

TIL NOTKUNAR VIÐ IN VITRO GREININGU. AÐEINS TIL ÚTFLUTNINGS.

Ætluð notkun

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit er sett af prófefnum og einnota vörum sem notaðar eru til að útbúa sýnasöfn úr DNA úr frumum og vefjum manna til að þróa greiningarprófanir *in vitro*. Notendaúttegið þreifaraspjöld eru nauðsynleg til að undirbúa söfn sem beinast að tilteknu erfðamengissvæði. Sýnasöfnin sem búin eru til eru ætluð til notkunar í Illumina raðgreiningarkerfum. Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx inniheldur hugbúnað fyrir uppsetningu keyrslu, eftirlit með og greiningu á raðgreiningu.

Meginreglur um ferli

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er ætlað til handvirkis undirbúnings DNA-raðgreiningarsafna sem hafa verið auðguð fyrir marksvæði úr erfðaefti fengnu úr mannfrumum og vefjum.

Nauðsynlegt er að nota bíótínýleruð fákirnisnúkleótíð spjöld til að auðga markhópinn. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er samhfæft við fjölbreytt úrval af spjaldastærðum, þar á meðal lítil spjöld (<20.000 þreififarar) að stórum spjöldum (>200.000 þreififarar). Auðguðu söfnin sem búin eru til eru ætluð til notkunar í Illumina raðgreiningarkerfum.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit aðferðin samanstendur af eftirfarandi skrefum:

- **Tagment Genomic DNA**—Notar Enrichment BLT Small (eBLTS) til að merkja DNA-inntakið. Við merkingar er gDNA sundrað og merkt með vísilyklum í einu skrefi. Lágmarks DNA inntak upp á 50 ng er nauðsynlegt til að metta eBLTS í merkingarhvörfunum. Þegar það er mettað sundrar eBLTS ákveðnum fjölda DNA-sameinda til að búa til stöðluð söfn með samræmda dreifingu brotastærða.
- **Hreinsun eftir merkingu**—Hreinsar upp DNA-ið sem er merkt með vísilyklamerktu á eBLTS til að nota í mögnun.
- **Magna upp merkt DNA**—Magnar upp merktu DNA með því að nota PCR forrit með takmarkaðri lotu. Einkvæmum tvöföldum (UD) vísu er bætt við enda DNA-brotanna, sem gerir kleift að tvíþætta einkvæma strikakóðun DNA-safnanna og mynda klasa við raðgreiningu.
- **Hreinsun á söfnum**—Notar perluhreinsunaraðferð til að hreinsa og stærðarvelja mögnuðu DNA-söfnin.
- **Sameining safna**—Sameinar DNA-söfn með einkvæmum vísu í eitt safn með allt að 12 söfnum. Þú getur sameinað söfn eftir rúmmáli eða massa.
- **Blöndunarþreififarar**—Samanstanda af blöndunarhvörfunum þar sem tvíþætta DNA-söfnum er eðlisbreytt og hópur af bíótínýleruðum DNA-þreifurum er blandað við markerfðamengissvæði.
 - Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er samhfæft við fleiri en eitt spjald. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit inniheldur ekki auðgunarspjald. Notandinn útvegar þreifaraplötur og þær verða að uppfylla nauðsynlegar kröfur. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit prófefnin eru samhfæð bæði

Illumina og auðgunar-DNA fákirnisspjöld frá þriðja aðila sem uppfylla nauðsynlegar forskriftir. Fyrir nánari upplýsingar um nauðsynlegar forskriftir fyrir spjöld frá þriðja aðila, sjá [Enrichment Probe Panel Requirements á síðu 9](#).

- **Fanga blandaða þreifara**—Nota Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) til að fanga bíótínýleruðu þreifarana sem hefur verið blandað við marksvæði sem vekja áhuga.
- **Magna auðguð söfn**—Notar PCR til að magna auðguðu söfnin.
- **Hreinsun á auðguðum söfnum**—Notar perluhreinsunarferli til að hreinsa auðguðu söfnin til að vera tilbúin til raðgreiningar.
- **Raðgreining**—Raðgreining auðgaðra safna er framkvæmd á MiSeqDx™, NextSeq 550Dx™ eða NovaSeq 6000Dx™ raðgreiningarkerfum. Fyrir MiSeqDx er samþætta DNA GenerateFASTQ DxLocal Run Manager einingin notuð til að setja upp raðkeyrslur, fylgjast með keyrslum og mynda FASTQ úr grunnköllum. Fyrir NextSeq 550Dx með DRAGEN Server og NovaSeq 6000Dx, þá er DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx forritið notað til að setja upp keyrslu og aukagreiningu með nokkrum tiltækum verkflæðum.

Takmarkanir verklags

- Til notkunar við greiningar *in vitro*.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er samhæft við DNA úr frumum og vefjum manna.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er samhæft við tvíþátta gDNA inntak upp á 50–1.000 ng. Afköst eru ekki tryggð með inntaki utan þessara marka.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Inniheldur ekki prófefni fyrir DNA útdrátt. Niðurstöður greiningarprófana, þar með taldar truflunarprófanir, sem gefnar eru upp í [Afkastaeiginleikar á síðu 54](#) (Afkastaeiginleikar), hafa verið fengnar með heilblóði og FFPE sem dæmigerðum sýnagerðum með dæmigerðum DNA útdráttarbúnaði. Allar greiningarprófanir sem eru þróaðar til notkunar með Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit prófefnum þurfa að vera fullstaðfestar fyrir alla þætti afkasta með DNA-útdráttarbúnaði að eigin vali.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er ekki ráðlagt fyrir léleg FFPE-sýni með $\Delta Cq > 5$. Notkun sýna með $\Delta Cq > 5$ gæti aukið líkur á að undirbúningur safns mistakist eða dregið úr afköstum prófsins.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit prófefni hafa verið stillt og prófuð fyrir sýnisinntak, auðgunarhvörf og samsetningu sem tilgreind er í eftirfarandi töflu.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Sýnisinntak	Auðgunarhvörf	Samsetning auðgunar
16 sýna sett	Lág gæði (FFPE)	16 hvörf	1-þátta
96-sýna sett	Hágæða (t.d. heilblóð)	8 hvörf	12-þátta

