

ZA IN VITRO DIJAGNOSTIKU. SAMO ZA IZVOZ.

Namjena

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplet je reagensa i potrošnog materijala namijenjen pripremi biblioteka uzoraka iz genomskog DNK-a dobivenog iz ljudskih stanica i tkiva za razvoj *in vitro* dijagnostičkih analiza. Za pripremu biblioteka za ciljanje specifičnih genomskih područja od interesa potrebni su ispitivački paneli koje pribavlja korisnik. Generirane biblioteke uzoraka namijenjene su upotrebi na sustavima za sekvenciranje Illumina. Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx sadrži softver za postavljanje, nadzor i analizu obrade sekvenciranjem.

Načela postupka

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit namijenjen je ručnoj pripremi biblioteka za sekvenciranje DNK-a obogaćenih za ciljane područja genomskog DNK-a dobivenog iz ljudskih stanica i tkiva.

Za obogaćivanje cilja potrebni su biotinizirani oligonukleotidni paneli koje isporučuje korisnik. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilan je s rasponom veličina panela, uključujući male panele (< 20.000 sonda) do velikih panela (> 200.000 sonda). Generirane obogaćene biblioteke namijenjene su upotrebi na Illumina sustavima za sekvenciranje.

Postupak s kompletom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sastoji se od sljedećih koraka:

- **Tagmentiraj genomski DNK** – upotrebljava Enrichment BLT Small (eBLTS) za tagmentaciju unosa DNK-a. Tijekom tagmentacije, gDNK je fragmentirana i označena prilagodnicima u jednom koraku. Potreban je minimalni unos DNK-a od 50 ng za zasićenje eBLTS u tagmentacijskoj reakciji. Kada su zasićeni, eBLTS fragmentira određeni broj molekula DNK-a kako bi se stvorile normalizirane biblioteke dosljedne raspodjele veličine fragmenata.
- **Čišćenje nakon tagmentacije** – čisti DNK označen prilagodnikom na eBLTS za upotrebu u amplifikaciji.
- **Amplificiraj tagmentirani DNK** – amplificira tagmentirani DNK pomoću programa PCR ograničenog ciklusa. Jedinstveni dvostruki (unique dual, UD) indeksi dodaju se na krajeve fragmenata DNK-a, što omogućuje dvostruko jedinstveno barkodiranje biblioteka DNK-a i generiranje klastera tijekom sekvenciranja.
- **Očisti biblioteke** – upotrebljava postupak pročišćavanja kuglicama za pročišćavanje i odabir veličine amplificiranih biblioteka DNK-a.
- **Stvaranje skupova biblioteka** – kombinira biblioteke DNK-a s jedinstvenim indeksima u jednu skupinu od do 12 biblioteka. Biblioteke možete grupirati prema volumenu ili masi.
- **Hibridiziraj sonde** – sastoji se od reakcije hibridizacije tijekom koje se denaturiraju biblioteke DNK-a s dvostrukim lancima, a panel biotiniziranih DNK sonda hibridizira se u ciljane genomske regije.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilan s više panela. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne uključuje panel za obogaćivanje. Panele sonde isporučuje korisnik i moraju zadovoljavati potrebne specifikacije. Reagensi u kompletu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilni su s DNK oligonukleotidnim panelima za obogaćivanje Illumina i treće strane koji zadovoljavaju potrebne specifikacije. Za informacije o potrebnim specifikacijama za panele treće strane, pogledajte [Zahtjevi panela sonde za obogaćivanje na stranici 10](#)
- **Uhvati hibridizirane sonde** – upotrebljava Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) za hvatanje biotiniziranih sonde hibridiziranih prema ciljanim područjima interesa.
- **Amplificiraj obogaćene biblioteke** – upotrebljava PCR za amplificiranje obogaćenih biblioteka.
- **Očisti amplificirane obogaćene biblioteke** – upotrebljava postupak pročišćavanja kuglicama za pročišćavanje obogaćenih biblioteka spremnih za sekvenciranje.
- **Sekvenciranje** – sekvenciranje obogaćenih biblioteka provodi se na sustavima za sekvenciranje MiSeqDx™, NextSeq 550Dx™ ili NovaSeq 6000Dx™. Za MiSeqDx, integrirani modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager upotrebljava se za postavljanje obrade sekvenciranjem, praćenje obrade i generiranje FASTQ-a iz otkrivanja baza. Za NextSeq 550Dx s DRAGEN Server i NovaSeq 6000Dx aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se koristi za postavljanje obrade i sekundarnu analizu s nekoliko dostupnih tijekova rada.

Ograničenja postupka

- Za *in vitro* dijagnostiku.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilan s genomskim DNK-om dobivenim iz ljudskih stanica i tkiva.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilan s unosima dvolančane gDNK-a od 50 – 1000 ng. Učinkovitost nije zajamčena unosima izvan tih pragova.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne uključuje reagente za izdvajanje DNK-a. Rezultati analitičkog testiranja, uključujući testiranje ometanja, navedeni u [Karakteristike radnih svojstava na stranici 57](#) dobiveni su punom krvi i FFPE-om kao reprezentativnim vrstama uzoraka s reprezentativnim kompletima za izdvajanje DNK-a. Svi dijagnostički testovi razvijeni za upotrebu s reagensima u kompletu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit zahtijevaju potpunu provjeru za sve aspekte učinkovitosti s kompletom za izdvajanje DNK-a po izboru.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne preporučuje se za FFPE uzorke loše kvalitete s $\Delta Cq > 5$. Upotreba uzoraka s $\Delta Cq > 5$ može povećati vjerojatnost neuspjeha pripreme biblioteke i smanjiti učinkovitost analize.
- Reagensi u kompletu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit konfigurirani su i testirani za unos uzorka, reakcije obogaćivanja i pleksnost kako je navedeno u sljedećoj tablici.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Unos uzorka	Reakcije obogaćivanja	Pleksnost obogaćivanja
Komplet od 16 uzoraka	Niska kvaliteta (FFPE)	16 reakcija	1-pleksni
Komplet od 96 uzoraka	Visoka kvaliteta (npr. puna krv)	8 reakcija	12-pleksni

- Obrada FFPE unosa testirana je i preporučuje se isključivo za reakcije 1-pleksnog obogaćivanja uz upotrebu kompleta od 16 uzoraka.
- Za komplet od 96 uzoraka mogući su nestandardni pleksiteti (2-pleksni do 11-pleksni), ali imaju sljedeća ograničenja:
 - Obrada uzoraka u 2-pleksnim do 11-pleksnim reakcijama obogaćivanja smanjuje kapacitet obrade kompleta.
 - Optimalni rezultati nisu zajamčeni. Dobivanje odgovarajućeg prinosa obogaćivanja za nestandardne pleksitete može zahtijevati dodatnu optimizaciju.
 - Za strategije grupiranja uzoraka niske pleksnosti (2-pleksne do 8-pleksne) odabir prilagodnika indeksa s različitim sekvencama potreban je za optimizaciju ravnoteže boja za uspješno sekvenciranje i analizu podataka. Modul DNA GenerateFASTQ Dx na sustavima MiSeqDx i NextSeq 550Dx nudi opcije za kombinacije indeksa uravnoteženih boja tijekom postavljanja obrade. Za više informacija o strategijama grupiranja uzoraka pogledajte [Metode grupiranja uzoraka na stranici 33](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ograničen je na isporuku obogaćenih biblioteka koje se sekvenciraju samo na sustavima MiSeqDx, NextSeq 550Dx i NovaSeq 6000Dx. Za upotrebu drugih sustava za sekvenciranje potrebna je potpuna provjera za sve aspekte radnih svojstava.
- Paneli za obogaćivanje nisu uključeni kao dio ovog proizvoda. Rezultati analitičkog testiranja navedeni u [Karakteristike radnih svojstava na stranici 57](#) dobiveni su reprezentativnim panelima za obogaćivanje i namijenjeni su samo u informativne svrhe. Analitičke karakteristike radnih svojstava služe za primjer općih mogućnosti analize i ne utvrđuju mogućnosti ili prikladnost u vezi s bilo kojim specifičnim tvrdnjama o analizi. Svi dijagnostički testovi razvijeni za upotrebu s tim reagensima zahtijevaju potpunu provjeru za sve aspekte učinkovitosti.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilan s panelima Illumina i panelima za obogaćivanje trećih strana. Međutim, učinkovitost s panelima za obogaćivanje trećih strana koji ne zadovoljavaju zahtjeve panela nije zajamčena. Za informacije o zahtjevima panela pogledajte [Zahtjevi panela sonde za obogaćivanje na stranici 10](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit koristi vrijeme hibridizacije od 2 sata. Upotreba duljeg vremena hibridizacije može utjecati na metriku izvedbe.
- Moduli DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager za MiSeqDx isporučuju samo FASTQ datoteke. Ako koristite ove module, morate provesti provjeru sekundarne analize.

- Aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx dostupna je na sustavima NextSeq 550Dx s DRAGEN Server i NovaSeq 6000Dx. Aplikacija podržava više tijekova rada sekundarne analize, uključujući generiranje FASTQ-a, generiranje FASTQ-a i VCF-a za otkrivanje zametnih varijanti te generiranje FASTQ-a i VCF-a za otkrivanje somatskih varijanti. Ako koristite aplikaciju za generiranje VCF-a, ne morate provoditi provjeru valjanosti sekundarne analize. Ograničenja aplikacije uključuju sljedeće:
 - Umetanje duljine > 18 bp i brisanja duljine > 21 bp nisu potvrđene.
 - Velike varijante, uključujući one višenukleotidne (multinucleotide variant, MNV) i velike indele, možda će u izlaznoj VCF datoteci biti prepoznate kao zasebne manje varijante.
 - Mali MNV-ovi prijavljeni su kao zasebne varijante u izlaznoj VCF datoteci.
 - Zabilježena su brisanja u VCF datoteci na koordinati prethodne baze u skladu s VCF formatom. Stoga, prije prepoznavanja pojedinačne baze kao homozigotne reference provjerite susjedne varijante.
 - Ograničenja specifična za linije spolnih stanica:
 - Tijek analize rada generiranja Germline FASTQ-a i VCF-a aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx osmišljen je za pružanje kvalitativnih rezultata za otkrivanje varijanti spolnih stanica (npr. homozigotnog, heterozigotnog, divljeg tipa).
 - Varijacija broja kopija može utjecati na to prepozna li se varijanta kao homozigotna ili heterozigotna.
 - Sustav neće prijaviti više od dvije varijante na jednom lokusu, čak ni u prisutnosti varijacije broja kopija.
 - Ograničenja specifična za somatske varijante:
 - Tijek analize rada generiranja Somatic FASTQ-a i VCF-a aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx osmišljen je za pružanje kvalitativnih rezultata za određivanje somatskih varijanti (tj. prisutnost somatske varijante).
 - Tijek rada analize generiranja Somatic FASTQ-a i VCF-a ne može razlikovati somatske varijante od varijanti linija spolnih stanica. Tijek rada namijenjen je za otkrivanje varijanti u rasponu frekventnosti varijanti, ali se frekventnost varijanti ne može upotrebljavati za razlikovanje somatskih varijanti od varijanti linija spolnih stanica.
 - Normalno tkivo u uzorku utječe na prepoznavanje varijanti. Otkriveno ograničenje prepoznavanja temelji se na frekventnosti varijante u odnosu na ukupni DNK izdvojen iz tumora i normalnog tkiva.
 - Ako se na istom lokusu očita više od jednog varijantnog alela, nijedan od alela neće se označiti kao prolazna varijanta. Umjesto toga, cijeli skup alela bit će označen, ali filtriran putem višealelne oznake.

Komponente proizvoda

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se sastoji od sljedećih komponenti.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, kataloški broj 20051354 (16 uzoraka) ili broj 20051352 (96 uzoraka)

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, kataloški broj 20051355 (16 uzoraka) ili broj 20051353 (96 uzoraka)
- Modul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx za MiSeqDx, kataloški broj 20063022
- Aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za NovaSeq 6000Dx, kataloški broj 20074609
- Aplikacija DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za NextSeq 550Dx, kataloški broj 20074730

Priloženi reagensi

Izvršenje Illumina DNA Prep with Enrichment Dx zahtijeva Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A ili Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Sljedeći broj reakcija pripreme i obogaćivanja možete izvesti pomoću kompleta od 16 uzoraka ili 96 uzoraka.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Unos uzorka	Reakcije obogaćivanja	Pleksnost obogaćivanja
Komplet od 16 uzoraka	Niska kvaliteta (FFPE)	16 reakcija	1-pleksni
Komplet od 96 uzoraka	Visoka kvaliteta (npr. puna krv)	8 reakcija	12-pleksni

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

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, čuvati na temperaturi od 15 °C do 30 °C

Sljedeći reagensi isporučuju se na sobnoj temperaturi. Odmah pohranite komponente na navedenoj temperaturi kako biste osigurali ispravna radna svojstva.

Naziv reagensa	Količina epruvete		Boja poklopca	Volumen ispune	Aktivni sastojci
	16 uzoraka (broj 20050020)	96 uzoraka (broj 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Crvena	350 µl	Otopina deterdženta u vodi.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Zelena	41 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži deterdžent i soli.
Cleanup Beads (CB)	1	Nije primjenjivo*	Crvena	10 ml	Paramagnetske kuglice u krutoj fazi u puferiranoj vodenoj otopini.

* Cleanup Beads za 96 uzoraka uključeno je u Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (broj 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 Samples), čuvati na temperaturi od 15 °C do 30 °C

Za komplete od 96 uzoraka Cleanup Beads su uključeni u Illumina Prep Dx Cleanup Beads (kataloški broj 20050030). Sljedeći reagens isporučuje se na sobnoj temperaturi. Odmah pohranite komponente na navedenoj temperaturi kako biste osigurali ispravna radna svojstva. Za komplete od 16 uzoraka Cleanup Beads su uključeni u Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (kataloški broj 20050020).

Naziv reagensa	Količina	Boja poklopca	Volumen ispune	Aktivni sastojci
Cleanup Beads (CB)	4	Crvena	10 ml	Paramagnetske kuglice u krutoj fazi u puferiranoj vodenoj otopini.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 2, čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C

Sljedeći reagensi isporučuju se u hladnjaku. Odmah pohranite komponente na navedenoj temperaturi kako biste osigurali ispravna radna svojstva. Pohranite eBLTS epruvetu sa zaliham u uspravnom položaju tako da su kuglice uvijek uronjene u pufer.

Naziv reagensa	Količina epruvete		Boja poklopca	Volumen ispune		Aktivni sastojci
	16 uzoraka (broj 20050021)	96 uzoraka (broj 20050026)		16 uzoraka	96 uzoraka	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Žuta	200 µl	290 µl	Streptavidin magnetske kuglice povezane s transposomima u puferiranoj vodenoj otopini koja sadrži glicerol, EDTA, ditiotritol, sol i deterdžent.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Prozirna	1,8 ml	1,8 ml	Puferirana vodena otopina.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, čuvati na temperaturi od -25 °C do -15 °C

Sljedeći reagensi isporučuju se zamrznuti. Odmah pohranite komponente na navedenoj temperaturi kako biste osigurali ispravna radna svojstva.

Naziv reagensa	Količina epruvete		Boja poklopca	Volumen ispune		Aktivni sastojci
	16 uzoraka (broj 20050022)	96 uzoraka (broj 20050027)		16 uzoraka	96 uzoraka	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Prozirna	290 µl	290 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži magnezijevu sol i dimetilformamid.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Prozirna	200 µl	610 µl	DNA polimeraza i dNTP-ovi u puferiranoj vodenoj otopini.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 uzoraka), čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C

Za komplete od 16 uzoraka sljedeći reagensi uključeni su u Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloški broj 20050023). Za komplete od 96 uzoraka reagensi su uključeni u Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloški broj 20050028).

Sljedeći reagensi isporučuju se u hladnjaku. Odmah pohranite komponente na navedenoj temperaturi kako biste osigurali ispravna radna svojstva.

Naziv reagensa	Količina epruvete	Boja poklopca	Volumen ispune	Aktivni sastojci
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Prozirna	1,2 ml	Streptavidin magnetne kuglice u puferiranoj vodenoj otopini koja sadrži formamid, deterdžent i sol.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Prozirna	1,8 ml	Puferirana vodena otopina.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Prozirna	200 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži deterdžent i soli.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Prozirna	200 µl	Puferirana vodena otopina.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 uzoraka), čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C

Za komplete od 96 uzoraka sljedeći reagensi uključeni su u Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloški broj 20050028). Za komplete od 16 uzoraka sljedeći reagensi uključeni su u Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloški broj 20050023).

Sljedeći reagensi isporučuju se u hladnjaku. Odmah pohranite komponente na navedenoj temperaturi kako biste osigurali ispravna radna svojstva.

