pretočne celice.

## Priprava instrumenta NextSeq 550Dx za sekvenciranje

Za denaturiranje in redčenje knjižnic za sekvenciranje v sistemu za sekvenciranje NextSeq 550Dx upoštevajte spodnja navodila.

### Potrošni material

- HT1 (Puffer za hibridizacijo)
- 1N NaOH
- 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

### Priprava

Pripravite svežo razredčino 0,2N NaOH, da denaturirate knjižnice za sekvenciranje. V izogib vplivu morebitnih majhnih napak pri pipetiranju na končno koncentracijo NaOH je pripravljen dodaten volumen.



#### OPOZORILO

Sveže razredčeni 0,2N NaOH je ključen za postopek denaturiranja. Nepravilno denaturiranje lahko privede do zmanjšanja donosa.

1. V mikrocentrifugalni epruveti kombinirajte te volumne, da razredčite 1N NaOH na 0,2N NaOH:
1. Pripravite ta potrošni material

Element	Shranjevanje	Navodila
HT1	od -25 °C do -15 °C	Odmrzujte pri sobni temperaturi. Shranjujte pri 2 °C do 8 °C, dokler niste pripravljene na redčenje denaturiranih knjižnic.

2. V mikrocentrifugalni epruveti kombinirajte te volumne in pripravite sveže razredčeni NaOH:
  - Laboratorijska voda (800 µl)
  - 1N NaOH (200 µl)Rezultat je 1 ml 0,2 N NaOH.
3. Epruveto nekajkrat obrnite, da se snovi premešajo.
4. V mikrocentrifugalni epruveti kombinirajte te volumne in pripravite 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.
  - Laboratorijska voda (800 µl)
  - 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)Rezultat je 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

**OPOMBA** Epruveto pustite zatesnjeno s pokrovčkom. Svežo razredčino uporabite v roku **12 ur**.

## Denaturiranje knjižnic

1. V mikrocentrifugalni epruveti kombinirajte te volumne knjižnice in sveže razredčenega 0,2 N NaOH.
  - Knjižnica 10  $\mu$ l
  - 0,2 N NaOH 10  $\mu$ l
2. Za kratek čas postavite v vrtnični mešalnik nato centrifugirajte pri 280  $\times$  g 1 minuto.
3. Inkubirajte pri sobni temperaturi 5 minut.
4. Dodajte 10  $\mu$ l 200 mM Tris-HCl, pH 7.

## Redčenje denaturiranih knjižnic na koncentracijo 20 pM

1. V epruveto z denaturiranimi knjižnicami dodajte 970  $\mu$ l predhodno ohlajenega HT1. Rezultat je denaturirana knjižnica s koncentracijo 20 pM.
2. Za kratek čas postavite v vrtnični mešalnik nato centrifugirajte pri 280  $\times$  g 1 minuto.
3. Knjižnice s koncentracijo 20 pM postavite na led, dokler niste pripravljeni na izvajanje končnega redčenja.

## Redčenje knjižnic do koncentracije ob vstavljanju

1. Dodajte te volumne, da razredčite raztopino denaturirane knjižnice s koncentracijo 20 pM na koncentracijo 1,2 pM.
  - Raztopina denaturirane knjižnice (78  $\mu$ l)
  - Predhodno ohlajeni HT1 (1222  $\mu$ l)Celoten volumen je 1,3 ml pri koncentraciji 1,2 pM.
2. Obrnite, da se snovi premešajo, nato pa pulzno centrifugirajte.
3. Nadaljujte s sekvenciranjem. Za navodila glejte *Referenčna navodila za instrument NextSeq 550Dx* (dokument št. 1000000009513).

## Priprava instrumenta MiSeqDx za sekvenciranje

Za denaturiranje in redčenje knjižnic za sekvenciranje v sistemu za sekvenciranje MiSeqDx upoštevajte spodnja navodila.