- FFPE-inntaksvinnsla hefur verið prófuð og er aðeins ráðlögð fyrir 1-pátta auðgunarhvörf með 16 sýna setti.
- Fyrir 96-sýna settið eru óstaðlaðar samsetningar (2 til 11-pátta) mögulegar, en hafa eftirfarandi takmarkanir:
 - Vinnsla sýna í auðgunarhvörfum með 2 til 11 þáttum dregur úr afkastagetu búnaðarins.
 - Bestu niðurstöður eru ekki tryggðar. Til að fá viðeigandi auðgunarafköst fyrir óstaðlaðar samsetningar gæti þurft frekari bestun.
 - Fyrir aðferðir til að sameina gögn með fáum þáttum (2 til 8-pátta) er nauðsynlegt að velja vísilykla með fjölbreyttum röðum til að hámarka litajafnvægi fyrir vel heppnaða raðgreiningu og gagnagreiningu. DNA GenerateFASTQ Dx einingin á MiSeqDx og NextSeq 550Dx býður upp á valkosti fyrir vísissamsetningar með litajafnvægi við uppsetningu keyrslu. Fyrir nánari upplýsingar um sameiningaraðferðir, sjá [Sameiningaraðferð. á síðu 31](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er takmarkað við að afhenda auðguð söfn sem eru raðgreind á MiSeqDx, NextSeq 550Dx og NovaSeq 6000Dx eingöngu. Notkun annarra raðgreiningarkerfa krefst fullrar staðfestingar á öllum afkastaviðmiðum.
- Auðgunarspjöld eru ekki hluti af þessari vöru. Niðurstöður greiningarprófana sem gefnar eru upp í [Afkastaeiginleikar á síðu 54](#) (Afkastaeiginleikar) eru fengnar með dæmigerðum auðgunarspjöldum og eru eingöngu veittar til upplýsingar. Eiginleikar greiningarafkasta eru eingöngu ætlaðir til að lýsa almennri getu prófunarinnar og staðfesta ekki getu eða hentugleika varðandi neinar sérstakar fullyrðingar um prófun. Allar greiningarprófanir sem eru þróaðar til notkunar með þessum prófefnum þurfa að vera fullstaðfestar fyrir alla þætti afkasta.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er samhæft við bæði Illumina og auðgunarspjöld frá þriðja aðila. Hins vegar er ekki tryggt að auðgunarspjöld frá þriðja aðila sem ekki uppfylla kröfur spjaldsins skili fullnægjandi frammistöðu. Nánari upplýsingar um kröfur spjalds er að finna í [Enrichment Probe Panel Requirements á síðu 9](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit notar 2 klukkustunda blöndunartíma. Notkun lengri blöndunartíma getur haft áhrif á mælikvarða afkasta.
- DNA GenerateFASTQ DxLocal Run Managereiningar fyrir MiSeqDx og NextSeq 550Dx veita aðeins FASTQ-skrár. Ef þú notar þessar einingar þarftu að staðfesta aukagreiningu.
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment DxForritið er fánlegt á NextSeq 550Dx með DRAGEN Server og NovaSeq 6000Dx. Forritið styður mörg auka greiningarvinnuflæði, þ.m.t. FASTQ myndun, FASTQ og VCF myndun til að greina kímlínutilbrigði og FASTQ og VCF myndun til að greina líkamleg tilbrigði. Ef verið er að nota forritið til að búa til VCF þarf ekki að staðfesta aukagreiningu. Takmarkanir forritsins eru meðal annars eftirfarandi:
 - Innskot að lengd >18 bp og úrfellingar að lengd >21 bp hafa ekki verið staðfest.
 - Stór tilbrigði, þar á meðal fjölkirnistilbrigði (MNV) og stór innskot og úrfellningar gætu verið tilkynnt sem aðskilin minni tilbrigði í VCF-skránni.
 - Lítil MNV eru tilkynnt sem aðskilin tilbrigði í VCF-skránni.
 - Úrfellingar eru skráðar í VCF-skránni á hnitinu fyrir basann sem kemur á undan, samkvæmt VCF-sniði. Því skal skoða aðliggjandi tilbrigði áður en tilkynnt er að einstakt basakall sé arfhrein tilvísun.

- Takmarkanir sem tengjast kímlínum:
 - Vinnuflæði til að greina kímlínu FASTQ og VCF myndun í DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx forritinu er hannað til að skila eigindlegum niðurstöðum fyrir kímlínutilbrigði (t.d. arfhrein, arfblendin, villt gerð).
 - Breytileiki í afrita fjölda getur haft áhrif á hvort tilbrigði er greint sem arfhreint eða arfblendið.
 - Kerfið mun ekki tilkynna fleiri en tvö tilbrigði á einum stað, jafnvel þótt breytileiki í fjölda afrita sé til staðar.
- Takmarkanir sértækar fyrir líkamsfrumusértaka greiningu:
 - Vinnuflæði til að greina líkamlega FASTQ- og VCF-myndun í DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx forritinu er hannað til að skila eigindlegum niðurstöðum fyrir afbrigðisköllum í líkamsfrumum (þ.e. hvort tilbrigði í líkamsfrumum séu til staðar).
 - Vinnuflæðið til að mynda FASTQ- og VCF-skrár getur ekki greint á milli kímlínutilbrigða og tilbrigða í líkamsfrumum. Vinnuflæðið er hannað til að greina tilbrigði yfir fjölbreytta tíðni tilbrigða, en ekki er hægt að nota tilbrigðatíðni til að greina á milli líkamstilbrigða og kímlínutilbrigða.
 - Eðlilegur vefur í sýninu hefur áhrif á greiningu tilbrigða. Tilkynnt greiningarmörk byggjast á tilbrigðatíðni miðað við heildarmagn DNA sem var dregið úr bæði æxlis- og eðlilegum vef.
 - Ef fleiri en eitt breytilegt samsætuform er kallað á sama stað, verður ekkert þeirra skráð sem samþykkt afbrigði. Í staðinn verða allar samsætturnar tilkynntar en síðar með fjölsamsætu merkinu.

Íhlutir vöru

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit samanstendur af eftirfarandi íhlutum.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, vörulistanúmer 20051354 (16 sýni), eða númer 20051352 (96 sýni)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, vörulistanúmer 20051355 (16 sýni), eða númer 20051353 (96 sýni)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Eining fyrir MiSeqDx, vörulistanúmer 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Búnaður fyrir NovaSeq 6000Dx, vörulistanúmer 20074609
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Búnaður fyrir NextSeq 550Dx, vörulistanúmer 20074730

Prófefni sem fylgja með

Til að klára Illumina DNA Prep with Enrichment Dx þarf Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A eða Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Hægt er að undirbúa eftirfarandi fjölda undirbúnings safna og auðgunarhvarfa með því að nota 16-sýna eða 96-sýna sett.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Sýnisinntak	Auðgunarhvörf	Samsetning auðgunar
16-sýna sett	Lág gæði (FFPE)	16 hvörf	1-pátta
96-sýna sett	Hágæða (t.d. heilblóð)	8 hvörf	12-pátta

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx með UD vísasetti A/B

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, geymið við 15 °C til 30 °C

Eftirfarandi prófefni eru send við stofuhita. Geymið prófefni tafarlaust við tilgreint hitastig til að tryggja rétta virkni.

Heiti prófefnis	Rörmagn		Litur á loki	Fyllingarrúmmál	Virk innihaldsefni
	16 sýni (nr. 20050020)	96 sýni (nr. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Rautt	350 µl	Hreinsiefnisláusn í vatni.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Grænt	41 ml	Jöfnuð vatnsláusn sem inniheldur hreinsiefni og salt.
Cleanup Beads (CB)	1	Á ekki við*	Rautt	10 ml	Meðseglandi perlur í föstu formi í jafnaðri vatnsláusn.

* Cleanup Beads fyrir 96 sýni fylgir með Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (nr. 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 sýni), geymið við 15 °C til 30 °C

Fyrir 96 sýna sett eru Cleanup Beads innifalin í Illumina Prep Dx Cleanup Beads (vörulistanúmer 20050030). Eftirfarandi prófefni er sent við stofuhita. Geymið prófefni tafarlaust við tilgreint hitastig til að tryggja rétt afköst. Fyrir 16 sýna sett eru Cleanup Beads innifalin í Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (vörulistanúmer 20050020).