Naziv reagensa	Količina epruvete	Boja poklopca	Volumen ispune	Aktivni sastojci
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Prozirna	1,2 ml	Streptavidin magnetne kuglice u puferiranoj vodenoj otopini koja sadrži formamid, deterdžent i sol.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Prozirna	1,8 ml	Puferirana vodena otopina.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Prozirna	200 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži deterdžent i soli.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Prozirna	200 µl	Puferirana vodena otopina.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, čuvati na temperaturi od -25 °C do -15 °C

Sljedeći reagensi isporučuju se zamrznuti. Odmah pohranite komponente na navedenoj temperaturi kako biste osigurali ispravna radna svojstva.

Naziv reagensa	Količina epruvete		Boja poklopca	Volumen ispune	Aktivni sastojci
	16 uzoraka (br. 20050024)	96 uzoraka (br. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Prozirna	580 µl	Otopina deterdženta u vodi.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Jantarna	4,1 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli i deterdžent.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Prozirna	320 µl	Mješavina PCR početnica (oligonukleotida).
2N NaOH (HP3)	1	1	Prozirna	200 µl	2N otopina natrijevog hidroksida (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Plava	480 µl	Puferirana vodena otopina s Cot-1 DNK, sredstvom za zgušnjavanje i formamidom
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Prozirna	200 µl	DNA polimeraza i dNTP-ovi u puferiranoj vodenoj otopini.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, čuvati na temperaturi od -25 °C do -15 °C

Sljedeći reagensi isporučuju se zamrznuti. Odmah pohranite komponente na navedenoj temperaturi kako biste osigurali ispravna radna svojstva. Za sekvence prilagodnika indeksa pogledajte [Dodatak: Sljedovi prilagodnika za indekse Illumina UD na stranici 62](#).

Komponenta	Količina
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 indeksa), broj 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 indeksa), broj 20050039	1

Reagensi koji nisu priloženi

Obavezni reagensi koji nisu priloženi

- Reagensi za izdvajanje i pročišćavanje DNK-a
- Reagensi za kvantifikaciju DNK-a

- Etanol (200-proof, za upotrebu u molekularnoj biologiji)
- Voda bez nukleaze
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- Otopina 1 N NaOH, kvalitete molekularne biologije
- Ako upotrebljavate sustav za sekvenciranje NextSeq 550Dx:
 - 200 mM Tris, pH 7,0 (može se razrijediti s 1 M Tris-HCL, pH 7,0)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) (kataloški broj 20028871)
- Ako upotrebljavate sustav za sekvenciranje MiSeqDx:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (kataloški broj 20037124)
- Ako upotrebljavate sustav za sekvenciranje NovaSeq 6000Dx:
 - 400 mM Tris, pH 8,0 (može se razrijediti s 1 M Tris-HCL, pH 8,0)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 ciklusa) (kataloški broj 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 ciklusa) (kataloški broj 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (kataloški broj 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (kataloški broj 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (kataloški broj 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 u pakiranju (kataloški broj 20062291)

Zahtjevi panela sonde za obogaćivanje

Reagensi u kompletu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit su kompatibilni s oligonukleotidnim panelima DNK-a za obogaćivanje tvrtke Illumina i trećih strana. Ako koristite biotinizirane DNK sonde treće strane (fiksne ili prilagođene panele), pobrinite se da zadovoljavaju potrebne specifikacije.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit optimiziran je i potvrđen pomoću sljedećih specifikacija panela treće strane. Usporediva učinkovitost nije zajamčena kada se koriste paneli trećih strana koji ne zadovoljavaju specifikacije.

- 80 bp ili 120 bp duljina sonde
- Između 500 i 675.000 sondi
- Jednolančana ili dvolančana DNK
- Ukupni unos sonde od ≥ 3 pmola za obogaćivanje pri pleksitetima od 1-pleksnog do 12-pleksnog

Skladištenje i rukovanje

- Sobna je temperatura definirana kao temperatura od 15 °C do 30 °C.

- Reagensi su stabilni kad se skladište kako je navedeno do datuma isteka roka trajanja navedenog na naljepnicama na kompletima. Za temperature skladištenja pogledajte dio [Priloženi reagensi na stranici 5](#).
- Zamrznuti reagensi stabilni su najviše četiri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja prije navedenog datuma isteka roka valjanosti.
- Postupak s kompletom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sadrži sljedeće točke sigurnog prekidanja:
 - Nakon [Amplificiraj tagmentirani DNK na stranici 28](#), amplificirane biblioteke stabilne su do 30 dana ako se čuvaju na temperaturi od -25 °C do -15 °C.
 - Nakon [Očisti biblioteke na stranici 30](#) očišćene amplificirane biblioteke stabilne su do 30 dana ako se čuvaju na temperaturi od -25 °C do -15 °C.
 - Nakon [Grupiraj unaprijed obogaćene biblioteke na stranici 33](#), grupirane biblioteke stabilne su do 30 dana ako se čuvaju na temperaturi od -25 °C do -15 °C.
 - Nakon [Amplificiraj obogaćenu biblioteku na stranici 43](#), obogaćena, amplificirana pločica biblioteka može ostati na PCR uređaju do 24 sata. Pločicu možete čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C do 48 sati.
 - Konačno očišćene obogaćene biblioteke stabilne su do 7 dana ako se čuvaju na temperaturi od -25 °C do -15 °C.
- Ako je bilo koje pakiranje ili sadržaj komponenti za Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit oštećeno ili načeto, obratite se Illumina službi za korisnike.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) može stvoriti vidljive taloge ili kristale. Ako primijetite talog, zagrijavajte na 37 °C 10 minuta, a zatim promiješajte u vrtložnoj miješalici dok se talog ne otopi.
- Hybridization Oligos (HYB) i Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) moraju se prethodno zagrijati na istu temperaturu kao temperatura zadržavanja hibridizacije primjenjiva za tip uzorka i panel sonde. Za više informacija o rukovanju HYB i EEW, pogledajte [Napomene povezane s postupkom na stranici 16](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) i HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) mogu razviti kristale i zamućenost. Ako primijetite kristale i zamućenost, promiješajte u vrtložnoj miješalici ili pipetirajte gore i dolje kako biste promiješali dok otopina ne postane bistra. Prije pipetiranja obavezno prethodno zagrijte NHB2.
- Prilikom rukovanja Cleanup Beads (CB), primijenite sljedeće najbolje prakse:
 - Nikad ne zamrzavajte kuglice.
 - Neposredno prije upotrebe, promiješajte kuglice u vrtložnoj miješalici dok ne budu ponovno suspendirane i boja se čini homogena.
- Prilikom rukovanja Enrichment BLT Small (eBLTS), primijenite sljedeće najbolje prakse:
 - Pohranite eBLTS epruvetu u uspravnom položaju tako da su kuglice uvijek uronjene u pufer.
 - Temeljito promiješajte eBLTS u vrtložnoj miješalici dok se kuglice ne resuspendiraju. Kako biste izbjegli ponovno taloženje kuglica, ne preporučuje se centrifugiranje prije pipetiranja.
 - Ako se kuglice zalijepe na bočnu ili gornju stranu ploče s 96 jažica, centrifugirajte na 280 × g 3 sekunde, a zatim pipetirajte da se resuspendiraju.
- Prilikom rukovanja pločicama prilagodnika indeksa, primijenite sljedeće najbolje prakse:
 - Nemojte dodavati uzorke na pločicu prilagodnika indeksa.

- Svaka jažica indeksne pločice samo je za jednokratnu uporabu.

Obavezna oprema i materijal koji nisu priloženi

Pored kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, provjerite imate li potrebnu opremu i materijale prije početka protokola.

Oprema

Prije početka protokola, provjerite imate li potrebnu opremu.

Protokol je optimiziran i potvrđen pomoću stavki s navedenim specifikacijama. Usporediva učinkovitost nije zajamčena kada se oprema koristi izvan specifikacija.

Neke su stavke potrebne samo za određene radne procese. Te su stavke navedene u zasebnim tablicama.

- Ciklički termostats sljedećih specifikacija:
 - Grijani poklopac
 - Minimalni raspon regulacije temperature od 10 °C do 98 °C
 - Minimalna preciznost temperature od $\pm 0,25$ °C
 - Maksimalni volumen reakcije od 100 μ l
 - Kompatibilan s PCR pločicama punog profila od 96 jažica
- Inkubator mikrouzoraka sa sljedećim specifikacijama:
 - Raspon temperature od okoline +5,0 °C do 99,0 °C
 - Kompatibilan s pločicama MIDI s 96 jažica
- Inkubacijski umetci za mikrouzorke kompatibilni s pločicama MIDI od 96 jažica
- Iznimno brzi vibracijski uređaj za mikropločicu s rasponom brzine miješanja od 200 do 3000 o/min
- Magnetski stalak kompatibilan s PCR pločicama s 96 jažica
- Magnetski stalak kompatibilan s pločicama MIDI s 96 jažica
- Fluorometar kompatibilan s metodom kvantifikacije
- Analizator fragmenata DNK-a
- Precizne pipete:
 - Jednokanalne i višekanalne pipete od 10 μ l
 - Jednokanalne i višekanalne pipete od 20 μ l
 - Jednokanalne i višekanalne pipete od 200 μ l
 - Jednokanalne pipete od 1000 μ l
 - Precizne pipete osiguravaju točnu isporuku reagensa i uzorka. Jednokanalne ili višekanalne pipete mogu se upotrebljavati ako se redovito kalibriraju i ako su točne unutar 5 % navedenog volumena.

- Centrifuga za mikroploče
- Mikrocentrifuga
- Jedan od sljedećih sustava za sekvenciranje Illumina:
 - Instrument MiSeqDx, kataloški broj DX-410-1001
 - Instrument NextSeq 550Dx, kataloški broj 20005715 s opcijskim poslužiteljem Illumina DRAGEN Server za NextSeq 550Dx, kataloški broj 20086130
 - Instrument NovaSeq 6000Dx, kataloški broj 20068232
- **[Opcionalno]** Vakuumski koncentrator
- **[FFPE]** Sustav detekcije PCR-a u stvarnom vremenu

Materijali

Prije početka protokola, provjerite imate li potrebnu opremu.

Neke su stavke potrebne samo za određene radne procese. Te su stavke navedene u zasebnim tablicama.

Protokol je optimiziran i potvrđen pomoću navedenih stavki. Usporedive učinkovitosti nisu zajamčene pri upotrebi alternativnih materijala.

- Filtrirani vrhovi pipeta
- Konusne epruvete za centrifugiranje, 15 ml ili 50 ml
- Epruvete za mikrocentrifugu, 1,5 ml
- Višekanalni spremnici za reagense bez RNaze/DNaze, za jednokratnu upotrebu
- Trake za 8 epruveta i čepovi bez RNaze/DNaze
- Serološke pipete
- Polipropilenska ploča za pohranu dubokih jažica s 96 jažica, od 0,8 ml (MIDI pločica)
- Hard-Shell pločice za PCR s 96 jažica punog profila
- **[FFPE]** qPCR pločice kompatibilne s qPCR instrumentom
- Pločica s 96 jažica i sljedećim specifikacijama:
 - Optičko prozirni poliester koji se može odlijepiti
 - Prikladno za PCR pločice punog profila
 - Jako ljepilo koje podnosi višestruke promjene temperature od -40 °C do 110 °C
 - Bez DNaze/RNaze
- Plastični potrošni materijal kompatibilan s kvantifikacijskom metodom po izboru
- Komplet za fluorometrijsku kvantifikaciju dsDNA kompatibilan s odabranim sustavom kvantifikacije:
 - Za kvantifikaciju unaprijed obogaćenih amplificiranih biblioteka može se koristiti komplet za kvantifikaciju širokog raspona.

- Za kvantifikaciju obogaćenih biblioteka, raspon kvantifikacijskog kompleta ovisi o upotrijebljenom panelu sonde.
- Komplet za analizu fragmenata za kvalifikaciju biblioteke s odabranim kvalifikacijskim sustavom:
 - Za kvalifikaciju unaprijed obogaćenih amplificiranih biblioteka može se koristiti komplet širokog raspona.
 - Za kvalifikaciju obogaćenih biblioteka, raspon kvalifikacijskog kompleta ovisi o upotrijebljenom panelu sonde.
- **[Opcionalni]** Komplet za izdvajanje DNK-a iz ljudskih stanica i tkiva. Možete koristiti bilo koju provjerenu metodu izdvajanja.

Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka



OPREZ

Svim uzorcima rukujte kao da su potencijalno zarazne tvari.

- Ova je analiza kompatibilna s genomskim DNK-om dobivenim iz ljudskih stanica i tkiva.
- Za komercijalno dostupnu pročišćenu gDNK, pobrinite se da su uzorci transportirani pod ispravnim uvjetima i pohranjeni u skladu s uputama proizvođača. Pridržavajte se najboljih praksi za cikluse pohrane i odmrzavanja gDNK.
- Za unos pune krvi slijedite zahtjeve za prikupljanje, transport i pohranu krvi primjenjive na metodu izdvajanja DNK-a. Može se koristiti bilo koja potvrđena metoda ekstrakcije. Transport pune krvi mora biti u skladu s državnim, saveznim i lokalnim propisima koji se odnose na transport etioloških tvari.
- Za izdvajanje DNK-a iz FFPE tkiva može se koristiti bilo koja potvrđena metoda izdvajanja. Slijedite upute i preporuke koje se primjenjuju na odabrani način izdvajanja kako biste odredili sljedeće prakse:
 - Fiksacija u formalinu i metoda ugradnje u parafin za tkiva, kako bi se osigurala najbolja kvaliteta izdvojene DNK-a.
 - Pohrana FFPE uzoraka.
 - Zahtjevi za početni materijal, kao što su broj i debljina FFPE sekcija. Većina metoda pročišćavanja preporučuje korištenje svježih izrezanih sekcija.

Upozorenja i mjere opreza

- Reagensi u kompletu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sadrže potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu s odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Za dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti, pogledajte Sigurnosno-tehnički list (SDS) na adresi support.illumina.com/sds.html.

- Sve ozbiljne incidente povezane s ovim proizvodom odmah prijavite tvrtki Illumina i nadležnim tijelima država članica u kojima borave korisnik i pacijent.
- Svim uzorcima krvi rukujte kao da je poznata njihova zaraženost virusom humane imunodeficijencije (HIV-om), virusom humanog hepatitisa B (HBV-om) i drugim patogenim tvarima koje se prenose krvlju (univerzalne mjere opreza).
- Pridržavajte se laboratorijskih mjera opreza. Nemojte pipetirati ustima. Nemojte jesti, piti ni pušiti u označenim prostorima za rad. Kad rukujete uzorcima i reagensima iz kompleta, koristite se rukavicama za jednokratnu upotrebu i laboratorijskim kutama. Nakon rukovanja uzorcima i reagensima iz kompleta temeljito operite ruke.
- Da biste spriječili degradaciju uzorka ili reagensa, prije pokretanja protokola provjerite jesu li se sva isparavanja natrijeva hipoklorita posve izvjetrila.
- Kontaminacija uzoraka drugim PCR proizvodima/amplikonima može uzrokovati netočne i nepouzdanе rezultate. Da biste izbjegli kontaminaciju, primijenite sljedeće najbolje prakse:
 - Primijenite odgovarajuće laboratorijske postupke i laboratorijsku higijenu.
 - Izvršite korake tijeka rada u određenim područjima prije ili poslije amplifikacije.
 - Čuvajte iskorištene reagense prije čišćenja biblioteka u predamplifikacijskom području.
 - Odvojite reagense prije amplifikacije od reagensa nakon amplifikacije.
 - Pobrinite se da imate posebnu opremu npr. pipete, vrhove pipeta, vrtložnu miješalicu i centrifugu za područja prije amplifikacije i nakon amplifikacije.
- Izbjegavajte križnu kontaminaciju. Upotrijebite svježe vrhove pipeta između uzoraka i između reagensa za doziranje. Korištenje filtriranih vrhova smanjuje rizik od prijenosa amplikona i križne kontaminacije od uzorka do uzorka.
 - Prilikom dodavanja ili prijenosa uzoraka ili glavnih mješavina reagensa, promijenite vrhove između svakog uzorka.
 - Prilikom dodavanja prilagodnika indeksa višekanalnom pipetom, promijenite vrhove između svakog reda ili svakog stupca. Ako upotrebljavate jednokanalnu pipetu, promijenite vrhove između svakog uzorka.
 - Uklonite neiskorištene pločice prilagodnika indeksa iz radnog područja.
- Za korake ispiranja etanolom primijenite sljedeće najbolje prakse:
 - Uvijek pripremite svježi 80-postotni etanol. Etanol može apsorbirati vodu iz zraka, što može utjecati na rezultate.
 - Provjerite je li sav etanol uklonjen s dna jažica tijekom koraka pranja. Preostali etanol može utjecati na rezultate.
 - Pridržavajte se navedenog vremena sušenja za korake magnetskog stalka kako biste osigurali potpuno isparavanje. Preostali etanol može utjecati na učinak naknadnih reakcija.
- Uvijek pripremite glavne mješavine prije upotrebe i nikad nemojte pohranjivati kombinirane radne otopine.
- Učinkovitost testa Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nije zajamčena kada se ne slijede postupci navedeni u uputi o lijeku.