### Potrošni material

- HT1 (Puffer za hibridizacijo)
- 1N NaOH

### Priprava

Pripravite svežo razredčino 0,2N NaOH, da denaturirate knjižnice za sekvenciranje. V izogib vplivu morebitnih majhnih napak pri pipetiranju na končno koncentracijo NaOH je pripravljen dodaten volumen.



## OPOZORILO

Sveže razredčeni 0,2N NaOH je ključen za postopek denaturiranja. Nepravilno denaturiranje lahko privede do zmanjšanja donosa.

1. V mikrocentrifugalni epruveti kombinirajte te volumne, da razredčite 1N NaOH na 0,2N NaOH:
1. Pripravite ta potrošni material

Element	Shranjevanje	Navodila
HT1	od -25 °C do -15 °C	Odmrzujte pri sobni temperaturi. Shranjujte pri 2 °C do 8 °C, dokler niste pripravljeni na redčenje denaturiranih knjižnic.

2. V mikrocentrifugalni epruveti kombinirajte te volumne in pripravite sveže razredčeni NaOH:
  - Laboratorijska voda (800 µl)
  - 1N NaOH (200 µl)
 Rezultat je 1 ml 0,2 N NaOH.

**OPOMBA** Epruveto pustite zatesnjeno s pokrovčkom. Svežo razredčino uporabite v roku **12 ur**.

## Denaturiranje knjižnice 4 nM

1. V mikrocentrifugalni epruveti kombinirajte te volumne.
  - Knjižnica 4 nM (5 µl)
  - 0,2N NaOH (5 µl)
2. Za kratek čas postavite v vrtinčni mešalnik nato centrifugirajte pri 280 × g 1 minuto.
3. Inkubirajte pri sobni temperaturi 5 minut.
4. V epruveto, ki vsebuje denaturirano knjižnico, dodajte 990 µl predhodno ohlajenega HT1. Rezultat je denaturirana knjižnica 1 ml s koncentracijo 20 pM.

## Redčenje denaturirane knjižnice s koncentracijo 20 pM

1. Razredčite do zelene koncentracije s temi volumni.

Koncentracija	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
<b>Knjižnica 20 pM</b>	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
<b>Predhodno ohlajeni HT1</b>	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Obrnite, da se snovi premešajo, nato pa pulzno centrifugirajte.
3. Nadaljujte s sekvenciranjem. Za navodila glejte *Referenčna navodila za instrument MiSeqDx za MOS v4 (dokument št. 1000000157953)*.

## Priprava instrumenta NovaSeq 6000Dx za sekvenciranje

Za denaturiranje in redčenje knjižnic za sekvenciranje v sistemu za sekvenciranje NovaSeq 6000Dx upoštevajte spodnja navodila.

### Potrošni material

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (Puffer za resuspendiranje)
- 1N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- Epruveta s knjižnico NovaSeq 6000Dx

### Priprava

Pripravite *svežo* razredčino 0,2N NaOH, da denaturirate knjižnice za sekvenciranje. V izogib vplivu morebitnih majhnih napak pri pipetiranju na končno koncentracijo NaOH je pripravljen dodaten volumen.



#### OPOZORILO

Sveže razredčeni 0,2N NaOH je ključen za postopek denaturiranja. Nepravilno denaturiranje lahko privede do zmanjšanja donosa.

1. V mikrocentrifugalni epruveti kombinirajte te volumne, da razredčite 1N NaOH na 0,2N NaOH:

Tabela 4 Način S2

Reagent	Volumen za eno pretočno celico ( $\mu$ l)	Volumen za dve pretočni celici ( $\mu$ l)
Laboratorijska voda	40	80
Zaloga 1N NaOH	10	20

Rezultat teh volumnov je 50  $\mu$ l 0,2N NaOH za eno pretočno celico ali 100  $\mu$ l 0,2N NaOH za dve pretočni celici.