Heiti prófefnis	Magn	Litur á loki	Fyllingarrúmmál	Virk innihaldsefni
Cleanup Beads (CB)	4	Rautt	10 ml	Meðseglandi perlur í föstu formi í jafnaðri vatnsláusn.

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, geymið við 2 °C til 8 °C

Eftirfarandi prófefni eru send í kæli. Geymið prófefni tafarlaust við tilgreint hitastig til að tryggja rétt afköst. Geymið eBLTS stofnrörið upprétt í kæli þannig að perlurnar séu alltaf á kafi í jafnalausninni.

Heiti prófefnis	Rörmagn		Litur á loki	Fyllingarrúmmál		Virki innihaldsefni
	16 sýni (# 20050021)	96 sýni (# 20050026)		16 sýni	96 sýni	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Gult	200 µl	290 µl	Streptavidin Magnetic Beads tengdar stökkklum í jafnaðri vatnslausn sem inniheldur glýseról, EDTA, díþíópreitól, salt og þvottaefni.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Glært	1,8 ml	1,8 ml	Jöfnuð vatnslausn.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, geymið við -25 °C til -15 °C

Eftirfarandi prófefni eru send frosin. Geymið prófefni tafarlaust við tilgreint hitastig til að tryggja rétt afköst.

Heiti prófefnis	Rörmagn		Litur á loki	Fyllingarrúmmál		Virki innihaldsefni
	16 sýni (# 20050022)	96 sýni (# 20050027)		16 sýni	96 sýni	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Glært	290 µl	290 µl	Jöfnuð vatnslausn sem inniheldur magnesíumsalt og dímetýlformamíð.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Glært	200 µl	610 µl	DNA pólýmerasi og dNTP í jafnaðri vatnslausn.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 sýni), geymið við 2 °C til 8 °C

Fyrir 16 sýna sett eru eftirfarandi prófefni innifalin í Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (vörulistanúmer 20050023). Fyrir 96 sýna sett eru prófefni innifalin í Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (vörulistanúmer 20050028).

Eftirfarandi prófefni eru send í kæli. Geymið prófefni tafarlaust við tilgreint hitastig til að tryggja rétta virkni.

Heiti prófefnis	Rörmagn	Litur á loki	Fyllingarrúmmál	Virk innihaldsefni
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Glært	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads í jafnaðri vatnslausn sem inniheldur formamíð, hreinsiefni og salt.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Glært	1,8 ml	Jöfnuð vatnslausn.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Glært	200 µl	Jöfnuð vatnslausn sem inniheldur hreinsiefni og salt.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Glært	200 µl	Jöfnuð vatnslausn.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 sýni), geymið við 2 °C til 8 °C

Fyrir 96 sýna sett eru eftirfarandi prófefni innifalin í Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (vörulistanúmer 20050028). Fyrir 16 sýna sett eru prófefni innifalin í Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (vörulistanúmer 20050023).

Eftirfarandi prófefni eru send í kæli. Geymið prófefni tafarlaust við tilgreint hitastig til að tryggja rétt afköst.

Heiti prófefnis	Rörmagn	Litur á loki	Fyllingarrúmmál	Virk innihaldsefni
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Glært	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads í jafnaðri vatnslausn sem inniheldur formamíð, hreinsiefni og salt.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Glært	1,8 ml	Jöfnuð vatnslausn.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Glært	200 µl	Jöfnuð vatnslausn sem inniheldur hreinsiefni og salt.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Glært	200 µl	Jöfnuð vatnslausn.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, geymið við -25 °C til -15 °C

Eftirfarandi prófefni eru send frosin. Geymið prófefni tafarlaust við tilgreint hitastig til að tryggja rétt afköst.

Heiti prófefnis	Rörmagn		Litur á loki	Fyllingarrúmmál	Virki innihaldsefni
	16 sýni (# 20050024)	96 sýni (# 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Glært	580 µl	Hreinsiefnislausn í vatni.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Gulbrúnt	4,1 ml	Jöfnuð vatnslausn sem inniheldur sölt og hreinsiefni.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Glært	320 µl	PCR primers blanda (fákirnisnúkleótíð).
2N NaOH (HP3)	1	1	Glært	200 µl	2N natríumhýdroxíð (NaOH) lausn.
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Blátt	480 µl	Jöfnuð vatnslausn með Cot-1 DNA, þéttiefni og formamíði
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Glært	200 µl	DNA pólýmerasi og dNTP í jafnaðri vatnslausn.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, geymið við -25 °C til -15 °C

Eftirfarandi prófefni eru send frosin. Geymið prófefni tafarlaust við tilgreint hitastig til að tryggja rétt afköst. Fyrir vísistengiraðir, sjá [Viðauki: Illumina UD Indexes Adapter Sequences](#). á síðu 59.

Íhlutur	Magn
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Indexes), # 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 Indexes), # 20050039	1

Prófefni fylgja ekki með

Prófefni nauðsynleg, fylgja ekki með

- Prófefni til DNA-einangrunar og hreinsunar
- Prófefni til magnmælingar á DNA
- Etanól (200% fyrir sameindalíffræði)

- Núkleasalaust vatn
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 1N NaOH lausn, sameindalíffræðigæði
- Ef NextSeq 550Dx sequencing system er notað:
 - 200 mM Tris, pH 7,0 (hægt að þynna úr 1 M Tris-HCL, pH 7,0)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 lotur) (vörulistanúmer 20028871)
- Ef MiSeqDx sequencing system er notað:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (vörulistanúmer 20037124)
- Ef NovaSeq 6000Dx sequencing system er notað:
 - 400 mM Tris, pH 8,0 (hægt að þynna úr 1 M Tris-HCL, pH 8,0)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 lotur) (vörulistanúmer 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 lotur) (vörulistanúmer 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (vörulistanúmer 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (vörulistanúmer 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (vörulistanúmer 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 pakkar (vörulistanúmer 20062291)

Enrichment Probe Panel Requirements

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit prófeyfni eru samhafð við bæði Illumina og auðgunar-DNA fákirnisþjöld frá þriðja aðila. Ef notaðir eru bíótínýleraðir DNA-þreifarar frá þriðja aðila (föst eða sérsniðin spjöld) skal ganga úr skugga um að þeir uppfylli kröfur.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit hefur verið fínstillt og staðfest með eftirfarandi spjaldsupplýsingum frá þriðja aðila. Sambærileg afköst eru ekki tryggð þegar notuð eru spjöld frá þriðja aðila sem uppfylla ekki forskriftirnar.

- 80 bp eða 120 bp þreifaraengd
- Milli 500 og 675.000 þreifarar
- Einþátta eða tvíþátta DNA
- Heildarinntak þreifara ≥ 3 pmól fyrir auðgun við samsetningar frá 1-þátta til 12-þátta

Geymsla og meðhöndlun

- Stofuhiti er skilgreindur sem 15 °C til 30 °C.
- Prófeyfni eru stöðug þegar þau eru geymd eins og tilgreint er þar til tilgreindur fyrningardagur rennur út á merkimiðum settsins. Varðandi geymsluhita, sjá [Prófeyfni sem fylgja með á síðu 4](#).