- Ne koristite komponente kompleta nakon datuma isteka valjanosti navedenog na naljepnici na pakiranju kompleta.
- Nemojte mijenjati komponente kompleta iz različitih Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kompleta. Kompleti su navedeni na naljepnici kompleta.

Napomene povezane s postupkom

Preporuke za unos DNK-a

Protokol Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilan s unosima visokokvalitetne, dvolančane genomske DNK (gDNK) od 50 – 1000 ng.

Pobrinite se da početni uzorak gDNK-a ne sadrži > 1 mM EDTA te da nema organskih zagađivača kao što su fenol i etanol. Te tvari mogu ometati reakciju tagmentacije i dovesti do neuspjeha analize.

Unos gDNK-a $\geq$ 50 ng

Za unose gDNK-a između 50 – 1000 ng nije potrebno kvantificirati i normalizirati početni uzorak gDNK-a.

Unos gDNK-a < 50 ng

Mogu se koristiti unosi DNK-a od 10 – 50 ng, sa sljedećim prilagodbama:

- Ako se upotrebljava unos 10 – 49 ng gDNK-a, preporučuje se kvantificiranje početnog uzorka gDNK kako bi se odredio broj ciklusa PCR-a potrebnih nakon tagmentacije. Upotrijebite metodu temeljenu na fluorometriji za kvantifikaciju unosa dvolančane gDNK. Izbjegavajte metode kojima se mjeri ukupna nukleinska kiselina, kao što je NanoDrop ili druge metode UV apsorpcije.
- Ovaj protokol ne normalizira konačne unaprijed obogaćene prinose biblioteke od 10 – 49 ng gDNK te je stoga potrebna kvantifikacija i normalizacija biblioteka prije i nakon obogaćivanja.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit karakteriziran je i potvrđen za unose DNK-a od 50 – 1000 ng. Ekvivalentna učinkovitost proizvoda ne može se jamčiti za unose gDNK-a < 50 ng.

Preporuke za unos krvi

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilan s gDNK-om izdvojenim iz periferne pune krvi. Može se koristiti bilo koja potvrđena metoda ekstrakcije. Prilikom vađenja gDNK-a iz pune krvi nije potrebna početna kvantifikacija ulaznog DNK-a, a Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit proizvodi normalizirane prinose unaprijed obogaćene biblioteke.

Sljedeći čimbenici mogu negativno utjecati na količinu DNK-a dobivenu iz uzoraka pune krvi, a time i na normalizaciju biblioteke:

- Dob uzorka krvi
- Uvjeti skladištenja

- Temeljna medicinska stanja koja utječu na broj bijelih krvnih stanica

Preporuke za unos uzorka FFPE tkiva

Upotrijebite sljedeće kriterije kvalitete FFPE DNK da biste odredili odgovarajući unos za uspješnu pripremu biblioteke:

- Za FFPE uzorke s vrijednosti ΔCq od ≤ 5 , preporučeni ulaz DNK je 50 – 1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se ne preporučuje za FFPE uzorke loše kvalitete s $\Delta Cq > 5$. Upotreba uzoraka s $\Delta Cq > 5$ moguća je, ali može povećati vjerojatnost neuspjeha pripreme biblioteke i smanjiti učinkovitost analize.

Izdvajanje iz FFPE-a

Upotrijebite metodu izolacije nukleinske kiseline koja proizvodi visoke prinose oporavka, smanjuje potrošnju uzorka i čuva integritet uzorka. Možete koristiti bilo koju provjerenu metodu ekstrakcije DNK-a iz FFPE uzoraka. Za gDNK izdvojen iz FFPE tkiva potrebna je početna kvantifikacija ulaznog DNK-a, a Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne proizvodi normalizirane prinose unaprijed obogaćene biblioteke.

FFPE DNK kvalifikacija

gDNK izdvojena iz FFPE tkiva mora biti kvalificirana prije upotrebe. Za optimalnu izvedbu procijenite kvalitetu uzorka DNK-a pomoću provjerene metode izdvajanja za kvalifikaciju DNK-a izdvojenog iz FFPE uzoraka. Protokol Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilan s uzorcima FFPE DNK-a s vrijednošću ΔCq od ≤ 5 . Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se ne preporučuje za FFPE uzorke loše kvalitete s $\Delta Cq > 5$. Upotreba uzoraka s $\Delta Cq > 5$ moguća je, ali može povećati vjerojatnost neuspjeha pripreme biblioteke i smanjiti učinkovitost analize.

[Opcionalni] FFPE referentni uzorci

Prilikom izvođenja protokola koristite karakterizirane referentne materijale kao što je Horizon HD799 (DNK) kao pozitivnu kontrolu. Kvalificirani FFPE materijali iz stanične linije dobiveni ksenografti mogu se također koristiti kao referentni uzorci. Upotrijebite metodu temeljenu na fluorometriji za kvantifikaciju referentnih materijala prije uporabe.

NAPOMENA Obradapozitivnog kontrolnog referentnog uzorka ili kontrole bez predloška smanjuje ukupan broj nepoznatih uzoraka koji se mogu obrađivati.

Preporuke za unos uzoraka

Preporuke za unos uzoraka za Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sažete su u sljedećoj tablici.

Tablica 1 Preporuke za unos uzoraka

Vrsta unosa uzorka	Ulazni iznos uzorka	Potrebna je kvantifikacija unosa DNK-a	Potrebna kvaliteta unosa DNK-a	Prinos normalizirane unaprijed obogaćene biblioteke
gDNK	10 – 49 ng	Da	Omjer 260/280 od 1,8 – 2,0	Ne
gDNK	50 – 1000 ng	Ne	Omjer 260/280 od 1,8 – 2,0	Da
gDNK iz krvi	50 – 1000 ng	Ne	Omjer 260/280 od 1,8 – 2,0	Da
gDNK iz FFPE-a	50 – 1000 ng	Da	Vrijednost ΔC_q od ≤ 5	Ne

Preporučeni ciklusi PCR-a za program eBLTS PCR-a prilagođavaju se na temelju koncentracije i kvalitete unosa uzorka. Za više informacija pogledajte [Amplificiraj tagmentirani DNK na stranici 28](#).

Savjeti i tehnike

Izbjegavanje križne kontaminacije

- Prilikom dodavanja ili prijenosa uzoraka promijenite vrhove između *svakog uzorka*.
- Prilikom dodavanja prilagodnika indeksa višekanalnom pipetom, promijenite vrhove između *svakog reda* ili *svakog stupca*. Ako upotrebljavate jednokanalnu pipetu, promijenite vrhove između svakog uzorka.

Brtvljenje pločice

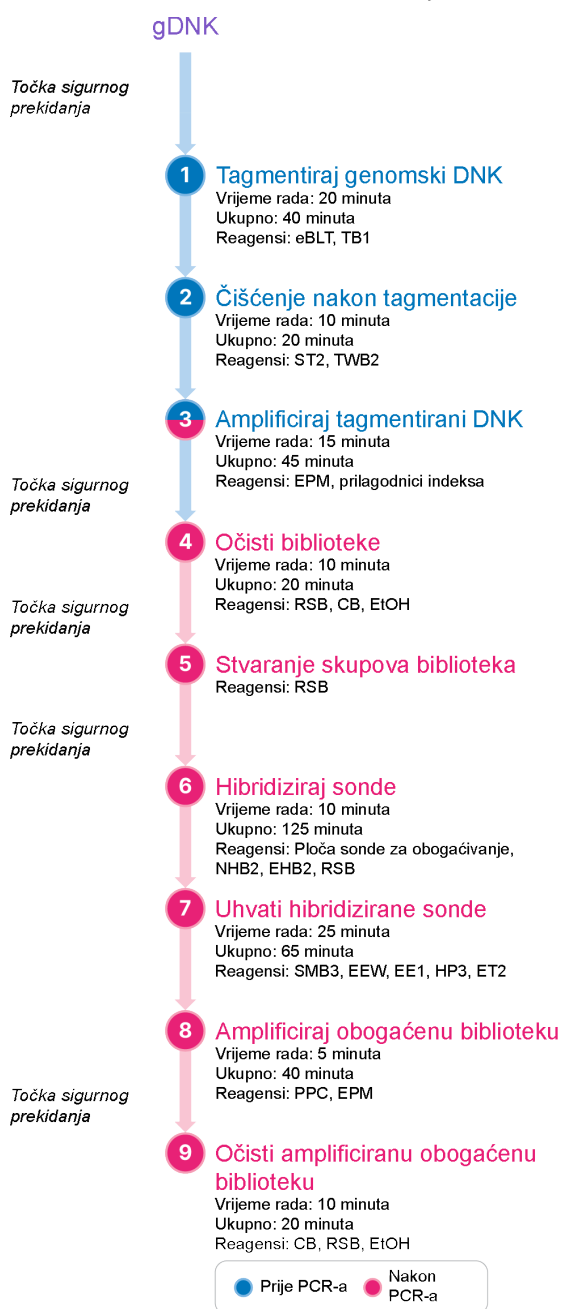
- Uvijek zabrtvite pločicu s 96 jažica novom ljepljivom brtvom pomoću gumenog valjka kako biste prekrili pločicu prije sljedećih koraka u protokolu:
 - Koraci trešnje
 - Koraci inkubacije. Ako pločicu ne zabrtvite pravilno, to može dovesti do isparavanja tijekom inkubacije.
 - Koraci centrifuge
 - Koraci za hibridizaciju
- Uvjerite se da su rubovi i jažice potpuno zabrtvljeni kako biste smanjili rizik od križne kontaminacije i isparavanja.
 - Ako primijetite bilo kakvu tekućinu ili kondenzaciju na brtvi ili bočnim stranama ležišta jažica, centrifugirajte po potrebi prije otvaranja.
- Stavite pločicu na ravnu površinu prije nego što polako uklonite brtvu.

Rukovanje Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Pohranite epruvetu s eBLTS zalihamama u uspravnom položaju u hladnjak tako da su kuglice uvijek uronjene u pufer.
- Neposredno prije upotrebe, temeljito u vrtložnoj miješalici promiješajte eBLTS epruvetu sa zalihamama dok se kuglice ne resuspendiraju. Kako biste izbjegli ponovno taloženje kuglica, ne preporučuje se centrifugiranje prije pipetiranja.
- Ako se kuglice zalijepe na bočnu ili gornju stranu ploče s 96 jažica, centrifugirajte na $280 \times g$ 3 sekunde, a zatim pipetirajte da se resuspendiraju.
- Prilikom pranja eBLTS:
 - Koristite odgovarajuće magnetsko postolje za pločicu.
 - Pločicu držite na magnetskom stalku sve dok upute ne budu navedene za njezino uklanjanje.
 - Ako se kuglice aspiriraju u vrhove pipeta, vratite ih u pločicu na magnetskom stalku i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (2 minute).

Tijek rada za Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Sljedeći dijagram ilustrira tijek rada za Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Točke sigurnog prekidanja označene su između koraka. Procjene vremena temelje se na obradi 12 uzoraka pri 12-pleksnom obogaćivanju.



Upute za upotrebu

Ovo poglavlje opisuje protokol Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Pregledajte planirani cjelokupni tijek rada sekvenciranja, od uzorka do analize, kako biste osigurali kompatibilnost proizvoda i parametara eksperimenta.
- Prije nego što nastavite, potvrdite sadržaj kompleta i provjerite imate li potrebne komponente, opremu i materijale.
 - Biotinilirane sonde treće strane moraju ispunjavati specifične zahtjeve. Pogledajte [Zahtjevi panela sonde za obogaćivanje na stranici 10](#) kako biste bili sigurni da vaše sonde treće strane ispunjavaju zahtjeve.
- Slijedite protokol prikazanim redoslijedom, koristeći navedene volumene i parametre inkubacije.
- Ako u protokolu nije navedena točka sigurnog prekidanja, odmah prijedite na sljedeći korak.
- Prilikom stvaranja glavne mješavine, prekomjerna količina uključena je u isporučene volumene.
- Obavezno upotrijebite odgovarajuće magnetsko postolje za svoju vrstu pločice.

Priprema za grupiranje uzoraka

Ovaj je korak potreban kako bi se osiguralo uspješno sekvenciranje obogaćenih biblioteka. Objedinjavanje biblioteka može se dogoditi prije obogaćivanja i prije sekvenciranja.

Prije obogaćivanja – pojedinačne indeksirane amplificirane biblioteke objedinjuju se zajedno za obogaćivanje odabranim panelom sonde. To stvara višestruki skup obogaćenih biblioteka. Obrada FFPE unosa uzorka testirana je i preporučuje se isključivo za reakcije 1-pleksnog obogaćivanja. Za visokokvalitetnu gDNK, testirana je 12-pleksna, ali moguće su 2-pleksne do 11-pleksne.

Prije sekvenciranja – 1-pleksno obogaćene biblioteke i/ili višestruko obogaćene biblioteke objedinjuju se prije sekvenciranja. Broj obogaćenih biblioteka koje se mogu sekvencirati ovisi o ciljnoj dubini očitavanja za svaki uzorak na sustavu za sekvenciranje.

Jedinstveno dvostruko indeksiranje

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit upotrebljava jedinstvene dvostruke indekse.

- Biblioteke s dvostrukim indeksom dodaju sekvence indeksa 1 (i7) i indeksa 2 (i5) kako bi generirale jedinstveno označene biblioteke.
- UD indeksi imaju različite, nepovezane sekvence indeksa za i7 i i5 čitanje indeksa. Indeksi imaju duljinu od 10 baza.

Odabir prilagodnika indeksa s različitim sekvencama za skupne biblioteke optimizira ravnotežu boja za uspješno sekvenciranje i analizu podataka. Skupovi pleksnosti koji su ≥ 10 -pleksni inherentno su uravnoteženi bojama, tako da možete koristiti bilo koju kombinaciju prilagodnika indeksa. Tijekom obrade sekvenciranjem, modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager pruža opcije za kombinacije indeksa uravnotežene bojama i obavještava vas ako nema dovoljno raznolikosti u odabranim kombinacijama indeksa.

Za informacije o sekvencama Illumina UD prilagodnika indeksa i izgledima pločica, pogledajte [Dodatak: Sljedovi prilagodnika za indekse Illumina UD na stranici 62](#)

Podržani pleksiteti obogaćivanja

Reagensi u kompletu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit su konfigurirani i testirani pri 1-pleksnom i 12-pleksnom pleksitetu obogaćivanja. Iako su mogući drugi pleksiteti obogaćivanja, neki pleksiteti zahtijevaju dodatnu pripremu prije obogaćivanja biblioteke i reagentse panela sonde za obogaćivanje.

Pribavljanje odgovarajućeg prinosa obogaćivanja za nestandardnu pleksnost obogaćivanja može zahtijevati dodatnu optimizaciju. Optimalni rezultati nisu zajamčeni.

- **Pleksnost obogaćivanja** – broj unaprijed obogaćenih biblioteka (1 – 12) objedinjenih u jednu reakciju obogaćivanja za hibridizaciju s panelima sonde za obogaćivanje. Na primjer, kombiniranje 12 unaprijed obogaćenih biblioteka zajedno stvara 12-pleksnu skupinu za obogaćivanje.
- **Reakcija obogaćivanja** – broj jedinstvenih priprema za reakciju obogaćivanja, bez obzira na broj unaprijed obogaćenih biblioteka objedinjenih po reakciji. Primjerice, jedna reakcija obogaćivanja može pripremiti 1-pleksnu ili 12-pleksnu skupinu za obogaćivanje.

Da biste izračunali ukupan broj postobogaćenih biblioteka, pomnožite pleksnost obogaćivanja po reakciji s brojem reakcija obogaćivanja. Na primjer, jedna reakcija obogaćivanja u skupini s 12-pleksnim obogaćivanjem proizvodi skup od 12 postobogaćenih biblioteka.

Prilikom objedinjavanja unaprijed obogaćenih biblioteka, reagensi u kompletu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit podržavaju sljedeće reakcije obogaćivanja i pleksnost.

Reagensi u kompletu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Reakcije obogaćivanja	Pleksnost obogaćivanja
Komplet od 16 uzoraka	16 reakcija	1-pleksni
Komplet od 96 uzoraka	8 reakcija	12-pleksni

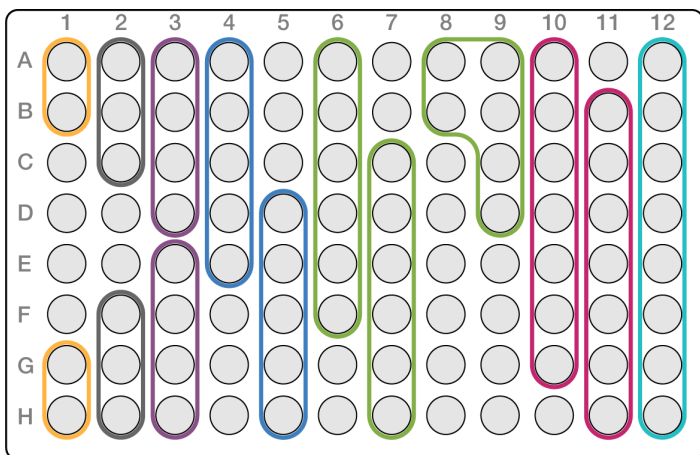
Dvo-pleksne do osam-pleksne strategije grupiranja uzoraka

Sljedeća tablica prikazuje prilagodnike indeksa (jažice) koji se mogu kombinirati u 2-pleksnom do 8-pleksnom skupu, dok slika u boji ilustrira svaku kombinaciju.