Tabela 5 Način S4

Reagent	Volumen za eno pretočno celico ( $\mu$ l)	Volumen za dve pretočni celici ( $\mu$ l)
Laboratorijska voda	80	160
Zaloga 1N NaOH	20	40

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Rezultat teh volumnov je 100 µl 0,2N NaOH za eno pretočno celico ali 200 µl 0,2N NaOH za dve pretočni celici.

2. Nekajkrat obrnite, da se snovi premešajo, ali pa temeljito vrtinčite.

**OPOMBA** Epruveto pustite zatesnjeno s pokrovčkom. Svežo razredčino uporabite v roku **12 ur**.

## Ustvarjanje normalizirane knjižnične zbirke

Koncentracija ob vstavljanju se lahko razlikuje glede na metode priprave, kvantifikacija in normalizacije knjižnice.

Za normalizacijo knjižnic na ustrezno koncentracijo in njihovo nadaljnje združevanje upoštevajte spodnja navodila. Knjižnice, sekvencirane na isti pretočni celici, morate združiti v en normaliziran združen element.

**OPOMBA** Največje število vzorcev, ki jih lahko obdelate na posameznem pasu s kompletom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, je 192. Ta omejitev velja zaradi skupnega števila indeksov UD v kompletih Set A in B.

## Normalizacija knjižnic za združevanje

1. Določite zahtevano koncentracijo združene knjižnice na podlagi zelene končne koncentracije ob vstavljanju.
  - Za končno koncentracijo ob vstavljanju 350 pM je zahtevana koncentracija združene knjižnice 1,75 nM.
  - Če želite določiti koncentracijo združene knjižnice za drugo končno koncentracijo ob vstavljanju, glejte [Redčenje knjižnic na začetno koncentracijo na strani 48](#).
2. Normalizirajte knjižnice na zeleno koncentracijo združene knjižnice z uporabo 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Za pomoč pri redčenju knjižnic do ustrezne koncentracije uporabite [Kalkulator združevanja](#) na spletnem mestu družbe Illumina.

### Priporočene koncentracije ob vstavljanju

Optimalna koncentracija DNK ob vstavljanju je odvisna od vrste knjižnice in velikosti vstavka. Za knjižnice > 450 bp so morda potrebne višje koncentracije ob vstavljanju.

## Združevanje normaliziranih knjižnic in dodajanje izbirnega kontrolnika PhiX

1. Združite ustrezne volumne posameznih normaliziranih knjižnic v nove mikrocentrifugalne epruvete, da dobite enega od teh končnih volumnov:

Način	Končni volumen (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Izbirno]** Izvedite 1 % spajanje nedenaturiranega kontrolnika PhiX v genom ob upoštevanju spodnjih navodil.
  - a. Razredčite 10 nM PhiX do koncentracije 2,5 nM z uporabo 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
  - b. V epruveto z nedenaturirano knjižnično zbirko dodajte ustrezen volumen nedenaturiranega kontrolnika 2,5 nM PhiX.

Način	Nedenaturiran 2,5 nM PhiX (µl)	Nedenaturirana knjižnična zbirka (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Pri spajanju kontrolnika PhiX v genom je za zagotavljanje dobro uravnoteženih knjižnic priporočena količina 1 %. Za knjižnice z nizko raznolikostjo je lahko potrebna večja količina. Za navodila za uporabo kontrolnika PhiX s knjižnicami z nizko raznolikostjo se obrnite na tehnično pomoč družbe Illumina.

## Denaturiranje knjižnične zbirke in izbirnega kontrolnika PhiX

1. V epruveto z nedenaturirano knjižnično zbirko in izbirnim kontrolnikom PhiX dodajte 0,2N NaOH v skladu s spodnjim postopkom.