- Frosnu prófefnin eru stöðug í allt að fjórar frysti-þíðingarlotur sem fara fram fyrir tilgreindan fyrningardag.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit aðferðin inniheldur eftirfarandi örugga stöðvunarstaði:
 - Eftir [Magna upp merkt DNA á síðu 26](#) eru mögnuðu söfnin stöðug í allt að 30 daga þegar þau eru geymd við -25 °C til -15 °C.
 - Eftir [Hreinsa söfn á síðu 28](#) eru hreinsuð, mögnuð bókasöfn stöðug í allt að 30 daga þegar þau eru geymd við -25 °C til -15 °C.
 - Eftir [Sameina forauðguð söfn á síðu 30](#) eru sameinuðu söfnin stöðug í allt að 30 daga þegar þau eru geymd við -25 °C til -15 °C.
 - Eftir [Magna auðgað safn á síðu 41](#) getur plata auðgaðs, magnaðs safns verið áfram á lotuhitaranum í allt að 24 klukkustundir. Einnig er hægt að geyma plötuna við 2 °C til 8 °C í allt að 48 klukkustundir.
 - Lokahreinsuð auðguð söfn eru stöðug í allt að 7 daga þegar þau eru geymd við -25 °C til -15 °C.
- Ef einhver hluti umbúðanna eða innihaldsins Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er skemmdur eða skertur, hafið samband við Illumina þjónustuver.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) getur myndað sýnilegt botnfall eða kristalla. Ef botnfall sést skal hita við 37 °C í 10 mínútur og síðan iðublanda þar til botnfallið er uppleyst.
- Hybridization Oligos (HYB) og Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) verður að forhita upp í sama hitastig og haldhitastig blöndunar sem á við um hverja sýnistegund og þreifaraspjald. Frekari upplýsingar um meðhöndlun HYB og EEW, sjá [Athugasemdir við ferli á síðu 15](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) og HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) geta myndað kristalla og ský. Ef það sjást kristallar og ský skal iðublanda eða pípetta upp og niður til að blanda þar til lausnin er tær. Gætið þess að forhita NHB2 áður en pípettu er beitt.
- Við meðhöndlun Cleanup Beads (CB), skal beita eftirfarandi bestu starfsvenjum:
 - Aldrei frysta perlurnar.
 - Rétt fyrir notkun skal iðublanda perlunum þar til þær dreifast aftur og liturinn verður einsleitur.
- Við meðhöndlun Enrichment BLT Small (eBLTS), skal beita eftirfarandi bestu starfsvenjum:
 - Geymið eBLTS rörið upprétt í kæli þannig að perlurnar séu alltaf á kafi í jafnalausninni.
 - Iðublandið eBLTS vandlega þar til perlurnar svífa alveg aftur. Til að forðast að perlurnar setjist aftur, er ekki mælt með skilvindu áður en pípettað er.
 - Ef perlur festast við hlið eða ofan á 96-holu brunnpötu, skal skilvinda við 280 × g í 3 sekúndur og pípetta síðan til að endurblanda þær.
- Við meðhöndlun vísislyklaplata skal beita eftirfarandi bestu starfsvenjum:
 - Ekki bæta sýnum við vísislyklaplötuna.
 - Hver brunnur á vísaplötunni er einnota.

Nauðsynlegur búnaður og efni, ekki innifalið

Til viðbótar við Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, vertu viss um að þú hafir nauðsynlegan búnað og efni áður en þú byrjar á aðferðinni.

Búnaður

Gangið úr skugga um að tilskilinn búnaður sé við höndina áður en byrjað er á aðferðalýsingunni.

Aðferðin hefur verið fínstillt og staðfest með því að nota þær vörur sem taldar eru upp. Sambærileg afköst eru ekki tryggð þegar búnaður er notaður utan forskriftanna.

Sumar vörur eru aðeins nauðsynlegar fyrir tiltekin vinnuflæði. Þessar vörur erutilgreindar í aðskildum töflum.

- Lotuhitari með eftirfarandi forskriftum:
 - Hitað lok
 - Lágmarks hitastigsstýringarsvið frá 10 °C til 98 °C
 - Lágmarksnákvæmni hitastýringar $\pm 0,25$ °C
 - Hámarks hvarfrúmmál 100 μ l
 - Samhæft við 96-brunna PCR-plötur með með fullum kanti
- Örsýnahitakassi með eftirfarandi forskriftum:
 - Umhverfishitastig +5,0 °C til 99,0 °C
 - Samhæft við 96-brunna MIDI-plötur
- Innlegg fyrir örsýnahitakassa sem eru samhæf við 96-brunna MIDI-plötur
- Hraðhristari fyrir örplötur með blöndunarhraða á bilinu 200–3.000 snúninga á mínútu
- Segulstandur sem er samhæfður við 96-brunna PCR plötur
- Segulstandur sem er samhæfður við 96-brunna MIDI plötur
- Flúrljósmaelir sem er samhæfður við magngreiningaraðferðina
- DNA-brotgreinir
- Nákvæmar pípettur:
 - 10 μ l einrásar- og fjölrásarpípettur
 - 20 μ l einrásar- og fjölrásarpípettur
 - 200 μ l einrásar- og fjölrásarpípettur
 - 1.000 μ l einrásarpípettur
 - Nákvæmar pípettur tryggja nákvæma veitingu prófefna og sýna. Hægt er að nota einrásar- eða fjölrásarpípettur ef þær eru kvarðaðar reglulega og nákvæmar innan 5% af tilgreindu rúmmáli.
- Örplötuskilvinda
- Örskilvinda

- Eitt af eftirfarandi Illumina raðgreiningarkerfum:
 - MiSeqDx Instrument, vörulistanúmer DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx tæki, vörulistanúmer 20005715 með valkvæðum Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx, vörulistanúmer 20086130
 - NovaSeq 6000Dx Instrument, vörulistanúmer 20068232
- **[Valkvætt]** Lofttæmisþétti
- **[FFPE]** Kerfi til PCR-greiningar í rauntíma

Efni

Gangið úr skugga um að tilskilin efni séu við höndina áður en byrjað er á aðferðalýsingunni.

Sumar vörur eru aðeins nauðsynlegar fyrir tiltekin verkflæði. Þær vörur eru tilgreindar í aðskildum töflum.

Aðferðin hefur verið fínstillt og staðfest með því að nota þær vörur sem taldar eru upp. Sambærileg afköst eru ekki tryggð þegar önnur efni eru notuð.