Grupirajte bilo koju pleksnost ≥ 2 s vrha ili dna stupca. Nemojte grupirati u nizu.

Pleksnost	Kombinacija	Boja na slici
2	Prve dvije ili posljednje dvije jažice u stupcu: • A i B • G i H Redovi C–F se ne koriste.	Narančasta

Pleksnost	Kombinacija	Boja na slici
3	Prve tri ili posljednje tri jažice u stupcu: - A–C - F–H Redovi D i E se ne koriste.	Siva
4	Prve četiri ili posljednje četiri jažice u stupcu: - A–D - E–H	Ljubičasta
5	Prvih pet ili posljednjih pet jažica u stupcu: - A–E - D–H	Plava
6	[Opcija 1] Prvih šest ili posljednjih šest jažica u stupcu: - A–F - C–H [Opcija 2] Prve dvije jažice (A i B) ili posljednje dvije jažice (G i H) u jednom stupcu i bilo koje četiri jažice u susjednom stupcu.	Zelena
7	Prvih sedam ili posljednjih sedam jažica u stupcu: - A–G - B–H	Ružičasta
8	Cijeli stupac.	Tirkizna



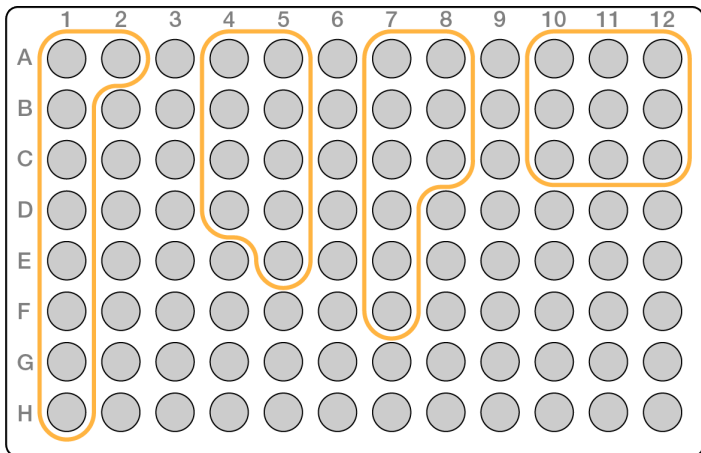
Devet-pleksne strategije grupiranja uzoraka

Upotrijebite prilagodnike indeksa iz bilo kojih jažica koje optimiziraju ravnotežu boja u obradi sekvenciranjem, na primjer:

- A1–H1 i A2
- A4–D4 i A5–E5
- A7–F7 i A8–C8

- A10–C10, A11–C11 i A12–C12

Sljedeća slika prikazuje sva četiri primjera.



Tagmentiraj genomski DNK

Ovaj korak koristi Enrichment BLT Small (eBLTS) za tagmentaciju DNK, što je proces koji fragmentira i označava DNK sekvencama prilagodnika.

Potrošni materijal

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (žuti čep)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Voda bez nukleaze
- PCR pločica s 96 jažica
- Ljepljiva brtva
- Epruveta za mikrocentrifugu, 1,7 ml
- Traka s 8 epruveta
- Vrhovi pipeta
 - Višekanalne pipete od 200 µl



UPOZORENJE

Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu s odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Za dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti, pogledajte Sigurnosno-tehnički list (SDS) na adresi support.illumina.com/sds.html.

O reagensima

- eBLTS mora se čuvati na temperaturama od 2 °C do 8 °C. Nemojte upotrebljavati eBLTS sredstva koja su pohranjena na temperaturi nižoj od 2 °C.
- Nemojte centrifugirati eBLTS.

Priprema

- Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
eBLTS (žuti čep)	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu. Promiješajte u vrtložnoj miješalici neposredno prije upotrebe. Nemojte centrifugirati prije pipetiranja.
TB1	-25 °C do -15 °C	Dovedite na sobnu temperaturu. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.

- Miješajte ili pipetirajte DNK, a zatim kratko centrifugirajte.
- Spremite sljedeći TAG program na PCR termocikler:
 - Odaberite mogućnost prethodnog zagrijavanja poklopca i postavite ga na 100 °C
 - Postavite reakcijski volumen na 50 µl
 - 55 °C tijekom 5 minuta
 - Držite na 10 °C

Postupak

- Dodajte 2 – 30 µl DNK-a u svaku jažicu pločice za PCR s 96 jažica tako da ukupna količina unosa iznosi 50 – 1000 ng.
Ako je volumen DNK-a < 30 µl, dodajte vodu bez nukleaze u uzorke DNK-a kako biste ukupni volumen doveli do 30 µl.
- Temeljito promiješajte eBLTS u vrtložnoj miješalici dok se kuglice potpuno ne resuspendiraju.
- Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti za pripremu glavne mješavine za tagmentaciju. Pomnožite svaki volumen s brojem uzoraka koji se obrađuje.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Prekomjerna količina reagensa uključena je u volumen.

4. Pipetirajte glavnu mješavinu za tagmentaciju kako biste temeljito promiješali.
5. Podijelite volumen glavne mješavine za tagmentaciju jednako u traku s 8 epruveta.
6. Pomoću višekanalne pipete od 200 µl prenesite glavnu mješavinu za tagmentaciju od 20 µl u svaku jažicu pločice za PCR koja sadrži uzorak. Koristite svježe vrhove za svaki stupac ili redak uzorka.
7. Bacite traku s 8 epruveta nakon što je dozirana glavna mješavina za tagmentaciju.
8. Pomoću višekanalne pipete od 200 µl postavljene na 40 µl pipetirajte svaki uzorak 10 puta kako biste ga promiješali. Koristite svježe vrhove za svaki stupac s uzorcima.
Alternativno, zabrtvite PCR pločicu i protresite pri 1600 o/min u trajanju od 1 minute.
9. Zabrtvite pločicu i zatim je postavite na unaprijed programirani termocikler i pokrenite TAG program.
10. Pričekajte dok TAG program ne dosegne temperaturu držanja od 10 °C, a zatim odmah uklonite pločicu.
11. Ostavite pločicu za PCR s 96 jažica da stoji na sobnoj temperaturi 2 minute, a zatim prijedite na sljedeći korak.

Čišćenje nakon tagmentacije

Ovaj korak pere DNK označen prilagodnikom na eBLTS prije PCR amplifikacije.

Potrošni materijal

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- Magnetski stalak PCR ploče s 96 jažica
- Ljepljiva brtva
- Traka s 8 epruveta
- Vrhovi pipeta
 - Višekanalne pipete od 20 µl
 - Višekanalne pipete od 200 µl
- Pripremite se za kasniji postupak:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Pločica prilagodnika indeksa

O reagensima

- Obavezno upotrijebite odgovarajuće magnetsko postolje za svoju pločicu. Korištenje magnetskog stalka MIDI pločice za PCR pločicu može spriječiti prianjanje TWB2 na kuglice.
- Pipetirajte TWB2 polako kako biste smanjili pjenu i izbjegli pogrešnu aspiraciju volumena i nepotpuno miješanje.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
EPM	-25 °C do -15 °C	Odmrzavajte na ledu 1 sat. Preokrenite kako biste promiješali, a zatim nakratko centrifugirajte.
ST2	15 °C do 30 °C	Ako primijetite talog, zagrijavajte na 37 °C 10 minuta, a zatim promiješajte u vrtložnoj miješalici dok se talog ne otopi. Upotrijebite na sobnoj temperaturi.
TWB2	15 °C do 30 °C	Upotrijebite na sobnoj temperaturi.
Pločica prilagodnika indeksa	-25 °C do -15 °C	Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 minuta.

Postupak

1. Dodajte 10 µl ST2 svakoj tagmentacijskoj reakciji. Ako upotrebljavate višekanalnu pipetu, pipetirajte ST2 u traku za 8 epruveta, a zatim prenesite odgovarajuće volumene na pločicu za PCR. Koristite svježe vrhove za svaki stupac ili redak uzorka.
2. Pomoću kompleta pipete od 200 µl na 50 µl polako pipetirajte svaku jažicu 10 puta kako biste ponovno suspendirali kuglice.
Alternativno, zabrtvite pločicu i protresite pri 1600 o/min u trajanju od 1 minute. Ponovite prema potrebi.
3. Zabrtvite pločicu, a zatim centrifugirajte na 280 × g tijekom 10 sekundi.
4. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
5. Stavite na magnetski stalak za PCR pločicu i pričekajte da tekućina postane bistra (3 minute).
6. [**≤ 48 uzoraka**] Operite tri puta na sljedeći način.
 - a. Pomoću višekanalne pipete od 200 µl postavljene na 60 µl uklonite i bacite supernatant bez ometanja taloga kuglica.
 - b. Izvadite iz magnetskog postolja.
 - c. Odmah nakon toga, polako dodajte 100 µl TWB2 izravno na kuglice.
 - d. Pipetirajte polako dok se kuglice potpuno ne resuspendiraju. Alternativno, zabrtvite pločicu i protresite pri 1600 o/min u trajanju od 1 minute.
 - e. Ako dođe do prskanja, centrifugirajte na 280 × g 10 sekundi.
 - f. Stavite na magnetski stalak za PCR pločicu i pričekajte da tekućina postane bistra (3 minute).
Ostavite pločicu na magnetskom stalku i TWB2 u jažicama kako biste spriječili presušivanje prilikom obavljanja trećeg pranja. Uklonite i bacite supernatant nakon pripreme glavne mješavine PCR-a.
 - g. Pomoću višekanalne pipete od 200 µl postavljene na 100 µl, uklonite i bacite supernatant.
 - h. Ponovite korake b–g dva puta za ukupno tri ispiranja.

7. [**> 48 uzoraka**] Operite tri puta na sljedeći način.
- Obavite korake „b” i „c” u koracima od 1 stupca do 2 stupca dok svi stupci ne budu obrađeni kako biste spriječili presušivanje.
 - Pomoću višekanalne pipete od 200 µl postavljene na 60 µl, uklonite i bacite supernatant.
 - Izvadite iz magnetskog postolja.
 - Odmah nakon toga, polako dozirajte 100 µl TWB2 izravno na kuglice.
 - Pipetirajte polako dok se kuglice potpuno ne resuspendiraju. Alternativno, zabrtvite pločicu i protresite pri 1600 o/min u trajanju od 1 minute.
 - Ako dođe do prskanja, centrifugirajte na 280 × g 10 sekundi.
 - Stavite na magnetski stalak za PCR pločicu i pričekajte da tekućina postane bistra (3 minute). Ostavite pločicu na magnetskom stalku i TWB2 u jažicama kako biste spriječili presušivanje prilikom obavljanja trećeg pranja. Uklonite i bacite supernatant nakon pripreme glavne mješavine PCR-a.
 - Pomoću višekanalne pipete od 200 µl postavljene na 100 µl, uklonite i bacite supernatant.
 - Izvadite iz magnetskog stalka i polako dodajte 100 µl TWB2 izravno na kuglice.
 - Ponavljajte korake „h” i „i” u koracima od 1 stupca ili 2 stupca dok svi stupci ne budu obrađeni.
 - Ponovite korake e-h dva puta za ukupno tri ispiranja.
8. Držite na magnetskom stalku do koraka 4 odjeljka *Postupak u Amplificiraj tagmentirani DNK*. Ostaci TWB2 u jažicama kako bi se spriječilo presušivanje kuglica.

Amplificiraj tagmentirani DNK

Ovaj korak pojačava označeni DNK pomoću programa PCR-a ograničenog ciklusa. Korak PCR-a dodaje prilagodnike indeksa 1 (i7), prilagodnike indeksa 2 (i5) i sekvence potrebne za generiranje klastera sekvenciranja.

Potrošni materijal

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Pločica prilagodnika indeksa
- PCR pločica s 96 jažica
- Voda bez nukleaze
- Ljepljiva brtva
- Epruvete za mikrocentrifugu, 1,5 ml
- Vrhovi pipeta
 - Višekanalne pipete od 20 µl
 - Višekanalne pipete od 200 µl

O reagensima

- Pločica prilagodnika indeksa
 - Jažica može sadržavati > 10 µl prilagodnika indeksa.
 - Nemojte dodavati uzorke na pločicu prilagodnika indeksa.
 - Svaka jažica indeksne pločice samo je za jednokratnu uporabu.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
EPM	-25 °C do -15 °C	Odmrzavajte na temperaturi od 4 °C ili na ledu 1 sat. Preokrenite kako biste promiješali, a zatim nakratko centrifugirajte.
Pločica prilagodnika indeksa	-25 °C do -15 °C	Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 minuta.

2. Spremite sljedeći program eBLTS za PCR na termocikler koristeći odgovarajući broj PCR ciklusa naveden u tablici u nastavku.

- Odaberite mogućnost prethodnog zagrijavanja poklopca i postavite ga na 100 °C
- Postavite reakcijski volumen na 50 µl
- 72 °C tijekom 3 minute
- 98 °C tijekom 3 minute
- X ciklusa:
 - 98 °C tijekom 20 sekundi
 - 60 °C tijekom 30 sekundi
 - 72 °C tijekom 1 minute
- 72 °C tijekom 3 minute
- Držite na 10 °C

Ukupno vrijeme rada je oko 38 minuta za 9 ciklusa i oko 46 minuta za 12 ciklusa.

Vrsta unosa uzorka	Broj ciklusa PCR-a (X)
10 – 49 ng gDNK	12
50 – 1000 ng gDNK	9
50 – 1000 ng gDNK-a izdvojenog iz FFPE-a	12
gDNK izdvojen iz krvi	9

Postupak

1. Kombinirajte sljedeće za pripremu glavne mješavine PCR-a. Pomnožite svaki volumen s brojem uzoraka koji se obrađuje.
 - EPM (23 µl)
 - Voda bez nukleaze (23 µl)Prekomjerna količina reagensa uključena je u volumen.
2. Pipetirajte glavnu mješavinu PCR-a 10 puta kako biste je promiješali, a zatim kratko centrifugirajte.
3. Dok je pločica na magnetskom stalku, upotrijebite višekanalnu pipetu od 200 µl za uklanjanje i bacanje u otpad TWB2.

Pjena koja ostaje na zidovima jažica ne utječe negativno na biblioteku.
4. Izvadite iz magnetskog postolja.
5. Odmah dodajte 40 µl glavne mješavine PCR-a izravno na kuglice u svakoj jažici.
6. Odmah pipetirajte radi miješanja dok se kuglice potpuno ne resuspendiraju. Alternativno, zabrtvite pločicu i protresite pri 1600 o/min u trajanju od 1 minute.
7. Zabrtvite pločicu s uzorcima i centrifugirajte na 280 × g tijekom 10 sekundi.
8. Centrifugirajte pločicu prilagodnika indeksa na 1000 × g tijekom 1 minute.
9. Pripremite pločicu prilagodnika indeksa.
 - [< 96 uzoraka] Probušite foliju na pločici prilagodnika indeksa novim vrhom pipete za svaku jažicu samo za broj uzoraka koji se obrađuje.
 - [96 uzoraka] Poravnajte novu pločicu s poluzaštitom za PCR iznad pločice prilagodnika indeksa i pritisnite prema dolje za probijanje folije. Bacite pločicu za PCR koja se koristi za probijanje folije.
10. Pomoću novog vrha pipete dodajte 10 µl unaprijed pripremljenih prilagodnika indeksa u svaku jažicu.
11. Pomoću pipete postavljene na 40 µl pipetirajte 10 puta kako biste promiješali. Alternativno, zabrtvite pločicu i protresite pri 1600 o/min u trajanju od 1 minute.
12. Zabrtvite pločicu, a zatim centrifugirajte na 280 × g 10 sekundi.
13. Stavite na uređaj i pokrenite eBLTS PCR program.

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

Ako prekidate, čuvati na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 30 dana.

Očisti biblioteke

Ovaj korak koristi postupak dvostranog pročišćavanja kuglica za pročišćavanje amplificiranih biblioteka.

Potrošni materijal

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)

- Svježe pripremljen 80-postotni etanol (EtOH)
- 96 jažica 0,8 ml polipropilenska pločica za duboku pohranu (MIDI ploča)
- PCR pločica s 96 jažica
- Magnetski stalak MIDI pločice
- Magnetski stalak za PCR pločicu
- Epruvete za mikrocentrifugu, 1,5 ml
- Voda bez nukleaze

O reagensima

- Cleanup Beads
 - Promiješajte u vrtložnoj miješalici prije svake upotrebe.
 - Često promiješajte u vrtložnoj miješalici kako biste bili sigurni da su kuglice ravnomjerno raspoređene.
 - Aspirirajte i dozirajte polako zbog viskoznosti otopine.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
CB	Sobna temperatura	Miješajte u vrtložnoj miješalici i preokrenite kako bi se promiješalo dok boja tekućine ne postane homogena.
RSB	2 °C do 8 °C	Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 minuta. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.