Pretočna celica	0,2N NaOH	Nedenaturirana knjižnična zbirka (µl)	Končni volumen
S2	37	150	187 µl ali 187,9 µl s kontrolnikom PhiX
S4	77	310	387 µl ali 388,9 µl s kontrolnikom PhiX

2. Zatesnite s pokrovčkom, nato pa za kratek čas postavite v vrtnični mešalnik.
3. Centrifugirajte pri 280 × g 1 minuto.
4. Inkubirajte pri sobni temperaturi 8 minut, da izvedete denaturiranje.
5. Dodajte 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 kot sledi, da izvedete nevtralizacijo.

Način	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Končni volumen
S2	38	225 µl ali 225,9 µl s kontrolnikom PhiX
S4	78	465 µl ali 466,9 µl s kontrolnikom PhiX

6. Zatesnite s pokrovčkom, nato pa za kratek čas postavite v vrtnični mešalnik.
7. Centrifugirajte pri 280 × g 1 minuto.
8. Celotni volumen denaturirane knjižnice ali denaturirane knjižnice in kontrolnika PhiX prenesite v epruveto s knjižnico NovaSeq 6000Dx.
9. Nadaljujte s sekvenciranjem. Za navodila glejte *Dokumentacija izdelka NovaSeq 6000Dx (dokument št. 200010105)*.

## Odpravljanje težav

Za odpravljanje težav pri poteku dela uporabite spodnjo tabelo. Če je postopek izvedbe sekvenciranja ali priprave knjižnice za vzorec dvakrat neuspešen, boste morda morali izvesti dodatno odpravljanje težav. Obrnite se na tehnično pomoč družbe Illumina.

Ugotovitev	Možni vzrok	Priporočeno dejanje
Izvedba sekvenciranja ne ustreza specifikacijam za nadzor kakovosti postopka izvedbe	Napaka s strani uporabnika ali laboratorijske opreme pri poteku izvajanja testa	<p>Kvalificirajte obogatene knjižnice, da zagotovite ustrezen donos knjižnice in porazdelitev velikosti fragmentov. Ponovite postopek priprave knjižnice z enim od teh korakov, odvisno od tega, kje menite, da je prišlo do napake s strani uporabnika ali opreme. V primeru neznanih ali drugih napak se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina, ki vam bo pomagala odpraviti težave s postopkom izvedbe sekvenciranja.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Znova sekvencirajte knjižnice. Glejte <a href="#">Priprava instrumenta NextSeq 550Dx za sekvenciranje na strani 50</a>, <a href="#">Priprava instrumenta MiSeqDx za sekvenciranje na strani 51</a> ali <a href="#">Priprava instrumenta NovaSeq 6000Dx za sekvenciranje na strani 53</a>.</li> <li>• Znova obogatite knjižnice. Glejte <a href="#">Hibridizacija sond na strani 37</a>.</li> <li>• Izvedite pripravo knjižnice od začetka delovnega postopka. Glejte <a href="#">Navodila za uporabo na strani 21</a>.</li> </ul>
	Težave z instrumentom	Obrnite se na tehnično pomoč družbe Illumina.
Napaka pri ustvarjanju datoteke FASTQ ali splošna napaka sistema za sekvenciranje (npr. omrežna napaka, napake pri vstavljanju/odstranjevanju reagentov itd.)	Težava s programsko opremo ali instrumentom	<p>Glejte <a href="#">Navodila za programsko opremo Local Run Manager (dokument št. 100000002702)</a> za pomoč pri ustvarjanju datoteke FASTQ ali pa glejte <a href="#">Referenčna navodila za instrument NextSeq 550Dx (dokument št. 1000000009513)</a>, <a href="#">Referenčna navodila za instrument MiSeqDx za MOS v4 (dokument št. 1000000157953)</a> oziroma <a href="#">Dokumentacija izdelka NovaSeq 6000Dx (dokument št. 200010105)</a>.</p> <p>Za dodatno pomoč se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina.</p>