- Síðir pípettuoddar
- Keilulaga skilvindurör, 15 ml eða 50 ml
- 1,5 ml örskiljunarrör
- RNasa/DNasa-laúsir fjölrása prófefnisgeymar, einnota
- RNasa/DNasa-laúsar ræmur með 8 rörum og samsvarandi lokum
- Sermifræðilegar pípettur
- 96-brunna pólýprópýlen djúpbrunnageymsluplata, 0,8 ml (MIDI plata)
- 96-brunnau PCR plötur með harðri skel og fullum kanti
- **[FFPE]** qPCR-plötur sem eru samhæfar við qPCR-tæki
- Límpétti fyrir 96-brunna plötur með eftirfarandi forskriftum:
 - Afflettanlegt, ljósglært pólýester
 - Hentar fyrir PCR-plötur með kanti
 - Sterkt lím sem þolir margar hitabreytingar frá -40 °C til 110 °C
 - DNasa/RNasa-laust
- Einnota plastvörur sem eru samhæfar við valda magngreiningaraðferð
- Flúrljómandi magnmötunarsett fyrir dsDNA sem er samhæft við valið magnmötunarkerfi:
 - Til að magngreina forauðuguð mögnuð söfn er hægt að nota víðtækan magngreiningarbúnað (broad range quantification kit).
 - Til að magngreina auðgað safn fer svið magngreiningarbúnaðarins eftir því hvaða þreifaraspjald er notað.
- Brotagreiningarbúnaður fyrir safnsflokkun með völdu flokkunarkerfi:

- Til að magngreina forauðuguð mögnuð söfn er hægt að nota víðtækan búnað (broad range kit).
- Til að magngreina auðgað safn fer svið flokkunarbúnaðarins eftir því hvaða þreifaraspjald er notað.
- **[Valfrjálst]** Búnaður til DNA-útdráttar úr frumum og vefjum manna. Hægt er að nota hvaða viðurkennda útdráttaraðferð sem er.

Sýnataka, flutningur og geymsla



VARÚÐ

Meðhöndlið öll sýni eins og þau innihaldi hugsanlega smitbera.

- Þessi prófun er samhæf við erfðaeefni úr frumum og vefjum manna.
- Fyrir hreinsað gDNA sem er fáanlegt til kaups skal ganga úr skugga um að sýnin hafi verið flutt við réttar aðstæður og geymd samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda. Fylgið viðurkenndum verklagsreglum við geymslu og frysti-þíðuskipti á erfðaeefni (gDNA).
- Fyrir heilblóðsýni skal fylgja leiðbeiningum um blóðsöfnun, flutning og geymslu sem eiga við um valda DNA aðferð útdráttar. Hægt er að nota hvaða viðurkennda útdráttaraðferð sem er. Flutningur á heilblóði verður að vera í samræmi við reglugerðir lands, alríkis, fylkis og sveitarfélaga um flutning sjúkdóma.
- Til að draga DNA úr FFPE-vef er hægt að nota hvaða viðurkennda útdráttaraðferð sem er. Fylgið leiðbeiningum og ráðleggingum sem eiga við um valda útdráttaraðferð til að ákvarða eftirfarandi aðferðir:
 - Formalínbinding og paraffíninnfelling í vefjum, til að tryggja bestu gæði útdregins DNA.
 - Geymsla FFPE-sýna.
 - Kröfur um upphafsefni, svo sem fjöldi og þykkt FFPE-hluta. Flestar hreinsunaraðferðir mæla með því að nota nýskornar sneiðar.

Varnaðarorð og varúðarráðstafanir

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit prófefni innihalda hugsanlega hættuleg efni. Líkamstjón getur hlotist af innöndun, inntöku, snertingu við húð og augu. Notið hlífðarbúnað, þar á meðal augnhlíf, hanska og rannsóknarstofuslopp sem hentar miðað við hættu á útsetningu. Meðhöndlið notuð prófefni sem efnaúrgang og fargið þeim í samræmi við gildandi lög og reglugerðir á svæðis-, lands- og sveitarfélagsstigi. Nánari upplýsingar um umhverfisáhrif, heilsu og öryggi má finna í öryggisleiðbeiningum (SDS, safety data sheet) á support.illumina.com/sds.html.
- Tilkynnið tafarlaust öll alvarleg atvik sem tengjast þessari vöru til Illumina og lögbærra yfirvalda aðildarríkjanna þar sem notandinn og sjúklingurinn eru búsettir.
- Meðhöndlið öll blóðsýni eins og þau séu hugsanlega smituð af HIV (human immunodeficiency virus), lífrarbólgu B (hepatitis B virus) og öðrum blóðbörnum sýklum, í samræmi við almennar varúðarráðstafanir.

- Fylgið venjubundnum varúðarráðstöfunum á rannsóknarstofu. Ekki má nota munninn til að draga efni upp í pípettu. Neytið ekki matar, drykkjar eða tóbaks á tilgreindum vinnusvæðum. Notið einnota hanska og rannsóknarstofusloppa þegar sýni og hvarfefni fyrir prófanir eru meðhöndluð. Þvoið hendur vandlega eftir meðhöndlun sýna og prófefna.
- Til að koma í veg fyrir niðurbrot sýna eða prófefna skal ganga úr skugga um að allar gufur af natríumhýpóklóríti frá hreinsun hafi horfið að fullu áður en aðferðin hefst.
- Mengun sýnanna með öðrum PCR vörum/amplíkónum getur valdið ónákvæmum og óáreiðanlegum niðurstöðum. Til að forðast mengun skal nota eftirfarandi bestu starfsvenjur:
 - Notið viðeigandi vinnubrögð og hreinlæti á rannsóknarstofu.
 - Framkvæmið verkflæðisskrefin á tilgreindum for- og eftirmögnunarsvæðum.
 - Geymið notuð prófefni áður en söfn eru hreinsuð á formögnunarsvæði.
 - Aðskiljið prófefni fyrir mögnun frá prófefnum eftir mögnun.
 - Gætið þess að förmögnunar- og eftirmögnunarsvæði séu með sérstakan búnað, svo sem pípettur, pípettuodda, iðublandara og skilvindu.
- Forðist víxlmengun. Notið nýja pípettuodda á milli sýna og á milli þess að skammta prófefni. Notkun síðra odda dregur úr hættu á flutningi amplíkóna og víxlmengun milli sýna.
 - Þegar sýnum eða prófefnablöndum er bætt við eða þær fluttar skal skipta um odd á milli sýna.
 - Þegar vísilyklum er bætt við með fjölrása pípettu skal skipta um odd á milli hverrar raðar eða dálks. Ef einrásarpípetta er notuð skal skipta um odd á milli sýna.
 - Fjarlægið ónotaðar vísilyklaplötur af vinnusvæðinu.
- Notið eftirfarandi bestu starfsvenjur fyrir etanólþvott:
 - Útbúið alltaf nýtt 80% etanól. Etanól getur tekið í sig vatn úr loftinu, sem getur haft áhrif á niðurstöður.
 - Gangið úr skugga um að allt etanól sé fjarlægt af botni brunnanna meðan á þvotti stendur. Leifar af etanóli geta haft áhrif á niðurstöður.
 - Fylgið tilgreindum þurrktíma fyrir segulstandsprep til að tryggja algera uppgufun. Leifar af etanóli geta haft áhrif á framgang síðari efnahvarfa.
- Útbúið alltaf aðalblöndur fyrir notkun og geymið aldrei blönduðu vinnulausnirnar.
- Framgangur Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er ekki tryggður ef ekki er fylgt verklaginu eins og það er útfært í fylgiseðlinum.
- Ekki nota neina greiningaríhluti eftir uppgefna fyrningardagsetningu á merkimiða settsins.
- Ekki skipta um íhluti úr mismunandi gerðum Illumina DNA Prep with Enrichment Dx setta. Settin eru auðkennd á merkimiða settsins.