Postupak

1. Protresite PCR pločicu s 96 jažica pri 1800 o/min 1 minutu, a zatim kratko centrifugirajte.
2. Stavite na magnetski stalak za PCR pločicu i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (1 minutu).
3. Promiješajte u vrtložnoj miješalici CB 3 puta 10 sekundi, a zatim preokrenite više puta kako biste ponovno suspendirali.
4. Za visokokvalitetnu gDNK, učinite kako slijedi.
 - a. Dodajte 77 µl vode bez nukleaze u svaku jažicu nove MIDI pločice.
 - b. Dodajte 88 µl CB u svaku jažicu MIDI pločice.
 - c. Prenesite 45 µl supernatanta iz svake jažice PCR pločice u odgovarajuću jažicu MIDI pločice.
 - d. Bacite PCR pločicu.
 - e. Pipetirajte svaku jažicu 10 puta kako biste je promiješali. Alternativno, zabrtvite pločicu i protresite pri 1800 o/min 1 minutu.
 - f. Zabrtvite pločicu i inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
 - g. Provjerite ima li mjehurića zraka. Ako primijetite, centrifugirajte.

- h. Postavite na magnetsko postolje MIDI pločice i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (5 minuta).
 - i. Tijekom inkubacije temeljito promiješajte CB, a zatim dodajte 20 µl u svaku jažicu *nove* MIDI pločice.
 - j. Prenesite 200 µl supernatanta iz svake jažice prve MIDI pločice u odgovarajuću jažicu nove MIDI pločice (koja sadrži 20 µl CB).
 - k. Bacite prvu MIDI pločicu.
 - l. Pipetirajte svaku jažicu nove MIDI pločice 10 puta kako biste je promiješali. Alternativno, zabrtvite pločicu i protresite pri 1800 o/min 1 minutu.
5. Za izdvajanje FFPE-a, učinite kako slijedi.
 - a. Dodajte 81 µl CB u svaku jažicu nove MIDI pločice.
 - b. Prenesite 45 µl supernatanta iz svake jažice PCR pločice u odgovarajuću jažicu MIDI pločice.
 - c. Bacite PCR pločicu.
 - d. Pipetirajte svaku jažicu 10 puta kako biste promiješali. Alternativno, zabrtvite pločicu i protresite pri 1800 o/min 1 minutu.
 6. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
 7. Provjerite ima li mjehurića zraka. Ako primijetite, centrifugirajte.
 8. Postavite na magnetsko postolje MIDI pločice i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (5 minuta).
 9. Bez ometanja kuglica, uklonite i bacite supernatant.
 10. Operite kuglice na sljedeći način.
 - a. Dok je pločica na magnetskom stalku, dodajte 200 µl svježeg 80-postotnog EtOH bez miješanja.
 - b. Inkubirajte 30 sekundi.
 - c. Bez ometanja kuglica, uklonite i bacite supernatant.
 11. Operite kuglice **drugi** put.
 12. Sušiti na zraku na magnetskom stalku 5 minuta.
 13. Tijekom sušenja na zraku, upotrijebite pipetu od 20 µl kako biste uklonili i bacili preostali EtOH.
 14. Izvadite iz magnetskog postolja.
 15. Dodajte 17 µl RSB-a u kuglice.
 16. Zabrtvite pločicu i protresite pri 1800 o/min 2 minute.
 17. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 2 minute.
 18. Provjerite ima li mjehurića zraka. Ako primijetite, centrifugirajte.
 19. Postavite na magnetsko postolje MIDI pločice i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (2 minute).
 20. Prenesite 15 µl supernatanta na novu PCR pločicu s 96 jažica.

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja, zabrtvite pločicu i pohranite je na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 30 dana.

Grupiraj unaprijed obogaćene biblioteke

Ovaj korak kombinira biblioteke DNK-a s jedinstvenim indeksima u jednu skupinu od do 12 biblioteka.

Metode grupiranja uzoraka

Možete grupirati prema volumenu ili masi. Pomoću sljedeće tablice odredite odgovarajuću metodu za unos.

Tablica 2 Preporučene metode grupiranja uzoraka

Unos uzorka	Metoda grupiranja uzoraka
10 – 49 ng gDNK	Masa
50 – 1000 ng gDNK	Volumen
gDNK izdvojen iz FFPE-a	Masa
gDNK izdvojen iz krvi	Volumen

- Jednopleksno obogaćivanje ne zahtijeva grupiranje unaprijed obogaćenih biblioteka. Međutim, može biti potrebno dodavanje RSB-a.
- Nakon kvantifikacije unaprijed obogaćene biblioteke, sve vrste unosa uzoraka mogu se grupirati prema masi kako bi se postigla optimalna ravnoteža indeksa.
- Konačni prinos unaprijed obogaćenih knjižnica generiranih u odvojenim eksperimentalnim pripravcima može varirati. Stoga se preporučuje grupiranje prema masi kako bi se postigla optimalna ravnoteža indeksa.
- Koristite 1-pleksno obogaćivanje u sljedećim situacijama.
 - 10 – 49 ng gDNK
 - 50 – 1000 ng gDNK-a izdvojenog iz FFPE-a
 - Otkrivanje niske manje učestalosti alela za prepoznavanje somatskih varijanti.

Grupiraj po masi

U sljedećim situacijama, kvantificirajte svoje biblioteke za upotrebu mase DNK-a po biblioteci za obogaćivanje navedeno u [Grupiraj unaprijed obogaćene biblioteke pri jednakoj koncentraciji na stranici 34](#).

- Unos uzorka od 10 – 49 ng gDNK
- 50 – 1000 ng gDNK izdvojen iz FFPE unosa uzorka
- Otkrivanje niske manje učestalosti alela za prepoznavanje somatskih varijanti
- gDNK izdvojen iz krvi za optimalnu ravnotežu indeksa

Kvantificirajte unaprijed obogaćene biblioteke

1. Pokrenite 1 µl unaprijed obogaćenih biblioteka pomoću željene metode kvantifikacije na bazi fluorescencije koja koristi interkalacijsku boju dsDNK.
 - Za visokokvalitetnu gDNK od 50 – 1000 ng, očekujte prinos unaprijed obogaćene biblioteke od ≥ 500 ng.
 - Za gDNK od 50 – 1000 ng, izdvojen iz FFPE-a, očekujte unaprijed obogaćeni prinos biblioteke od 500 – 6000 ng, ovisno o kvaliteti početnog uzorka.

NAPOMENA Za kvantifikacijske metode s različitim odstupanjima kvalificirajte kvantifikacijsku metodu za ovaj tijek rada. Rezultati koncentracije mogu se razlikovati ovisno o korištenoj metodi.

Grupiraj unaprijed obogaćene biblioteke pri jednakoj koncentraciji

Koristite sljedeću tablicu za određivanje mase DNK-a po biblioteci potrebne za obogaćivanje, u skladu s vrstom uzorka i pleksnošću obogaćivanja. Optimalni prinos obogaćivanja i učinkovitost analize nisu zajamčeni pri upotrebi nižih unaprijed obogaćenih prinosa biblioteke od preporučenih.

Ukupna masa DNK-a u reakciji obogaćivanja ne smije prelaziti 6000 ng.

Unos uzorka	Pleksnost obogaćivanja	Masa DNK-a po biblioteci (ng)	Ukupna masa DNK-a biblioteke (ng)
Visokokvalitetna gDNK	12	250 – 500	3000 – 6000
gDNK izdvojen iz FFPE-a	1	200	200

1. Zabilježite indekse za biblioteke koje planirate grupirati u ovom koraku.
2. Na temelju koncentracije svake biblioteke, izračunajte volumen koji se mora dodati reakciji obogaćivanja kako bi se postigla potrebna masa DNK-a.
 - Visokokvalitetna gDNK: Izračunajte volumen biblioteke potrebne za unos od 250 – 500 ng.
 - gDNK izdvojen iz FFPE-a: Izračunajte volumen biblioteke potrebne za unos od 200 ng.
3. Dodajte izračunati volumen za svaku biblioteku u isti otvor na PCR pločici.
4. Ako koristite visokokvalitetnu gDNK, provedite jedno od sljedećeg na temelju ukupnog volumena grupiranih unaprijed obogaćenih biblioteka:
 - Ako je volumen unaprijed obogaćene biblioteke = 30 µl, nastavite na [Hibridiziraj sonde na stranici 36](#).
 - Ako je volumen unaprijed obogaćene biblioteke < 30 µl, dodajte RSB kako biste postigli ukupni volumen od 30 µl.
 - Ako je volumen unaprijed obogaćene biblioteke > 30 µl, upotrijebite metodu na bazi kuglica ili vakuumski koncentrator za koncentriranje grupiranog uzorka. Dodajte RSB koncentriranom grupiranom uzorku da biste postigli ukupni volumen od 30 µl.

5. Ako koristite gDNK izdvojen iz FFPE-a, provedite jedno od sljedećeg na temelju ukupnog volumena grupiranih unaprijed obogaćenih biblioteka.
- Ako je volumen unaprijed obogaćene biblioteke = 7,5 µl, nastavite na [Hibridiziraj sonde na stranici 36](#).
 - Ako je volumen unaprijed obogaćene biblioteke < 7,5 µl, dodajte RSB kako biste postigli ukupni volumen od 7,5 µl.

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja, zabrtvite pločicu i pohranite je na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 30 dana.

Grupiraj po volumenu

Kada je unos 50 – 1000 ng gDNK, nije potrebno kvantificirati i normalizirati pojedinačne biblioteke generirane u istom eksperimentu.

Za postizanje optimalne učinkovitosti, grupirajte samo uzorke unaprijed obogaćenih biblioteka koje je pripremio isti korisnik, serija reagensa i pločica prilagodnika indeksa.

- Zabilježite indekse za biblioteke koje planirate grupirati u ovom koraku.
- Kombinirajte sljedeću unaprijed obogaćenu biblioteku i volumene RSB-a za vašu pleksnost obogaćivanja u istoj jažici nove PCR pločice.

Rezultirajući volumen je 30 µl.

Pleksnost obogaćivanja*	Volumen svake unaprijed obogaćene biblioteke (µl)	RSB volumen (µl)
1-pleksni	14	16
2-pleksni	14	2
3-pleksni	10	0
4-pleksni	7,5	0
5-pleksni	6	0
6-pleksni	5	0
7-pleksni	4,2	0,6
8-pleksni	3,7	0,4
9-pleksni	3,3	0,3
10-pleksni	3	0
11-pleksni	2,7	0,3
12-pleksni	2,5	0

* Za informacije o nestandardnim pleksitetima (2-pleksni do 11-pleksni), pogledajte [Ograničenja postupka na stranici 2](#).

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja, zabrtvite pločicu i pohranite je na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 30 dana.

[Opcionalno] Kvalificirajte unaprijed obogaćene biblioteke

Ako se grupira po volumenu, za kvantificiranje unaprijed obogaćenih biblioteka koristite metodu temeljenu na fluorometriji koja koristi interkalacijsku boju dsDNA. Kako biste kvalificirali unaprijed obogaćene biblioteke, upotrijebite analizator fragmenata DNK-a s odgovarajućim kompletom za analizu fragmenata.

Upotrijebite ukupno 1 µl za kvalifikaciju biblioteke. Unaprijed obogaćene biblioteke dovoljno su koncentrirane da omogućuju mala razrjeđivanja za kvantifikaciju ili analizu fragmenata.

Hibridiziraj sonde

Ovaj korak veže ciljano područje DNK-a sa sondama za hvatanje.

Reagensi u kompletu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit su kompatibilni s oligonukleotidnim panelima DNK-a za obogaćivanje tvrtke Illumina i trećih strana. Za informacije o potrebnim specifikacijama za panele treće strane, pogledajte [Zahtjevi panela sonde za obogaćivanje na stranici 10](#).

Potrošni materijal

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT blokatori) (plavi poklopac)
- Panel sonde za obogaćivanje
- PCR pločica s 96 jažica
- Ljepljiva brtva
- Pripremite se za kasniji postupak:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (jantarni poklopac)

O reagensima

- NHB2 se taloži i odvaja tijekom skladištenja.
- Panel sonde za obogaćivanje odnosi se na odabrani oligonukleotidni panel obogaćenja od Illumina dobavljača.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
EHB2	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu. Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Ako primijetite kristale i zamućenost, ponovite vrtložno miješanje ili pipetirajte gore i dolje kako biste promiješali dok otopina ne postane bistra.
Panel sonde za obogaćivanje	-25 °C do -15 °C (Illumina)	Za panele Illumina i za panele treće strane dovedite na sobnu temperaturu. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.
NHB2 (plavi poklopac)	-25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Kada je na sobnoj temperaturi, prethodno zagrijte inkubator mikrouzoraka na istu temperaturu kao i sonda koju koristite 5 minuta. Miješajte u vrtložnoj miješalici maksimalnom 3 puta po 10 sekundi kako biste ponovno suspendirali. Kratko centrifugirajte. Pipetirajte gore i dolje s dna epruvete. Ako primijetite kristale i zamućenost, ponovite vrtložno miješanje ili pipetirajte gore i dolje kako biste promiješali dok otopina ne postane bistra. Koristite dok je toplo kako biste izbjegli ponovno stvaranje taloga.
SMB3*	2 °C do 8 °C	Ako prelazite na sljedeći postupak odmah nakon 90-minutnog zadržavanja u HYB programu, dovedite na sobnu temperaturu najmanje 2 sata prije početka HYB programa.
EEW* (jantarna epruveta)	-25 °C do -15 °C	Ako prelazite na sljedeći postupak odmah nakon 90-minutnog zadržavanja u HYB programu, dovedite na sobnu temperaturu najmanje 2 sata prije početka HYB programa. Kada je na sobnoj temperaturi, prethodno zagrijte inkubator s mikrouzorkom na primjenjivu temperaturu za hibridizaciju i hvatanje 30 minuta prije završetka HYB programa.

*Ako se zaustavljate prije sljedećeg postupka, odgodite pripremu ovog reagensa dok ne dođete do tog postupka.

2. Spremite sljedeći HYB program na termocikler koristeći odgovarajući broj ciklusa koji su navedeni u [Tablica 3](#).

- Odaberite mogućnost prethodnog zagrijavanja poklopca i postavite ga na 100 °C
- Postavite reakcijski volumen
 - [Visokokvalitetna gDNK] 100 µl
 - [gDNK izdvojen iz FFPE-a] 25 µl
- 98 °C tijekom 5 minuta
- X ciklusa od po 1 minute svaki, počevši od 98 °C tijekom prvog ciklusa, a zatim smanjujući 2 °C po ciklusu
- Držite 90 minuta na odgovarajućoj temperaturi:
 - [gDNK izdvojen iz FFPE-a] 58 °C
 - [80-merni paneli sonde] 58 °C
 - [Otkrivanje somatskih varijanti] 58 °C
 - [Sve ostalo] 62 °C

Ukupno vrijeme rada je oko 115 minuta.

Tablica 3 Broj ciklusa po uzorku ili panelu

Vrsta uzorka i panela	Broj ciklusa (X)
gDNK izdvojen iz FFPE-a (bez obzira na vrstu panela)	20
80-merni paneli sonde (bez obzira na vrstu uzorka)	20
Otkrivanje somatskih varijanti	20
Svi ostali uzorci i paneli	18

Postupak

1. **[Visokokvalitetna gDNK]** Dodajte sljedeće reagense *redoslijedom navedenim* u svaku skupnu biblioteku na pločici za PCR.
Nemojte stvarati glavnu mješavinu. Stvaranje glavne mješavine NHB2 i EHB2 negativno utječe na performanse obogaćivanja.
 - NHB2 (plavi poklopac) (50 µl)
 - Panel sonde za obogaćivanje (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. **[Visokokvalitetna gDNK]** Pomoću pipete postavljene na 90 µl pipetirajte svaku jažicu 10 puta kako biste promiješali.
3. **[gDNK izdvojen iz FFPE-a]** Dodajte sljedeće reagense *redoslijedom navedenim* u svaku skupnu biblioteku na pločici za PCR.

Nemojte stvarati glavnu mješavinu. Stvaranje glavne mješavine NHB2 i EHB2 negativno utječe na performanse obogaćivanja.

- NHB2 (plavi poklopac) (12,5 µl)
 - Panel sonde za obogaćivanje (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[gDNK izdvojen iz FFPE-a]** Pomoću pipete postavljene na 20 µl, pipetirajte svaku jažicu 10 puta kako biste promiješali.
 5. Zabrtvite pločicu i centrifugirajte na 280 × g 10 sekundi.
 6. Postavite pločicu s uzorkom na unaprijed programirani termocikler i pokrenite program HYB.
 7. Odmah priđite na sljedeći postupak kada završi HYB program vrijeme zadržavanja temperature.



OPREZ

Taloženje nastaje ako temperatura hibridizacijske reakcije padne ispod sobne temperature.