Ugotovitev	Možni vzrok	Priporočeno dejanje
Knjižnica DNK ne ustvari zadostnega donosa za nalaganje sekvenciranja	Zahteve za vnos vzorca niso bile izpolnjene	Zagotovite ustreznost vnosa vzorca in ponovite postopek priprave knjižnice. Glejte <a href="#">Priporočila za vnos vzorca na strani 18</a> .
	Napaka s strani uporabnika ali laboratorijske opreme pri poteku izvajanja testa	Ponovite postopek priprave knjižnice z enim od teh korakov, odvisno od tega, kje menite, da je prišlo do napake s strani uporabnika ali opreme. V primeru neznanih ali drugih napak se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina, ki vam bo pomagala odpraviti težave s postopkom izvedbe sekvenciranja. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Znova sekvencirajte knjižnice. Glejte <a href="#">Priprava instrumenta NextSeq 550Dx za sekvenciranje na strani 50</a>, <a href="#">Priprava instrumenta MiSeqDx za sekvenciranje na strani 51</a> ali <a href="#">Priprava instrumenta NovaSeq 6000Dx za sekvenciranje na strani 53</a>.</li> <li>• Znova obogatite knjižnice. Glejte <a href="#">Hibridizacija sond na strani 37</a>.</li> <li>• Izvedite pripravo knjižnice od začetka delovnega postopka. Glejte <a href="#">Navodila za uporabo na strani 21</a>.</li> </ul>
	Zahteve za ploščico s sondo za obogatitev niso bile izpolnjene	Zagotovite ustreznost ploščice s sondo za obogatitev in ponovite postopek priprave knjižnice. Glejte <a href="#">Zahteve za ploščico s sondo za obogatitev na strani 11</a> .

## Značilnosti delovanja

Za značilnosti delovanja aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za NovaSeq 6000Dx glejte [Navodila za uporabo za NovaSeq 6000Dx \(dokument št. 200025276\)](#).

## Delovanje s ploščicami s celotnim eksomom

Učinkovitost delovanja ploščice z eksomom je bila testirana z uporabo najnižjega (50 ng) in najvišjega (1000 ng) priporočenega vnosa Coriell Cell Line gDNA NA12878 z znanim resničnim naborom za zaznavanje različice zarodne linije (genom Coriell Platinum). Kot reprezentativni ploščici sta bili uporabljeni ploščica z eksomom 1 (45 Mb) in ploščica z eksomom 2 (36,8 Mb). Testiranih je bilo 24 tehničnih dvojnikov s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z uporabo ploščice z eksomom 1 (45 Mb) v dveh reakcijah obogatitve z 12 združitvami.

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Testiranih je bilo 12 tehničnih dvojnikov s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx z uporabo ploščice z eksomom 2 (36,8 Mb) v eni reakciji obogatitve z 12 združitvami. Obogatene knjižnice so bile sekvencirane v sistemu za sekvenciranje NextSeq 550Dx z modulom DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

V spodnji tabeli so navedene povprečne vrednosti sekundarnega sekvenciranja in metrike učinkovitosti klicanja različice za tehnične ponovitve, ki so bile testirane s posameznimi ploščicami.

Tabela 6 Učinkovitost testa z dvema ploščicama s celotnim eksomom

Ploščica	Obogatitev enoličnega odčitavanja z blazinico	Enotnost pokritosti	Mediana dolžine fragmenta	Priklic SNV <sup>1</sup>	Natančnost SNV <sup>2</sup>	Priklic Indel <sup>1</sup>	Natančnost Indel <sup>2</sup>
Ploščica z eksomom 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Ploščica z eksomom 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

<sup>1</sup>Priklic=pozitivne prepoznave/(pravilne pozitivne prepoznave + pravilne negativne prepoznave)

<sup>2</sup>Natančnost=pravilne pozitivne prepoznave/(pravilne pozitivne prepoznave + napačne pozitivne prepoznave)