Athugasemdir við ferli

Tillögur um DNA-inntak

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit aðferðin er samhæf við hágæða, tvíþátta erfðaeefni (gDNA) með inntaki upp á 50–1.000 ng.

Gangið úr skugga um að upphaflega gDNA sýnið innihaldi ekki >1 mM EDTA og sé laust við lífræn mengunarefni, svo sem fenól og etanól. Þessi efni geta truflað merkingarviðbrögðin og leitt til þess að prófunin mistekst.

gDNA inntak ≥ 50 ng

Fyrir gDNA inntak á bilinu 50–1.000 ng er ekki þörf á að magngreina og staðla upphaflega gDNA sýnið.

gDNA inntak <50 ng

Hægt er að nota DNA-inntak upp á 10–50 ng, með eftirfarandi aðlögun:

- Ef notað er 10–49 ng gDNA inntak er mælt með því að magngreina upphaflega gDNA sýnið til að ákvarða fjölda PCR-lotna sem þarf eftir merkinguna. Notið flúrljómunaraðferð til að magngreina tvíþátta gDNA-inntak. Forðist aðferðir sem mæla heildarkjarnsýru, eins og NanoDrop eða aðrar útblámagleypniaðferðir.
- Þessi aðferð staðlar ekki lokaafrakstur forauðgaðs safns á bilinu 10–49 ng gDNA og því er nauðsynlegt að magngreina og jafna söfnin bæði fyrir og eftir auðgun.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit hefur verið einkennt og staðfest fyrir DNA-inntök á bilinu 50–1.000 ng. Ekki er hægt að tryggja jafngild afköst vörunnar fyrir gDNA inntak <50 ng.

Tillögur um blóð inntak

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er samhæft við gDNA sem er dregið úr útlægu heilblóði. Hægt er að nota hvaða viðurkennda útdráttaraðferð sem er. Fyrir gDNA sem einangrað er úr heilblóði þarf upphaflega magngreiningu á inntaks-DNA og ferlið Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit framleiðir staðlaða, forauðgaða safnsafrakstra.

Eftirfarandi þættir geta haft neikvæð áhrif á magn DNA sem fæst úr heilblóðsýnum og þar með eðlilegt ástand safnsins:

- Aldur blóðsýnis
- Geymsluskilyrði
- Undirliggjandi sjúkdómar sem hafa áhrif á fjölda hvítra blóðkorna

Tillögur um inntak FFPE vefjasýna

Notið eftirfarandi gæðaviðmið fyrir FFPE DNA til að ákvarða viðeigandi inntak fyrir farsælan undirbúning safns:

- Fyrir FFPE sýni með ΔCq gildi ≤ 5 er ráðlagt DNA inntak 50–1.000 ng.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx er ekki mælt með fyrir léleg FFPE sýni með $\Delta Cq > 5$. Notkun sýna með $\Delta Cq > 5$ er möguleg, en gæti aukið líkur á að undirbúningur safns mistakist eða dregið úr afköstum prófsins.

Einangrun úr FFPE-sýnum

Notið aðferð til að einangra kjarnsýrur sem gefur mikla endurheimt, lágmarkar sýnisnotkun og varðveitir heilleika sýnisins. Þú getur notað hvaða viðurkennda aðferð sem er til útdráttar DNA úr FFPE-sýnum. Fyrir gDNA sem dregið er úr FFPE-vef þarf upphaflega magngreiningu á inntaks-DNA, en hún Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kitskilur ekki staðlaðri forauðgaðri safnframleiðslu.

FFPE DNA hæfniviðmið

gDNA sem dregið er úr FFPE-vef skal vera hæft fyrir notkun. Til að hámarka afköst skal meta gæði DNA-sýna með því að nota viðurkennda útdráttaraðferð til að greina DNA sem dregið er úr FFPE-sýnum. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit aðferðin er samhæf við FFPE DNA sýni með ΔCq gildi ≤ 5 . Ekki er mælt með Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit fyrir léleg FFPE-sýni með $\Delta Cq > 5$. Notkun sýna með $\Delta Cq > 5$ er möguleg, en gæti aukið líkur á að undirbúningur safns mistakist eða dregið úr afköstum prófsins.

[Valfrjálst] FFPE-viðmiðunarsýni

Notið einkennt greiningarefni eins og Horizon HD799 (DNA) sem jákvæðan samanburð þegar aðferðin er framkvæmd. Einnig er hægt að nota hæf FFPE-efni úr frumulínufengnum ósamkynja græðlingum sem viðmiðunarsýni. Notið flúrljómunaraðferð til að magngreina viðmiðunarefni fyrir notkun.

ATHUGIÐ Keyrsla á jákvæðu samanburðarsýni eða stýring án sniðmáts eyðir prófefnum og dregur úr heildarfjölda óþekktra sýna sem hægt er að vinna úr.

Ráðleggingar um sýnisinntak

Ráðleggingar um sýnisinntak fyrir Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit eru teknar saman í eftirfarandi töflu.

Tafla 1 Ráðleggingar um sýnisinntak

Gerð sýnisinntaks	Magn sýnisinntaks	Magnbundin greining á DNA-inntaki nauðsynleg	Nauðsynleg gæði DNA-inntaks	Staðlaður afrakstur forauðgaðs safns
gDNA	10–49 ng	Já	260/280 hlutfallið er 1,8–2,0	Nei
gDNA	50–1.000 ng	Nei	260/280 hlutfallið er 1,8–2,0	Já
gDNA úr blóði	50–1.000 ng	Nei	260/280 hlutfallið er 1,8–2,0	Já
gDNA úr FFPE	50–1.000 ng	Já	ΔCq gildi ≤ 5	Nei

Ráðlagðar PCR-lotur fyrir eBLTS PCR-forrit eru aðlagðar út frá þéttni og gæðum sýnisinntaks. Fyrir nánari upplýsingar, sjá [Magna upp merkt DNA á síðu 26](#).

Ráð og aðferðir

Að forðast víxlmengun

- Þegar sýnum er bætt við eða þau flutt skal skipta um odd á milli *hvers sýnis*.
- Þegar vísislyklum er bætt við með fjölrása pípettu skal skipta um odd á milli *hverrar raðar* eða *hvers dálks*. Ef einrásarpípetta er notuð skal skipta um odd á milli hvers sýnis.

Að innsigla plötuna

- Innsiglið alltaf 96 brunna plötuna með nýju límpétti með gúmmírúllu til að hylja hana áður en eftirfarandi skref í aðferðinni eru framkvæmd:
 - Skref við að hrista
 - Skref við ræktun. Ef platan er ekki innsigluð getur það leitt til uppgufunar meðan á ræktun stendur.
 - Skref við að skilvinda
 - Skref við blöndun
- Gangið úr skugga um að brúnir og brunnar séu alveg innsigluð til að draga úr hættu á víxlmengun og uppgufun.
 - Ef vökví eða þétting sést á innsigli eða hliðum plötubrunnanna skal skilvinda eftir þörfum áður en innsiglið er opnað.
- Setjið plötuna á slétt yfirborð áður en innsiglið er fjarlæggt hægt.