Uhvati hibridizirane sonde

Ovaj korak koristi Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) za hvatanje sonde hibridiziranih na ciljanim područjima interesa.

Potrošni materijal

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (jantarni poklopac)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- Epruveta za mikrocentrifugu od 1,5 ml
- MIDI pločica s 96 jažica
- PCR pločica s 96 jažica
- Ljepljiva brtva
- Magnetski stalak MIDI pločice
- Pripremite se za kasniji postupak:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

O reagensima

- EEW

- Pobrinite se da se EEW odmrznuo na sobnoj temperaturi najmanje 2 sata prije prethodnog zagrijavanja inkubatora s mikrouzorcima.
- Pobrinite se da se EEW zagrijava u inkubatoru s mikrouzorcima 30 minuta prije završetka HYB programa.
- Ostavite EEW u inkubatoru s mikrouzorcima kada se ne koristi. EEW treba ostati zagrijan tijekom protokola.
- Može biti zamućen nakon postizanja sobne temperature.
- Može izgledati žuto.
- SMB3
 - SMB3 mora biti na sobnoj temperaturi prije upotrebe.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
SMB3	2 °C do 8 °C	Neka stoji 2 sata da poprimi sobnu temperaturu. Okrenite, a zatim miješajte u vrtložnoj miješalici dok se potpuno ne resuspendira.
EEW (jantarna epruveta)	-25 °C do -15 °C	Nakon 2-satne inkubacije na sobnoj temperaturi, unaprijed zagrijte inkubator s mikrouzorkom na primjenjivu temperaturu za hibridizaciju i hvatanje 30 minuta prije završetka HYB programa.
EE1	-25 °C do -15 °C	Odmrzavajte na sobnoj temperaturi, a zatim promiješajte u vrtložnoj miješalici.
HP3	-25 °C do -15 °C	Odmrzavajte na sobnoj temperaturi, a zatim promiješajte u vrtložnoj miješalici.
ET2	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.
EPM	-25 °C do -15 °C	Odmrzavajte na ledu jedan sat. Preokrenite kako biste promiješali, a zatim nakratko centrifugirajte. Spustite na led.
PPC	-25 °C do -15 °C	Odmrzavajte na ledu jedan sat. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte. Spustite na led.

2. Zagrijte jedan inkubator s mikrouzorkom s umetkom toplinskog bloka MIDI kako biste inkubirali pločicu s uzorcima na jednu od sljedećih temperatura. Za predgrijavanje može se upotrijebiti opcionalni drugi inkubator s mikrouzorkom EEW. Stavite EEW na vrh umetka toplinskog bloka MIDI.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-merni paneli sondi] 58 °C
 - [Otkrivanje somatskih varijanti] 58 °C
 - [Sve ostalo] 62 °C

Postupak

Hvatanje

1. Dodajte SMB3 u odgovarajuću jažicu na novoj MIDI ploči kako slijedi.
 - **[Visokokvalitetna gDNK]** Dodajte 250 µl SMB3.
 - **[gDNK izdvojena iz FFPE-a]** Dodajte 62,5 µl SMB3.
2. Pomoću pipete postavljene na 100 µl za visokokvalitetni gDNK ili 25 µl za FFPE, prenesite svaku skupnu biblioteku iz PCR pločice s 96 jažica u odgovarajuću jažicu nove MIDI pločice.
3. Zabrtvite pločicu i protresite pri 1200 o/min 4 minute.
4. Ako dođe do prskanja, nakratko centrifugirajte pločicu.
5. Stavite pločicu za skupne biblioteke na umetak toplinskog bloka MIDI na inkubator s mikrouzorkom, ispod EEW epruvete, zatvorite poklopac, a zatim inkubirajte 15 minuta na odgovarajućoj temperaturi:
 - **[FFPE]** 58 °C
 - **[80-merni panel sondi]** 58 °C
 - **[Otkrivanje somatskih varijanti]** 58 °C
 - **[Sve ostalo]** 62 °C
6. Uklonite pločicu skupnih biblioteka i centrifugirajte na 280 × g 30 sekundi.
7. Odmah stavite na magnetsko postolje MIDI pločice i pričekajte da tekućina postane bistra (2 minute).
8. **[Visokokvalitetna gDNK]** Pomoću pipete postavljene na 200 µl, uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice bez ometanja taloga kuglica.
9. **[gDNK izdvojena iz FFPE-a]** Pomoću pipete postavljene na 90 µl, uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice bez ometanja taloga kuglica.
10. Uklonite i bacite sav preostali supernatant.

Pranje

1. Izvadite iz magnetskog postolja.
2. **[Visokokvalitetna gDNK]** Brzo izvadite EEW iz inkubatora s mikrouzorkom i dodajte 200 µl u svaku jažicu.
3. **[gDNK izdvojena iz FFPE-a]** Brzo izvadite EEW iz inkubatora s mikrouzorkom i dodajte 50 µl u svaku jažicu.
4. Vratite neiskorišten EEW u inkubator s mikrouzorcima i održavajte zagrijavanje.
5. Zabrtvite pločicu i protresite pri 1800 o/min 4 minute.
6. Stavite pločicu s uzorcima na umetak MIDI toplinskog bloka u inkubator s mikrouzorkom, ispod EEW epruvete, zatvorite poklopac i zatim inkubirajte 5 minuta na odgovarajućoj temperaturi:
 - **[FFPE]** 58 °C
 - **[80-merni paneli sondi]** 58 °C
 - **[Otkrivanje somatskih varijanti]** 58 °C

- [Svi ostali paneli] 62 °C
7. Odmah stavite na magnetsko postolje MIDI pločice i pričekajte da tekućina postane bistra (2 minute).
 8. Pomoću pipete postavljene na 200 µl za visokokvalitetnu gDNK ili 50 µl za FFPE, uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.
 9. Ponovite korake 1-8 dva puta za ukupno tri ispiranja.

Pranje prijenosa

1. Izvadite iz magnetskog postolja.
2. **[Visokokvalitetna gDNK]** Brzo izvadite EEW iz inkubatora s mikrouzorkom i dodajte 200 µl u svaku jažicu.
3. **[gDNK izdvojena iz FFPE-a]** Brzo izvadite EEW iz inkubatora s mikrouzorkom i dodajte 50 µl u svaku jažicu.
4. Zabrtvite pločicu i protresite pri 1800 o/min 4 minute. Ako dođe do prskanja, smanjite brzinu na 1600 o/min.
5. Prenesite resuspendiranu otopinu kuglica na novu MIDI pločicu.
Nešto uzorka može ostati u jažicama.



OPREZ

Prijenos reagensa smanjuje prijenos rezidualnih reagensa koji mogu inhibirati PCR u daljnjem postupku.

6. Stavite pločicu s uzorcima na umetak MIDI toplinskog bloka na inkubator s mikrouzorakima, zatvorite poklopac i zatim inkubirajte 5 minuta na odgovarajućoj temperaturi:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-merni paneli sondi] 58 °C
 - [Otkrivanje somatskih varijanti] 58 °C
 - [Sve ostalo] 62 °C
7. Odmah stavite na magnetsko postolje MIDI pločice i pričekajte da tekućina postane bistra (2 minute).
8. Pomoću pipete postavljene na 200 µl za visokokvalitetnu gDNK ili 50 µl za FFPE, uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.
9. Centrifugirajte pločicu na 280 × g 30 sekundi.
10. Stavite na magnetsko postolje MIDI ploče 10 sekundi.
11. Pomoću pipete od 20 µl uklonite i bacite preostalu tekućinu iz svake jažice.
12. Odmah prijedite na [Eluiranje na stranici 42](#) kako biste spriječili prekomjerno sušenje kuglica i gubitak prinosa biblioteke.

Eluiranje

1. Kombinirajte sljedeće volumene za pripremu glavne mješavine za eluiranje. Pomnožite svaki volumen s brojem uzoraka skupnih biblioteka koji se obrađuje.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Prekomjerna dodatna količina reagensa uključena je u volumen.
2. Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
3. Uklonite MIDI pločicu s magnetskog stalka.
4. Dodajte glavnu mješavinu za eluiranje od 23 µl u svaku jažicu.
5. Zabrtvite pločicu i protresite pri 1800 o/min 2 minute.
6. Inkubirajte pločicu na sobnoj temperaturi 2 minute.
7. Centrifugirajte na 280 x g 30 sekundi.
8. Odmah stavite na magnetsko postolje MIDI pločice i pričekajte da tekućina postane bistra (2 minute).
9. Prenesite 21 µl supernatanta s MIDI pločice u odgovarajuću jažicu nove PCR pločice s 96 jažica.
10. Bacite MIDI pločicu.
11. Dodajte 4 µl ET2 svakoj jažici koja sadrži 21 µl supernatanta.
12. Postavite pipetu na 20 µl i polako pipetirajte svaku jažicu 10 puta kako biste promiješali.
13. Zabrtvite pločicu, a zatim centrifugirajte na 280 x g 10 sekundi.
14. Inkubirajte pločicu na sobnoj temperaturi 1 minutu.

Amplificiraj obogaćenu biblioteku

Ovaj korak koristi PCR za amplifikaciju obogaćene biblioteke.

Potrošni materijal

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Ljepljiva brtva

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
EPM	-25 °C do -15 °C	Odmrzavajte na temperaturi od 4 °C ili na ledu jedan sat. Preokrenite kako biste promiješali, a zatim nakratko centrifugirajte. Spustite na led.
PPC	-25 °C do -15 °C	Odmrzavajte na temperaturi od 4 °C na ledu jedan sat. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte. Spustite na led.

2. Spremite sljedeći AMP program na termocikler koristeći odgovarajući broj PCR ciklusa koji su navedeni u sljedećoj tablici.

- Odaberite mogućnost prethodnog zagrijavanja poklopca i postavite ga na 100 °C
- Postavite reakcijski volumen na 50 µl
- 98 °C tijekom 45 sekundi
- (X) ciklusa:
 - 98 °C tijekom 30 sekundi
 - 60 °C tijekom 30 sekundi
 - 72 °C tijekom 30 sekundi
- 72 °C tijekom 5 minuta
- Držite na 10 °C

Ukupno vrijeme rada je oko 35 minuta.

Vrsta uzorka i panela	(X) Ciklusi
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) za visokokvalitetnu gDNK	10
Illumina Exome Panel (CEX) za FFPE	12
Svi ostali uzorci i paneli	12 ¹²³⁴

¹ Može se prilagoditi do 15 ciklusa za male panele treće strane putem naknadne optimizacije. Ako se upotrebljava FFPE, broj ciklusa može se prilagoditi do 17.

² Može se prilagoditi do 17 ciklusa za panele trećih strana koji imaju samo 500 sonidi. Ako se upotrebljava FFPE, broj ciklusa može se prilagoditi do 19.

³ Može se prilagoditi do 14 ciklusa za FFPE uzorke.

⁴ Povećanje broja ciklusa PCR-a može rezultirati većom stopom dupliciranja i manjim veličinama fragmenata za FFPE uzorke.

Postupak

1. Dodajte 5 µl PPC u svaku jažicu.
2. Dodajte 20 µl EPM u svaku jažicu.
3. Zabrtvite pločicu i protresite pri 1200 o/min 1 minutu.
4. Centrifugirajte pločicu na 280 × g 10 sekundi.
5. Postavite pločicu s uzorkom na unaprijed programirani termocikler i pokrenite program AMP.

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

Ako prekidate, čuvati na temperaturi od 2 °C do 8 °C do dva dana. Alternativno, ostavite na termocikleru do 24 sata.

Očisti amplificiranu obogaćenu biblioteku

Ovaj korak koristi Cleanup Beads za pročišćavanje obogaćene biblioteke i uklanjanje neželjenih proizvoda.

Potrošni materijal

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Svježe pripremljen 80-postotni etanol (EtOH)
- Ljepljive brtve
- MIDI pločica s 96 jažica
- PCR pločica s 96 jažica
- Magnetski stalak MIDI pločice

O reagensima

- Cleanup Beads
 - Promiješajte u vrtložnoj miješalici prije svake upotrebe.
 - Često promiješajte u vrtložnoj miješalici kako biste bili sigurni da su kuglice ravnomjerno raspoređene.
 - Aspirirajte i dozirajte polako zbog viskoznosti otopine.

Priprema

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
CB	Sobna temperatura	Miješajte u vrtložnoj miješalici i preokrenite kako bi se promiješalo dok boja tekućine ne postane homogena.

Stavka	Skladištenje	Upute
RSB	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.

2. Pripremite svježi 80-postotni EtOH iz apsolutnog etanola.

Postupak

1. Centrifugirajte PCR pločicu na 280 x g 10 sekundi.
2. Miješajte u vrtložnoj miješalici CB 3 puta 10 sekundi, a zatim preokrenite.
3. Dodajte 40,5 µl CB u svaku jažicu nove **MIDI** pločice.
4. Prenesite 45 µl iz svake jažice PCR pločice u odgovarajuću jažicu MIDI pločice.
5. Zabrtvite pločicu i protresite pri 1800 o/min 1 minutu.
6. Inkubirajte MIDI pločicu na sobnoj temperaturi 5 minuta.
7. Centrifugirajte na 280 x g 10 sekundi.
8. Stavite na magnetsko postolje MIDI pločice i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (5 minuta).
9. Pomoću pipete postavljene na 95 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.
10. Operite dva puta na sljedeći način.
 - a. Dok je pločica na magnetskom stalku, dodajte 200 µl svježeg 80-postotnog EtOH bez miješanja.
 - b. Inkubirajte 30 sekundi.
 - c. Bez ometanja kuglica, uklonite i bacite supernatant.
11. Sušiti na zraku na magnetskom stalku 5 minuta.
12. Tijekom sušenja na zraku, upotrijebite pipetu od 20 µl kako biste uklonili i bacili preostali EtOH iz svake jažice.
13. Izvadite iz magnetskog stalka i dodajte 32 µl RSB svakoj jažici.
14. Zabrtvite pločicu i protresite pri 1800 o/min 1 minutu.
15. Inkubirajte pločicu na sobnoj temperaturi 5 minuta.
16. Centrifugirajte na 280 x g 10 sekundi.
17. Stavite na magnetsko postolje MIDI pločice i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (2 minute).
18. Prenesite 30 µl supernatanta s MIDI pločice od 96 jažica u odgovarajuću jažicu nove PCR pločice.
19. Bacite MIDI pločicu.

TOČKA SIGURNOSTI PREKIDANJA

U slučaju prekidanja, zabrtvite pločicu i pohranite je na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 7 dana.

Provjerite obogaćene biblioteke

Za kvantifikaciju unosa dvolančane gDNK upotrijebite metodu temeljenu na fluorescenciji koja koristi interkalacijsku boju. Izbjegavajte metode kojima se mjeri ukupna nukleinska kiselina, kao što je NanoDrop ili druge metode UV apsorbancije.

1. Pokrenite 1 µl obogaćenih biblioteka koristeći svoju metodu kvantifikacije.

NAPOMENA Ukupna molarnost sonde proporcionalno utječe na prinos biblioteke nakon obogaćivanja.

Očekujte srednju veličinu umetka od 125 – 235 bp i raspodjelu fragmenata biblioteke s veličinom u rasponu od oko 200 bp do oko 1000 bp.

Razrijedi biblioteke na početnu koncentraciju

Ovaj korak razrjeđuje biblioteke na početnu koncentraciju za sustav za sekvenciranje i prvi je korak u serijskom razrjeđivanju. Nakon razrjeđivanja na početnu koncentraciju, biblioteke su spremne za denaturiranje i razrjeđivanje do konačne koncentracije za umetanje.

Za sekvenciranje, bez obzira na panel sonde za obogaćivanje koji koristite, Illumina preporučuje postavljanje obrade s uparenim krajevima sa 151 ciklusom po očitavanju (2 × 151) i 10 ciklusa po indeksnom očitavanju. Ako želite manje preklapanja očitavanja ili manje neobrađene pokrivenosti, možete sekvencu smanjiti na 2 × 126 ili 2 × 101.

1. Izračunajte vrijednost molarnosti biblioteke ili skupnih biblioteka pomoću sljedeće formule.

- Za biblioteke kvalificirane na analizatoru fragmenata DNK, koristite prosječnu veličinu dobivenu za biblioteku.
- Za sve ostale metode kvalifikacije, koristite 350 bp kao prosječnu veličinu biblioteke.

$$\frac{\text{ng} / \mu\text{l} \times 10^6}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{prosječna veličina biblioteke (bp)}} = \text{Molarnost (nM)}$$

Na primjer, ako je koncentracija vaše biblioteke 20 ng/μl, a prosječna veličina 350 bp, rezultirajuća vrijednost molarnosti je 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. Koristeći vrijednost molarnosti, izračunajte volumene RSB i biblioteke potrebne za razrjeđivanje biblioteka na početnu koncentraciju za vaš sustav.

Sustav za sekvenciranje	Minimalni potreban volumen biblioteke (μl)	Početna koncentracija (nM)	Konačna koncentracija za umetanje (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) ili 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM početna je koncentracija za konačnu koncentraciju za umetanje od 350 pM. Ako je potrebno, prilagodite konačne koncentracije za umetanje pomoću sljedeće tablice.