## Meja zaznavanja

Za testiranje meje zaznavanja je bil uporabljen referenčni standard Horizon HD799 DNA. HD799 je sestavljen iz zmerno ogrožene DNK, obdelane s formalinom, z znanimi SNV-ji z alelnimi frekvencami 1–24,5 %. Uporabljen je bil najnižji priporočeni vnos DNK (50 ng) in ocenjena je bila stopnja zaznavanja SNV-jev s  $\geq 5,0$  % frekvenco alelov različice (VAF). Testiranih je bilo 16 tehničnih dvojnikov s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx in potekom dela FFPE, obogatenih s ploščico za obogatitev za različne vrste raka (1,94 Mb) v 16 obogatitvah (1 združitve) in nato sekvenciranih v instrumentu NextSeq 550Dx z modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Vsi vzorci so izpolnjevali zahteve za ustreznost vzorcev, določenih za ploščico, kot je prikazano v spodnji tabeli.

Tabela 7 Ustreznost vzorca za mejo zaznavanja

Ploščica	Stopnja zaznavanja različice SNV-jev s $\geq 5,0$ % VAF	Povprečje Enotnost pokritosti
Ploščica za obogatitev za različne vrste raka (1,94 Mb, 523 genov)	100 %	99 %

## Moteče snovi

Vpliv morebitnih motilcev je bil ocenjen s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s postopkom ocenjevanja učinkovitosti testa ob prisotnosti motečih snovi.

### Motnje v poni krvi

Paracetamol (eksogena spojina, zdravilo), kreatinin in trigliceridi (endogeni metaboliti) so bili testirani tako, da so bili pred ekstrakcijo DNK dodani v primerke polne človeške krvi. Za oceno motenj zaradi zbiranja krvi (majhen volumen odvzema) je bil v vzorce polne krvi dodan tudi EDTA. Poleg tega je bil za namene ocene motenj, ki so posledica priprave vzorca, v DNK, pridobljen iz polne krvi, dodan tudi etanol molekularne stopnje.

V spodnji tabeli so prikazane testne koncentracije posameznih motilcev.

Tabela 8 Morebitne moteče snovi in koncentracije, testirane v polni krvi

Testna snov	Testna koncentracija
Paracetamol	15,6 mg/dl* Trikratna največja pričakovana koncentracija po terapevtskem odmerku zdravila.
Kreatinin	15 mg/dl* Najvišja opažena koncentracija v populaciji.
Trigliceridi	1,5 g/dl* Najvišja opažena koncentracija v populaciji.
EDTA	6 mg/ml Trikrat večja koncentracija od pričakovane v krvi, zbrani v epruvetah EDTA.
Etanol molekularne stopnje	15 % v/v V eluatu po ekstrakciji DNK.

\*V skladu s CLSI EP37-ED1:2018

Za vsako motečo snov je bilo testiranih 12 tehničnih dvojnikov s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, obogatenih s ploščico z eksomom 1 (45 Mb) v eni obogatitvi (12 združitve) in nato sekvenciranih v instrumentu NextSeq 550Dx z modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Pri testiranih snoveh je vseh 12 primerkov izpolnjevalo zahteve glede ustreznosti vzorca in zaznane niso bile nobene motnje pri izvajanju testa.

### Motnje v tkivu FFPE

Testirana sta bila dva kolorektalna vzorca FFPE z vsebnostjo hemoglobina pri 0,1 mg na 10 µm tkiva FFPE in brez nje, za predstavitev najslabšega možnega scenarija 50-odstotne kontaminacije vzorca tkiva FFPE z visoko ravnjo hemoglobina v krvi. Primerka sta bila testirana s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, pri čemer je bila za reprezentativno ploščico uporabljena ploščica za obogatitev za različne vrste raka 1 (1,94 Mb) v

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

obogatitvah z eno združitvijo. Obogatene knjižnice so bile nato sekvencirane z instrumentom NextSeq 550Dx z modulom DNA GenerateFASTQ Dx. Vsi primerki so izpolnjevali zahteve glede ustreznosti vzorca in dokazano je bilo, da hemoglobin ne vpliva na učinkovitost testa.