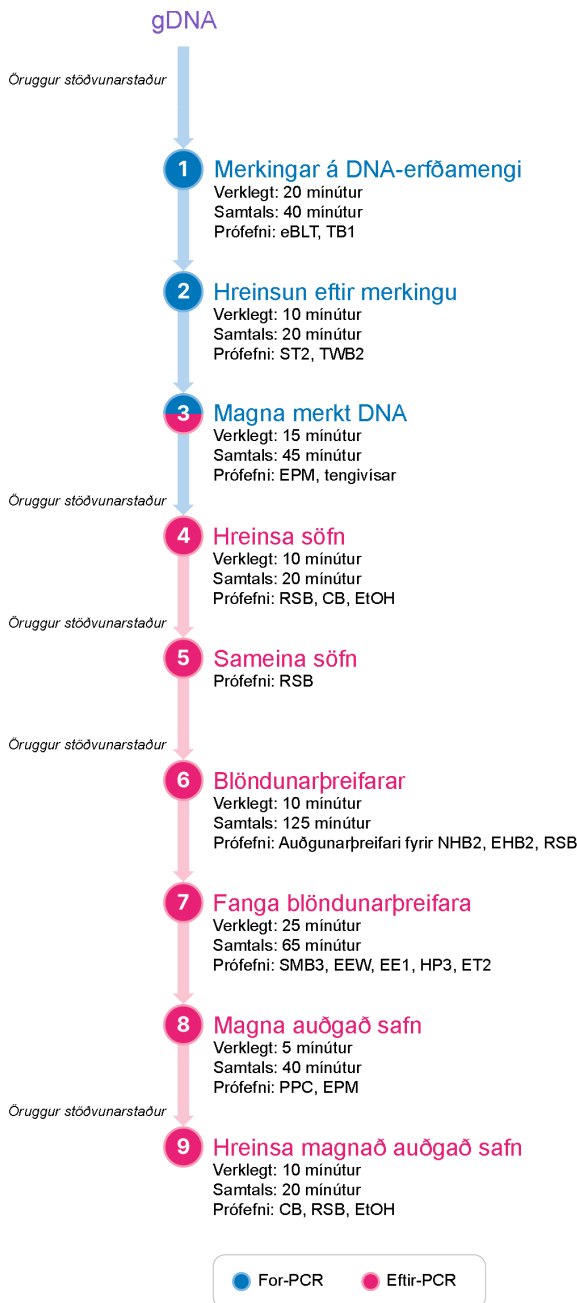
Meðhöndlun Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Geymið eBLTS stofnrörið upprétt í kæli þannig að perlurnar séu alltaf á kafi í jafnalausninni.
- Rétt fyrir notkun skal iðublanda eBLTS stofnrörið vandlega þar til perlurnar dreifast aftur. Til að forðast að perlurnar setjist aftur, er ekki mælt með að skilvinda áður en pípettað er.
- Ef perlur festast við hlið eða ofan á 96-holu plötu, skilvindið við $280 \times g$ í 3 sekúndur og pípettið síðan til ná fram dreifu.
- Þegar þvegið er eBLTS:
 - Notið viðeigandi segulstand fyrir plötuna.
 - Haldið plötunni á segulstandinum þar til leiðbeiningarnar mæla fyrir um að hana skuli fjarlægja.
 - Ef perlur eru sogaðar inn í pípettuodda skal setja þær aftur á plötuna á segulstandinum og bíða þar til vökvinn er tær (2 mínútur).

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Vinnuflæði

Eftirfarandi skýringarmynd sýnir Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vinnuflæði. Öruggir stöðvunarstaðir eru merktir á milli skrefa. Tímaáætlanir eru byggðar á vinnslu 12 sýna við 12–þátta auðgun.



Leiðbeiningar um notkun

Þessi kafli lýsir Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit aðferðinni.

- Farið yfir fyrirhugað heildarvinnuflæði raðgreiningar, frá sýni til greiningar, til að tryggja samhæfni vara og tilraunabreyta.
- Áður en haldið er áfram skal staðfesta innihald settsins og vera viss um að nauðsynlegir hlutir, búnaður og efni séu til staðar.
 - Bíótínýleraðir þreifarar frá þriðja aðila verða að uppfylla sérstakar kröfur. Sjá [Enrichment Probe Panel Requirements á síðu 9](#) til að ganga úr skugga um að þreifarar frá þriðja aðila uppfylli kröfurnar.
- Fylgið verkferlinu í þeirri röð sem sýnd er og notið þau rúmmál og ræktunarskilyrði sem tilgreind eru.
- Haldið strax áfram í næsta skref, nema öruggur stöðvunarstaður sé tilgreindur í aðferðarlýsingunni.
- Þegar aðalblanda er búin til er umframmagn innifalið í gefnu rúmmáli.
- Gætið þess að nota viðeigandi segulstand fyrir plötugerðina.

Undirbúningur fyrir sameiningu

Þetta skref er nauðsynlegt til að tryggja að raðgreining auðgaðra safna takist vel. Sameining safna getur átt sér stað bæði fyrir auðgun og fyrir raðgreiningu.

Fyrir auðgun—Einstök vísiflokkuð, mögnuð söfn eru sameinuð til auðgunar með völdu þreifaraspjaldi. Þetta býr til fléttað safn af auðguðum söfnum. Fyrir FFPE-sýnisinntak hefur vinnsla verið prófuð og er eingöngu ráðlögð fyrir 1-þátta auðgunarhvorf. Fyrir hágæða gDNA hefur 12-þátta verið prófað, en 2-þátta til 11-þátta eru möguleg.

Fyrir raðgreiningu—1-þátta auðguð söfn og/eða fléttað auðguð söfn eru sameinuð fyrir raðgreiningu. Fjöldi auðgaðra safna sem hægt er að raðgreina fer eftir marklestrardýpt hvers sýnis í raðgreiningarkerfinu.

Einkvæm tvöföld vísisflokkun

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit notar einkvæma tvöfalda vísa.

- Tvívísuð söfn bæta við vísi 1 (i7) og vísi 2 (i5) röðum til að mynda sérmerkt DNA-söfn.
- UD vísar hafa aðskildar, ótengdar vísisraðir fyrir i7 og i5 vísislestur. Vísar eru 10 basar að lengd.

Að velja vísislykla með fjölbreyttum raðgreiningum fyrir sameinuð söfn hámarkar litajafnvægi fyrir vel heppnaða raðgreiningu og gagnagreiningu. Þáttasameiningar sem eru ≥ 10 -þátta eru í eðli sínu litajafnvægar, þannig að nota má hvaða samsetningu vísislykils sem er. Á meðan raðgreiningin stendur yfir býður DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager einingin upp á valkosti fyrir litajafnvægi í vísissamsetningum og lætur vita ef fjölbreytni í völdum vísissamsetningum er ekki nægileg.

Fyrir upplýsingar um Illumina UD vísistengiraðir og plötuskipulag, sjá [Viðauki: Illumina UD Indexes Adapter Sequences. á síðu 59](#)

Auðgunarþéttleikar sem eru studdir

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit prófefni eru stillt og prófuð við 1-þátta og 12-þátta auðgunarsamsetningu. Þó að aðrar auðgunarsamsetningar séu mögulegar, þá krefjast sumar samsetningar viðbótar undirbúnings forauðgaðs safns og prófefna fyrir auðgunarþreifaraspjald.