Konačna koncentracija za umetanje (pM)	Koncentracija skupne biblioteke (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50

Konačna koncentracija za umetanje (pM)	Koncentracija skupne biblioteke (nM)
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Razrijedite biblioteke pomoću RSB-a:

- **Biblioteke kvantificirane kao višestruki skup biblioteka** – razrijedite skup do početne koncentracije za vaš sustav.
- **Biblioteke kvantificirane pojedinačno** – razrijedite svaku biblioteku do početne koncentracije za vaš sustav. Dodajte 10 µl svake razrijeđene biblioteke u epruvetu kako biste stvorili višestruki skup biblioteka.

4. Slijedite upute za denaturiranje i razrjeđivanje za sustav kako biste razrijedili do konačne koncentracije za umetanje.

- Za sustav NextSeq 550Dx pogledajte [Priprema sekvenciranja na sustavu NextSeq 550Dx na stranici 49](#).
- Za sustav MiSeqDx pogledajte [Priprema sekvenciranja na sustavu MiSeqDx na stranici 51](#).
- Za sustav NovaSeq 6000Dx pogledajte [Priprema sekvenciranja na sustavu NovaSeq 6000Dx na stranici 52](#).

Konačne koncentracije za umetanje početna su točka i opće smjernice. Optimizirajte koncentracije za svoj tijek rada i metodu kvantifikacije tijekom naknadnih obrada sekvenciranjem ili titracijom protočne stanice.

Priprema sekvenciranja na sustavu NextSeq 550Dx

Za denaturiranje i razrjeđivanje biblioteka upotrijebite sljedeće upute za sekvenciranje na sustavu za sekvenciranje NextSeq 550Dx.

Potrošni materijal

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

Priprema

Pripremite *svježu* otopinu od 0,2 N NaOH za denaturiranje biblioteka za sekvenciranje. Dodatni volumen je pripremljen kako bi se spriječilo da male pogreške pipetiranja utječu na konačnu koncentraciju NaOH.

**OPREZ**

Svježe razrijeđen 0,2 N NaOH bitan je za proces denaturacije. Nepravilna denaturacija može smanjiti prinos.

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
HT1	-25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Čuvajte na temperaturi od 2 °C do 8 °C dok ne budete spremni za razrjeđivanje denaturiranih biblioteka.

2. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugu za pripremu svježeg razrjeđivanja NaOH:

- Voda laboratorijske kvalitete (800 µl)
- 1 N NaOH (200 µl)

Rezultat je 1 ml 0,2 N NaOH.

3. Promiješajte epruvetu tako da je nekoliko puta preokrenete.

4. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti s mikrocentrifugom za pripremu 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

- Voda laboratorijske kvalitete (800 µl)
- 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

Rezultat je 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

NAPOMENA Držite epruvetu začepljenom. Upotrijebite svježu otopinu u roku od **12 sati**.

Denaturiraj biblioteku

1. Kombinirajte sljedeće volumene biblioteka i svježe razrijeđenog 0,2 N NaOH u epruveti za mikrocentrifugu.

- Biblioteka 10 µl
- 10 µl 0,2 N NaOH

2. Nakratko promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim centrifugirajte na 280 × g tijekom 1 minute.

3. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.

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

Razrijedi denaturirane biblioteku na 20 pM

1. Dodajte 970 µl unaprijed ohlađenog HT1 u epruvetu denaturiranih biblioteka.

Rezultat je denaturirana biblioteka od 20 pM.

2. Nakratko promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim centrifugirajte na 280 × g tijekom 1 minute.

3. Stavite biblioteku od 20 pM na led dok ne budete spremni za konačno razrjeđivanje.

Razrijedi biblioteke na koncentraciju umetanja

1. Dodajte sljedeće volumene kako biste razrijedili denaturiranu otopinu biblioteke od 20 pM u omjeru 1,2 pM.
 - Denaturirana otopina biblioteke (78 µl)
 - Prethodno rashlađen HT1 (1222 µl)Ukupni volumen je 1,3 ml pri 1,2 pM.
2. Okrenite kako biste pomiješali, a zatim impulsirajte centrifugu.
3. Prijeđite na sekvenciranje. Upute potražite u Referentnom vodiču za instrument *NextSeq 550Dx* (broj dokumenta 1000000009513) i Vodiču za tijek rada za *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx* za *NextSeq 550Dx* (broj dokumenta 200025238).

Priprema sekvenciranja na sustavu MiSeqDx

Za denaturiranje i razrjeđivanje biblioteka upotrijebite sljedeće upute za sekvenciranje na sustavu za sekvenciranje MiSeqDx.

Potrošni materijal

- HT1 (Pufer za hibridizaciju)
- 1 N NaOH

Priprema

Pripremite *svježu* otopinu od 0,2 N NaOH za denaturiranje biblioteka za sekvenciranje. Dodatni volumen je pripremljen kako bi se spriječilo da male pogreške pipetiranja utječu na konačnu koncentraciju NaOH.



OPREZ

Svježe razrijeđen 0,2 N NaOH bitan je za proces denaturacije. Nepravilna denaturacija može smanjiti prinos.

1. Pripremite sljedeći potrošni materijal:

Stavka	Skladištenje	Upute
HT1	-25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnoj temperaturi. Čuvajte na temperaturi od 2 °C do 8 °C dok ne budete spremni za razrjeđivanje denaturiranih biblioteka.

2. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugu za pripremu svježeg razrjeđivanja NaOH:
 - Voda laboratorijske kvalitete (800 µl)
 - 1 N NaOH (200 µl)Rezultat je 1 ml 0,2 N NaOH.

NAPOMENA Držite epruvetu začepljenom. Upotrijebite svježu otopinu u roku od **12 sati**.

Denaturiraj biblioteku od 4 nM

1. Pomiješajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugu.
 - Biblioteka od 4 nM (5 µl)
 - 0,2 N NaOH (5 µl)
2. Nakratko promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim centrifugirajte na 280 × g tijekom 1 minute.
3. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
4. Dodajte 990 µl unaprijed ohlađenog HT1 u epruvetu koja sadrži denaturiranu biblioteku.
Rezultat je 1 ml denaturirane biblioteke od 20 pM.

Razrijedi denaturiranu biblioteku od 20 pM

1. Razrijedite na željenu koncentraciju pomoću sljedećih volumena.

Koncentracija	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Biblioteka 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Prethodno rashlađen HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Okrenite kako biste pomiješali, a zatim impulsirajte centrifugu.
3. Prijeđite na sekvenciranje. Upute potražite u *Referentni priručnik za instrument MiSeqDx za MOS v4 (broj dokumenta 200010452)* i vodiču za tijek rada za *MiSeqDx Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx (broj dokumenta: 200015661)*.

Priprema sekvenciranja na sustavu NovaSeq 6000Dx

Upotrijebite sljedeće upute za denaturiranje i razrjeđivanje biblioteka za sekvenciranje na sustavu za sekvenciranje NovaSeq 6000Dx.

Potrošni materijal

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

Priprema

Pripremite *svježu* otopinu od 0,2 N NaOH za denaturiranje biblioteka za sekvenciranje. Dodatni volumen je pripremljen kako bi se spriječilo da male pogreške pipetiranja utječu na konačnu koncentraciju NaOH.

**OPREZ**

Svježe razrijeđen 0,2 N NaOH bitan je za proces denaturacije. Nepravilna denaturacija može smanjiti prinos.

1. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugu za razrjeđivanje 1 N NaOH do 0,2N NaOH:

Tablica 4 Način rada S2

Reagens	Volumen za jednu protočnu stanicu (μl)	Volumen za dvije protočne stanice (μl)
Voda laboratorijske kvalitete	40	80
Zaliha 1 N NaOH	10	20

Ti volumeni rezultiraju sa 50 μl 0,2 N NaOH za jednu protočnu stanicu ili 100 μl 0,2 N NaOH za dvije protočne stanice.

Tablica 5 Način rada S4

Reagens	Volumen za jednu protočnu stanicu (μl)	Volumen za dvije protočne stanice (μl)
Voda laboratorijske kvalitete	80	160
Zaliha 1 N NaOH	20	40

Ti volumeni rezultiraju sa 100 μl 0,2 N NaOH za jednu protočnu stanicu ili 200 μl 0,2 N NaOH za dvije protočne stanice.

2. Nekoliko puta preokrenite da biste pomiješali ili promiješajte u vrtložnoj miješalici.
3. Kombinirajte sljedeće volumene u epruveti s mikrocentrifugom za pripremu 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.
 - Voda laboratorijske kvalitete (600 μl)
 - 1M Tris-HCl, pH 8,0 (400 μl)

Rezultat je 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0

NAPOMENA Držite epruvetu začepljenom. Upotrijebite svježu otopinu u roku od **12 sati**.

Izradi skup normalizirane biblioteke

Koncentracija za umetanje može se razlikovati ovisno o pripremi biblioteke, kvantifikaciji i metodama normalizacije.

Upotrijebite sljedeće upute za normalizaciju biblioteka do odgovarajuće koncentracije, a zatim objedinite. Biblioteke sekvencirane na istoj protočnoj stanici moraju se kombinirati u jedan normalizirani skup.

NAPOMENA Maksimalni broj uzoraka koji se mogu obraditi po stazi s pomoću kompleta Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je 192. Ovo ograničenje je zbog ukupnog broja UD indeksa u skupovima A i B.

Normalizirajte biblioteke za grupiranje uzoraka

1. Odredite potrebnu koncentraciju skupne biblioteke na temelju željene konačne koncentracije za umetanje.
 - Za konačnu koncentraciju za umetanje od 350 pM, potrebna koncentracija skupne biblioteke iznosi 1,75 nM.
 - Da biste odredili koncentraciju skupne biblioteke za drugačiju konačnu koncentraciju za umetanje, pogledajte [Razrijedi biblioteke na početnu koncentraciju na stranici 48](#).
2. Normalizirajte biblioteke do željene koncentracije skupne biblioteke pomoću vrijednosti 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
Za pomoć pri razrjeđivanju biblioteka do odgovarajuće koncentracije pogledajte [Kalkulator grupiranja uzoraka](#) na Illumina web-mjestu.

Preporučene koncentracije punjenja

Optimalna koncentracija umetanja DNK-a ovisi o vrsti biblioteke i veličini umetka. Za biblioteke > 450 bp možda će biti potrebne veće koncentracije umetanja.

Grupirajte uzorke normaliziranih biblioteka i dodajte opcijsku PhiX kontrolu

1. Kombinirajte odgovarajući volumen svake normalizirane biblioteke u novoj epruveti za mikrocentrifugu kako biste dobili jedan od sljedećih konačnih volumena:

Način rada	Konačni volumen (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Opcionalno]** Dodajte 1 % nenedaturirani PhiX > kako slijedi.
 - a. Razrijedite 10 nM PhiX-a na 2,5 nM koristeći 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
 - b. Dodajte odgovarajuću količinu nenedaturiranog 2,5 nM PhiX-a u epruvetu skupa nenedaturirane biblioteke.

Način rada	Nenedaturirani 2,5 nM PhiX (µl)	Skup nenedaturirane biblioteke (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Kod dodavanja u PhiX-u, 1 % je preporučena količina za dobro uravnotežene biblioteke. Za biblioteke s niskom raznolikošću može biti potrebno više. Da biste koristili PhiX kontrolu s knjižnicama niske raznolikosti, obratite se Illumina tehničkoj podršci za upute.

Skup denaturiranih biblioteka i opcionalna PhiX kontrola

1. Dodajte 0,2N NaOH u epruvetu nendenaturiranog skupa biblioteka i opcionalni PhiX kako slijedi.

Protočna stanica	0,2 N NaOH	Skup nendenaturirane biblioteke (µl)	Rezultirajući volumen
S2	37	150	187 µl ili 187,9 µl s PhiX-om
S4	77	310	387 µl ili 388,9 µl s PhiX-om

2. Zatvorite i zatim kratko promiješajte.
3. Centrifugirajte na 280 × g do 1 minute.
4. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 8 minuta kako biste denaturirali.
5. Dodajte 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 kako slijedi za neutralizaciju.

Način rada	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Rezultirajući volumen
S2	38	225 µl ili 225,9 µl s PhiX-om
S4	78	465 µl ili 466,9 µl s PhiX-om

6. Zatvorite i zatim kratko promiješajte.
7. Centrifugirajte na 280 × g do 1 minute.
8. Prenesite cijelu količinu denaturirane biblioteke ili denaturirane biblioteke i PhiX u epruvetu za biblioteku NovaSeq 6000Dx.
9. Prijeđite na sekvenciranje. Upute potražite u *dokumentaciji proizvođača instrumenta NovaSeq 6000Dx (broj dokumenta 200010105)* i *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za NovaSeq 6000Dx (broj dokumenta 200014776)*.

Otklanjanje poteškoća

Pomoću sljedeće tablice riješite probleme u tijeku rada. Ako obrada sekvenciranjem ili priprema biblioteke za uzorak ne uspije dva puta, možda će biti potrebno dodatno rješavanje problema. Obratite se Illumina tehničkoj podršci.

Promatranje	Mogući uzrok	Preporučena radnja
Obrada sekvenciranjem ne zadovoljava specifikacije kontrole kvalitete obrade	Pogreška korisnika ili laboratorijske opreme u tijeku rada analize	Kvalificirajte obogaćene biblioteke kako bi se osigurao odgovarajući prinos biblioteke i raspodjela veličine fragmenata. Ponovite pripremu biblioteke iz jednog od sljedećih koraka ovisno o tome gdje se sumnja na pogrešnu upotrebu ili pogrešku opreme. Ako je došlo do nepoznatih ili drugih pogrešaka, obratite se Illumina tehničkoj podršci za rješavanje problema s obradom. • Ponovno sekvencirajte biblioteke. Pogledajte Priprema sekvenciranja na sustavu NextSeq 550Dx na stranici 49, Priprema sekvenciranja na sustavu MiSeqDx na stranici 51 ili Priprema sekvenciranja na sustavu NovaSeq 6000Dx na stranici 52. • Ponovno obogatite biblioteke. Pogledajte odjeljak Hibridiziraj sonde na stranici 36. • Započnite pripremu biblioteke od početka tijeka rada. Pogledajte Upute za upotrebu na stranici 21.
	Problem s instrumentom	Obratite se Illumina tehničkoj podršci.
Pogreška u generiranju FASTQ-a ili opća pogreška sustava sekvenciranja (npr. mrežna pogreška, pogreške pri umetanju/vađenju reagensa itd.)	Problem sa softverom ili instrumentom	Za pomoć pri analizi pogledajte modul ili vodič za aplikaciju ili dokumentaciju <i>Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta 1000000009513)</i>, <i>Referentni priručnik za instrument MiSeqDx za MOS v4 (broj dokumenta 200010452)</i> ili <i>Dokumentacija instrumenta NovaSeq 6000Dx (broj dokumenta 200010105)</i>. Obratite se Illumina tehničkoj podršci za dodatnu pomoć.

Promatranje	Mogući uzrok	Preporučena radnja
Biblioteka DNK-a ne generira dovoljnu iskoristivost za umetanje sekvenciranjem	Zahtjevi za unos uzorka nisu ispunjeni	Osigurajte odgovarajući unos uzorka i ponovite pripremu biblioteke. Pogledajte Preporuke za unos uzoraka na stranici 17 .
	Pogreška upotrebe ili opreme u tijeku rada analize	Ponovite pripremu biblioteke iz jednog od sljedećih koraka ovisno o tome gdje se sumnja na pogrešnu upotrebu ili pogrešku opreme. Ako je došlo do nepoznatih ili drugih pogrešaka, obratite se Illumina tehničkoj podršci za rješavanje problema s obradom. • Ponovno sekvencirajte biblioteke. Pogledajte Priprema sekvenciranja na sustavu NextSeq 550Dx na stranici 49, Priprema sekvenciranja na sustavu MiSeqDx na stranici 51 ili Priprema sekvenciranja na sustavu NovaSeq 6000Dx na stranici 52. • Ponovno obogatite biblioteke. Pogledajte odjeljak Hibridiziraj sonde na stranici 36. • Započnite pripremu biblioteke od početka tijeka rada. Pogledajte Upute za upotrebu na stranici 21.
	Zahtjevi za panel sonde za obogaćivanje nisu ispunjeni	Osigurajte odgovarajući panel sonde za obogaćivanje i ponovite pripremu biblioteke. Pogledajte Zahtjevi panela sonde za obogaćivanje na stranici 10 .