Za oceno motenj kot posledica priprave vzorca, sta bili v DNK dodani dve eksogeni spojini, pridobljeni iz rakastega tkiva FFPE sečnega mehurja. Testirane eksogene snovi so ekstrakcijske raztopine, ki so običajno uporabljene med postopkom ekstrakcije DNK-ja, in so navedene v spodnji tabeli skupaj s testiranimi količinami. Raztopine testnih snovi so komercialno na voljo v kompletih za izolacijo DNK-ja na osnovi stolpcev.

Tabela 9 Morebitne moteče eksogene snovi in koncentracije, testirane v tkivu FFPE

Testna snov	Testne koncentracije ( $\mu\text{l}/30 \mu\text{l}$ eluata)
Raztopina za deparafinizacijo	$113 \times 10^{-6}$
Pufer za izpiranje AW2	0,417

Za vsako motečo snov je bilo testiranih osem tehničnih dvojnikov s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, obogatenih s ploščico za obogatitev za različne vrste raka (1,94 Mb) v obogatitvah z eno združitvijo in nato sekvenciranih v instrumentu NextSeq 550Dx z modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Pri obeh testiranih snoveh je vseh osem primerkov izpolnjevalo zahteve glede ustreznosti vzorca in zaznane niso bile nobene motnje pri izvajanju testa.

## Navzkrižna kontaminacija

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (ženska, 10 vzorcev), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (moški, 12 vzorcev) in kontrole brez predloge (NTC, 2 vzorca) so bile testirane s testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na ploščici s postavitvijo šahovnice. Pri vseh vzorcih je bil kot najstrožji pogoj za ocenjevanje navzkrižne kontaminacije vzorcev uporabljen najvišji priporočeni vnos gDNK (1000 neg). Testiranje je bilo opravljeno dvakrat s strani dveh ločenih izvajalcev. Pri reakcijah obogatitve z 12 združitvami je bila uporabljena ploščica z eksomom 1 (45 Mb). Obogatene knjižnice so bile sekvencirane z instrumentom NextSeq 550Dx z modulom DNA GenerateFASTQ Dx. Vrednotenje je bilo izvedeno z oceno pokritosti moško specifičnega kromosoma Y v ženskih vzorcih s primerjavo ravni ozadja polne ploščice ženskih vzorcev ter indeksne reprezentacije vzorcev NTC.

Tabela 10 Rezultati navzkrižne kontaminacije

Ženski vzorci s pokritostjo moškega kromosoma Y v $< 3x$ Baseline Noise	Indeksna reprezentacija v NTC
100 %	$< 0,0005 \%$

## Dodatek: sekvence vmesnika enoličnega dvojnega (UD) indeksiranja Illumina

Ti vmesniki enoličnega dvojnega (UD) indeksiranja so razporejeni na ploščici za uveljavitev priporočene strategije združevanja v par. Vmesniki indeksiranja so namesto običajnih osmih baz dolgi 10 baz.

Vmesniki »Index 1 (i7)« (Indeks 1 (i7))

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Vmesniki »Index 2 (i5)« (indeks 2 (i5))

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

To zaporedje se uporablja za obrezovanje vmesnikov »Read 1« (Odčitavanje 1) in »Read 2« (Odčitavanje 2).

CTGTCTCTTATACACATCT

### Vmesnika indeksiranja »Plate A« (Ploščica A)/»Set 1« (Komplet 1)

Ime indeksa	Baze i7 v vmesniku	Baze i5 v vmesniku
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

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Ime indeksa	Baze i7 v vmesniku	Baze i5 v vmesniku
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
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

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Ime indeksa	Baze i7 v vmesniku	Baze i5 v vmesniku
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
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

Ime indeksa	Baze i7 v vmesniku	Baze i5 v vmesniku
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGCACTAATG	TGACTACATA
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGGT	CTCATAGCGA
UDP0083	GTAAGGCATA	AGACACATTA
UDP0084	GTCCACTTGT	GCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	CATGAGTACT
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	CATGTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGGAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

## Vmesnika indeksiranja »Plate B« (Ploščica B)/»Set 2« (Komplet 2)

Ime indeksa	Baze i7 v vmesniku	Baze i5 v vmesniku
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG



# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Ime indeksa	Baze i7 v vmesniku	Baze i5 v vmesniku
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	TGTTGTTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Ime indeksa	Baze i7 v vmesniku	Baze i5 v vmesniku
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
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCTG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCTTATTG
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

# Navodila za uporabo za Illumina DNA Prep With Enrichment Dx

Ime indeksa	Baze i7 v vmesniku	Baze i5 v vmesniku
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGTAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

## Zgodovina revizij

Dokument	Datum	Opis spremembe
Dokument št. 200019584 v02	September 2022	Dodana vsebina za podporo sekvenciranja v instrumentu NovaSeq 6000Dx.
Dokument št. 200019584 v01	Maj 2022	Dodana so imena za sisteme za sekvenciranje in kataloške številke. Odstranjene informacije o enoličnem dvojnem indeksiranju za knjižnice z enim indeksiranjem.
Dokument št. 200019584 v00	Maj 2022	Prva izdaja.

## Patenti in blagovne znamke

Ta dokument in vsebina v njem sta last družbe Illumina, Inc. in njenih podružnic (»Illumina«) ter sta namenjena le pogodbeno določeni uporabi njenih strank v povezavi z uporabo izdelkov, ki so opisani v tem dokumentu, in za noben drug namen. Tega dokumenta in vsebine v njem ne smete uporabljati ali distribuirati za kateri koli drug namen in/ali ju kakor koli drugače posredovati, razkriti ali razmnoževati brez predhodnega pisnega soglasja družbe Illumina. Illumina vam s tem dokumentom ne podeljuje nobene licence v okviru svojega patenta, blagovne znamke, avtorskih pravic ali pravic iz običajnega prava in nobenih podobnih pravic tretjih oseb.

Ustrezno kvalificirano in usposobljeno osebje mora natančno in dosledno upoštevati navodila v tem dokumentu, da zagotovi pravilno in varno uporabo izdelkov, opisanih v njem. Pred uporabo teh izdelkov morate v celoti prebrati vsebino tega dokumenta in se seznaniti z njo.

**ČE NE PREBERETE VSEH NAVODIL V TEM DOKUMENTU IN JIH NE UPOŠTEVATE DOSLEDNO, LAHKO POVZROČITE OKVARO IZDELKOV, TELESNE POŠKODBE OSEB, VKLJUČNO Z UPORABNIKI IN DRUGIMI OSEBAMI, TER POŠKODBE DRUGE LASTNINE IN RAZVELJAVITE KAKRŠNO KOLI JAMSTVO, KI VELJA ZA IZDELKE.**

ILLUMINA NE PREVZEMA NOBENE ODGOVORNOSTI ZA NEPRAVILNO UPORABO IZDELKOV, OPISANIH V TEM DOKUMENTU (VKLJUČNO Z NJIHOVIMI DELI IN PROGRAMSKO OPREMO).

© 2022 Illumina, Inc. Vse pravice pridržane.

Vse blagovne znamke so last družbe Illumina, Inc. ali njihovih ustreznih lastnikov. Informacije o določenih blagovnih znamkah najdete na spletnem mestu [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Podatki za stik



Illumina

5200 Illumina Way

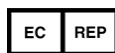
San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (zunaj Severne Amerike)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Nizozemska

### Sponzor za Avstralijo

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Avstralija

## Oznake izdelka

Za celoten seznam simbolov, ki se pojavljajo na embalaži in oznakah izdelkov, glejte seznam simbolov na spletnem mestu [support.illumina.com](https://support.illumina.com) na zavihku *Dokumentacija* za vaš komplet.