Karakteristike radnih svojstava

Učinkovitost s panelima cijelih egzoma

Učinkovitost panela egzoma testirana je primjenom najnižeg (50 ng) i najvišeg (1000 ng) preporučenog unosa Coriell Cell Line gDNA NA12878, s poznatim skupom istine za otkrivanje varijanti zametnih stanica (Coriell platinum genom). Panel egzoma 1 (45 Mb) i Panel egzoma 2 (36,8 Mb) korišteni su kao reprezentativni paneli. 24 tehničke replike testirane su analizom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s upotrebom Panela egzoma 1 (45 Mb) u dvije reakcije 12-pleksnog obogaćivanja. Analizom je testirano 12 tehničkih replika Illumina DNA Prep with Enrichment Dx upotrebom Panela egzoma 2 (36,8 Mb) u jednoj reakciji 12-pleksnog obogaćivanja. Obogaćene biblioteke sekvencirane su na sustavu za sekvenciranje NextSeq 550Dx modulom DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

U sljedećoj tablici prikazane su srednje vrijednosti mjerenja učinkovitosti sekundarnog sekvenciranja i otkrivanja varijanti za tehničke replike testirane sa svakim panelom.

Tablica 6 Učinkovitost analize s dva panela cijelih egzoma

Panel	Podstavljeno jedinствeno obogaćivanje očitanja	Ujednačenost pokrivenosti	Medijan duljine fragmenta	SNV opoziv ¹	SNV preciznost ²	Indel opoziv ¹	Indel preciznost ²
Panel egzoma 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Panel egzoma 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹ Opoziv = pozitivni / (stvarno pozitivni + lažno negativni)² Preciznost = stvarno pozitivni / (stvarno pozitivni + lažno pozitivni)

Granica otkrivanja

Referentni DNK standard Horizon HD799 korišten je za testiranje granice otkrivanja. HD799 sastoji se od umjereno kompromitirane DNK-a tretirane formalinom s poznatim SNV-ovima kod učestalosti alela u rasponu od 1 do 24,5 %. Korišten je najniži preporučeni unos DNK-a (50 ng), a procijenjena je stopa otkrivanja SNV-ova s učestalošću varijante alela (variant allele frequency, VAF) $\geq 5,0$ %. Testirano je 16 tehničkih replika Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analizom primjenom FFPE tijekom rada, obogaćeno panelom za obogaćivanje pankancerogenih stanica (1,94 Mb) u 16 (1-pleksnih) obogaćivanja, a zatim sekvencirano na instrumentu NextSeq 550Dx modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Svi uzorci prošli su zahtjeve za izvedbu uzoraka specifične za panel kako je prikazano u sljedećoj tablici.

Tablica 7 Učinkovitost uzorka za granicu otkrivanja

Panel	Stopa otkrivanja varijanti SNV-ova od $\geq 5,0$ % VAF-a	Prosječna ujednačenost pokrivenosti
Panel obogaćivanja pankancerogenih stanica (1,94 Mb, 523 gena)	100 %	99 %

Ometajuće tvari

Procijenjen je utjecaj potencijalno ometajućih tvari u Illumina DNA Prep with Enrichment Dx procjenom učinkovitosti analize u prisutnosti ometajućih tvari.

Ometanje u punoj krvi

Acetaminofen (egzogeni spoj, lijek), kreatinin i trigliceridi (endogeni metaboliti) testirani su dodavanjem u uzorke pune ljudske krvi prije ekstrakcije DNK-a. Da bi se procijenilo ometanje koje proizlazi iz prikupljanja krvi (kratko vađenje), EDTA je također dodana u uzorke pune krvi. Osim toga, kako bi se procijenilo ometanje koje proizlazi iz pripreme uzorka, etanol molekularne kvalitete dodan je u DNK izdvojen iz pune krvi.

Sljedeća tablica prikazuje koncentracije testa prema ometajućoj tvari.

Tablica 8 Potencijalno ometajuće tvari i koncentracije testirane u punoj krvi

Testna tvar	Testna koncentracija
Acetaminofen	15,6 mg/dl* Tri puta najviša koncentracija koja se očekuje nakon terapijske doze lijeka.
Kreatinin	15 mg/dl* Najveća zabilježena koncentracija u populaciji.
Trigliceridi	1,5 g/dl* Najveća zabilježena koncentracija u populaciji.
EDTA	6 mg/ml Tri puta veća koncentracija od očekivane u krvi, prikupljena u EDTA epruvete.
Etanol molekularne kvalitete	15 % v/v U eluatu nakon izdvajanja DNK-a.

* U skladu s CLSI EP37-ED1:2018

Prema ometajućoj tvari, testirano je 12 tehničkih replika u Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analizi, obogaćeno panelom egzoma 1 (45 Mb) u jednom obogaćivanju (12-pleksnom), a zatim sekvencirano na instrumentu NextSeq 550Dx modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Za testirane tvari, svih 12 uzoraka ispunilo je zahtjeve učinkovitosti uzorka i nije uočeno ometanje učinkovitosti analize.

Ometanje u FFPE tkivu

Dva kolorektalna FFPE uzorka testirana su u prisutnosti i odsutnosti hemoglobina pri 0,1 mg na 10 µm FFPE odjeljku kako bi se prikazao najgori scenarij od 50 % kontaminacije uzorka FFPE tkiva krvlju visoke razine hemoglobina. Uzorci su testirani analizom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pomoću panela za obogaćivanje pankancerogenih stanica 1 (1,94 Mb) kao reprezentativnog panela u 1-pleksnim obogaćivanjima. Obogaćene biblioteke zatim su sekvencirane na instrumentu NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx. Svi uzorci ispunili su zahtjeve učinkovitosti uzorka i pokazalo se da hemoglobin ne ometa učinkovitost analize.

Da bi se procijenila interferencija koja proizlazi iz pripreme uzorka, dva egzogena spoja dodana su u DNK izdvojen iz FFPE uzorka tkiva raka mjehura. Testirane egzogene tvari ekstrakcijske su otopine koje se obično koriste tijekom procesa ekstrakcije DNK-a i navedene su s testiranim količinama u sljedećoj tablici.

Otopine testnih tvari komercijalno su dostupne u kompletima za izolaciju DNK-a u stupcu.

Tablica 9 Potencijalno ometajuće egzogene tvari i koncentracije testirane u FFPE-u

Testna tvar	Testna koncentracija (µl / 30 µl eluata)
Deparaffinization Solution	113 x 10 ⁻⁶
Wash Buffer AW2	0,417

Po interferirajućoj tvari testirano je osam tehničkih replika u Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analizi, obogaćeno panelom za obogaćivanje pankancerogenih stanica (1,94 Mb) u 1-pleksnim obogaćivanjima, a zatim sekvencirano na instrumentu NextSeq 550Dx modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Za obje testirane tvari, svih osam uzoraka ispunilo je zahtjeve učinkovitosti uzorka i nije uočena interferencija u učinkovitosti analize.

Križna kontaminacija

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (žena, 10 uzoraka), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (muškarac, 12 uzoraka) i bez kontrola predloška (NTC, 2 uzorka) testirani su analizom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx u rasporedu ploče šahovnice. Svi su uzorci koristili najvišu preporuku za unos gDNK (1000 ng) kao najstroži uvjet za procjenu križne kontaminacije uzorka. Ispitivanje su dva puta provela dva odvojena rukovatelja. Panel egzoma 1 (45 Mb) korišten je u reakcijama 12-pleksnog obogaćivanja. Obogaćene biblioteke sekvencirane su na sustavu za sekvenciranje NextSeq 550Dx s DNA GenerateFASTQ Dx. Procjena je izvršena procjenom pokrivenosti specifičnog muškog Y-kromosoma u ženskim uzorcima usporedbom s pozadinskim razinama pločice pune ženskih uzoraka kao i indeksnom reprezentacijom NTC uzoraka.

Tablica 10 Rezultati križne kontaminacije

Ženski uzorci s pokrivenosti muškim Y-kromosomom u < 3x početnom šumu	Predstavljanje indeksa u NTC-u
100 %	< 0,0005 %

Učinkovitost aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Karakteristike performansi aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za NovaSeq 6000Dx navedene su u *priloženoj uputi o instrumentu NovaSeq 6000Dx (br. dokumenta 200025276)*.

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na NextSeq 550Dx omogućuje iste tijekove rada za sekundarnu analizu kao i primjena na uređaju NovaSeq 6000Dx, uključujući sljedeća tri tijeka rada: generacija FASTQ-a, generacija FASTQ-a i VCF-a za otkrivanje zametnih varijanti te generacija FASTQ-a i VCF-a za otkrivanje somatskih varijanti.

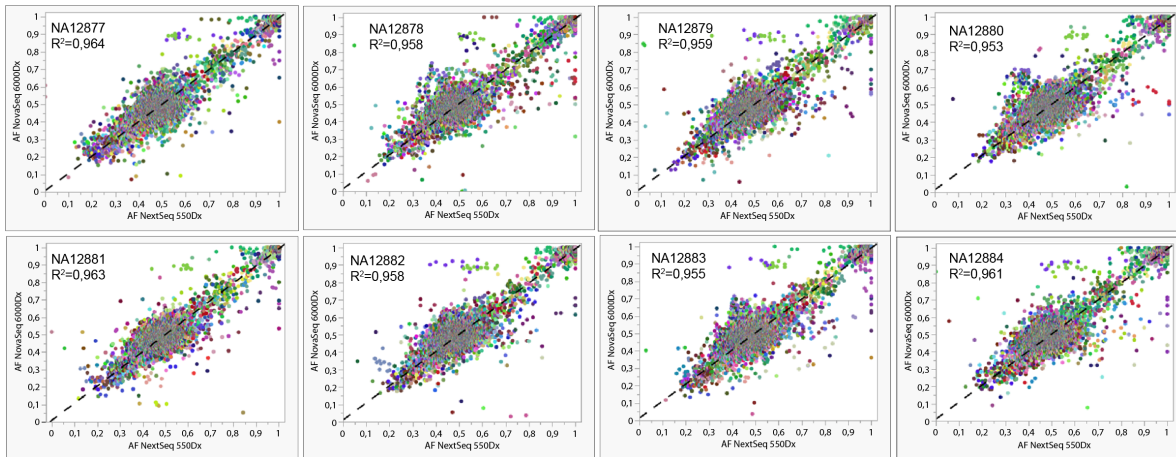
Usporedna izvedba sekundarne analize dobivena je iz iste pripreme biblioteke sekvencirane na obje platforme. Stopa otkrivanja varijanti ([Tablica 11](#)) i slaganje frekvencije (vidjeti [Slika 1](#)) za uzorke Coriell Cell Line gDNA procijenjeni su pomoću reprezentativne analize osmišljene za postavljanje upita različitim genima koji pokrivaju 1.970.505 baza (9.232 cilja) u sva 23 ljudska kromosoma. Testirano je osam uzoraka DNK-a iz platinastog genoma, sedam u šest ponavljanja (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) i jedno (NA12881) u pet ponavljanja (vidjeti [Slika 1](#)). Biblioteke su sekvencirane s tri obrade svaka na instrumentima NovaSeq 6000Dx i NextSeq 550Dx, a prepoznavanje varijanti provedeno je pomoću generacije FASTQ i VCF za tijek rada analize otkrivanja zametnih varijanti DRAGEN za aplikaciju Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Na temelju snažne korelacije između performansi aplikacije na instrumentima NovaSeq 6000Dx i NextSeq 550Dx, utvrđeno je i da su karakteristike radnih svojstava povezane sa sekundarnom analizom navedene u *priloženoj uputi o instrumentu NovaSeq 6000Dx (broj dokumenta: 200025276)* primjenjive na aplikaciju DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na NextSeq 550Dx.

Tablica 11 Učinkovitost aplikacije – stopa otkrivanja varijanti za SNV-ove, umetanja i brisanja

Panel	Stopa otkrivanja varijanti na NovaSeq 6000Dx	Stopa otkrivanja varijanti na instrumentu NextSeq 550Dx
Pangenomski panel (1,97 Mb, 9.232 cilja, 23 krom.)	99,9 %	99,9 %

Slika 1 Usporedba frekvencije varijanti za NovaSeq 6000Dx i NextSeq 550Dx obrađuje se analizom aplikacije DRAGEN for IDPE Dx



Dodatak: Sljedovi prilagodnika za indekse Illumina UD

Ovi jedinstveni dvostruki (UD) prilagodnici indeksa raspoređeni su na pločici kako bi se provela preporučena strategija uparivanja. Prilagodnici indeksa dugi su 10 baza, umjesto tipičnih osam baza.

Indeks 1 (i7) prilagodnici

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Indeks 2 (i5) prilagodnici

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Sljedeći slijed koristi se za podešavanje prilagodnika za Očitavanje 1 i Očitavanje 2.

CTGTCTCTTATACACATCT

Ploča A/postavka 1 prilagodnika indeksa

Naziv indeksa	i7 baze u prilagodniku	i5 baze u prilagodniku
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT

Naziv indeksa	i7 baze u prilagodniku	i5 baze u prilagodniku
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATCTCTC	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

Naziv indeksa	i7 baze u prilagodniku	i5 baze u prilagodniku
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA

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

Ploča B/postavka 2 prilagodnika indeksa

Naziv indeksa	i7 baze u prilagodniku	i5 baze u prilagodniku
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGTGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Naziv indeksa	i7 baze u prilagodniku	i5 baze u prilagodniku
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	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

Naziv indeksa	i7 baze u prilagodniku	i5 baze u prilagodniku
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGTAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC

Naziv indeksa	i7 baze u prilagodniku	i5 baze u prilagodniku
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Povijest revizija

Dokument	Datum	Opis promjene
Broj dokumenta 200038118 v01	Prosinac 2025.	- Uklonjena je referenca na Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module za NextSeq 550Dx. - Pojašnjen postupak čišćenja nakon tagmentacije. - Ažurirani referentni vodič za instrument MiSeqDx za broj dijela dokumenta MOS v4.
Broj dokumenta 200038118 v00	Srpanj 2023.	Početno izdanje. Prethodni dokument 200019584 zamijenjen je ovim dokumentom. Promjene od dokumenta 200019584 v2 do ovog novog dokumenta: - Dodan je sadržaj kao podrška sekvenciranju na instrumentu NextSeq 550Dx pomoću aplikacije DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx za NextSeq 550Dx. - Pojašnjen popis reagensa koji nisu priloženi. - Dodane informacije o izvješćivanju o incidenciji u Upozorenja i mjere opreza. - Pojašnjena očekivanja o obogaćivanju biblioteka. - Dodane upute za pripremu 400 mM Tris-HCl, pH 8,0. - Uklonjena je tipografska pogreška u koraku pripreme sekvenciranja. Izmjene prethodno izvršene za dokument 200019584: - Dodan je sadržaj kao podrška sekvenciranju na instrumentu NovaSeq 6000Dx. - Dodani su nazivi sustava za sekvenciranje i kataloški brojevi. - Uklonjene su jedinstvene informacije s dvostrukim indeksiranjem za biblioteke s jednim indeksom.

Patenti i žigovi

Ovaj dokument i njegov sadržaj vlasništvo su tvrtke Illumina, Inc. i njezinih povezanih društava („Illumina“) te su namijenjeni isključivo za ugovornu upotrebu klijentima u vezi s proizvodom(ima) opisanima u njemu(ima). Dokument i njegov sadržaj ne smiju se upotrebljavati ni distribuirati ni u koju drugu svrhu niti se smiju na neki drugi način prenositi, otkrivati ili reproducirati bez prethodnog pisanog odobrenja tvrtke Illumina. Illumina ovim dokumentom ne prenosi nikakve licencije zaštićene svojim pravom na patent, žig, autorskim pravom ili običajnim pravom ni slična prava bilo koje treće strane.

Kvalificirano osoblje s odgovarajućom izobrazbom mora se strogo i bez iznimki pridržavati uputa u ovom dokumentu da bi se zajamčila pravilna i sigurna upotreba proizvoda opisanih u njemu. Prije upotrebe proizvoda nužno je s razumijevanjem pročitati cjelokupan sadržaj dokumenta.

AKO UPUTE U DOKUMENTU NE PROČITATE U CIJELOSTI TE IH SE NE PRIDRŽAVATE BEZ IZNIMKI, MOŽE DOĆI DO OŠTEĆENJA PROIZVODA, OZLJEDA KORISNIKA ILI DRUGIH OSOBA I DO OŠTEĆENJA DRUGE IMOVINE TE SE TIME PONIŠTAVAJU SVA JAMSTVA ZA PROIZVOD(E).

ILLUMINA NE PREUZIMA ODGOVORNOST ZA ŠTETE NASTALE USLIJED NEPRAVILNE UPOTREBE PROIZVODA KOJI JE(SU) OPISAN(I) U OVOM DOKUMENTU (UKLJUČUJUĆI DIJELOVE TOG(TIH) PROIZVODA I SOFTVER).

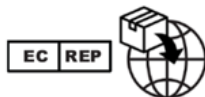
© 2025. Illumina, Inc. Sva prava pridržana.

Svi su žigovi vlasništvo tvrtke Illumina, Inc. ili njihovih vlasnika. Konkretna informacija o žigovima potražite na adresi www.illumina.com/company/legal.html.

Podaci za kontakt



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 SAD
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (izvan Sjeverne Amerike)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australski sponzor

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

Oznaka proizvoda

Sveobuhvatno objašnjenje simbola koji se nalaze na pakiranju proizvoda i naljepnica potražite u legendi simbola na web-mjestu support.illumina.com na kartici *Documentation* (Dokumentacija) za vaš komplet.