Til að fá viðeigandi auðgunarafrakstur fyrir óstaðlaðar samsetningar gæti þurft frekari bestun. Bestu niðurstöður eru ekki tryggðar.

- **Enrichment plexity** (Auðgunarsamsetning)—Fjöldi forauðgaðra safna (1–12 sem eru sameinuð í einum auðgunarviðbrögðum fyrir blöndun við auðgunarþreifaraspjöld. Til dæmis myndast 12-þætt auðgunarsafn þegar 12-þætt forauðguð söfn eru sameinuð.
- **Enrichment reaction** (Auðgunarhvarf)—Fjöldi einstakra auðgunarhvarfa, óháð fjölda forauðgaðra safna sem eru sameinuð í hverju hvarfi. Til dæmis getur eitt auðgunarhvarf útbúið 1-þátta eða 12-þátta auðgunarsafn.

Til að reikna út heildarfjölda eftir-auðgaðra safna skal margfalda fjölda auðgunarsamsetninga á hvert hvarf með heildarfjölda auðgunarhvarfa. Til dæmis myndar eitt auðgunarhvarf á 12-þátta auðgunarsafni safn af 12 eftirá auðguðum söfnum.

Þegar forauðguð söfn eru sameinuð styðja Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit prófefni eftirfarandi auðgunarhvörf og samsetningar.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Prófefni	Auðgunarhvarf	Samsetning auðgunar
16-sýna sett	16 hvörf	1-þáttur
96 sýna sett	8 hvörf	12-þættir

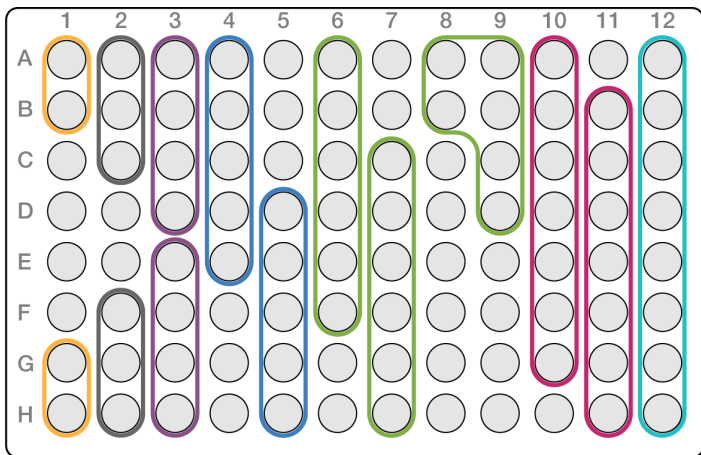
Sameiningaraðferðir fyrir tvo til átta þætti

Eftirfarandi tafla sýnir visilykla (brunna) sem hægt er að sameina í 2–8þætti, en litakóðaða myndin sýnir hverja samsetningu.

Sameinið hvaða samsetningu ≥ 2 sem er efst eða neðst í dálki. Ekki sameina í röð.

Samsetning	Samsetningar	Litur í mynd
2	Fyrstu tveir eða síðustu tveir brunnarnir í dálki: • A og B • G og H Raðir C–F eru ekki notaðar.	Appelsínugult
3	Fyrstu þrír eða síðustu þrír brunnarnir í dálki: • A–C • F–H Raðir D og E eru ekki notaðar.	Grátt

Samsetning	Samsetningar	Litur í mynd
4	Fyrstu fjórir eða síðustu fjórir brunnarnir í dálki: - A–D - E–H	Fjólublátt
5	Fyrstu fimm eða síðustu fimm brunnarnir í dálki: - A–E - D–H	Blátt
6	[Valkostur 1] Fyrstu sex eða síðustu sex brunnarnir í dálki: - A–F - C–H [Valkostur 2] Fyrstu tveir brunnarnir (A og B) eða síðustu tveir brunnarnir (G og H) í einum dálki og hvaða fjórir brunnar sem er í aðliggjandi dálki.	Grænt
7	Fyrstu sjö eða síðustu sjö brunnarnir í dálki: - A–G - B–H	Bleikur
8	Allur dálkurinn.	Blágrænt

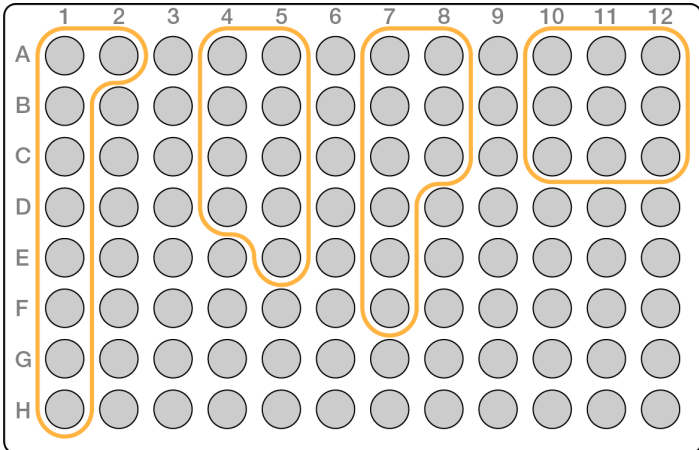


Níu-pátta sameiningaraðferðir

Notið vísilykla úr hvaða brunnum sem er sem hámarka litajafnvægi í raðgreiningarkeyrslu, til dæmis:

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

Eftirfarandi mynd sýnir öll fjögur dæmin.



Merkingar á DNA-erfðamengi

Þetta skref notar Enrichment BLT Small (eBLTS) til að merkja DNA, sem er ferli sem sundrar og merkir DNA með tengiröðum.

Einnota vörur

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (gult lok)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Núkleasalaust vatn
- 96-brunna PCR-plata
- Límpétti
- 1,7 ml örskiljunarrör
- 8-röra ræma
- Pípettuoddar
 - 200 µl fjölrása pípettur



VIÐVÖRUN

Þessi hvarfefni innihalda hugsanlega hættuleg efni. Líkamstjón getur hlotist af innöndun, neyslu, snertingu við húð og augu. Notið hlífðarbúnað, þar á meðal augnhlífir, hanska og rannsóknarstofuslopp sem hentar miðað við hættu á útsetningu. Meðhöndlið notuð prófefni sem efnaúrgang og fargið þeim í samræmi við gildandi lög og reglugerðar á svæðis-, lands- og sveitarfélagsstigi. Fyrir upplýsingar um umhverfisáhrif, heilsu og öryggi má finna í öryggisleiðbeiningum (SDS, safety data sheet) á support.illumina.com/sds.html.

Um prófefni

- eBLTS verður að geyma 2 °C til 8 °C. Notið ekki eBLTS sem hefur verið geymt við lægri hita en 2 °C.

- Ekki skilvinda eBLTS.

Undirbúningur

1. Undirbúið eftirfarandi einnota vörur:

Vara	Geymsla	Leiðbeiningar
eBLTS (gulbrúnt lok)	2 °C til 8 °C	Látið ná stofuhita. lðublandið rétt fyrir notkun. Ekki skal skilvinda áður en pípettað er.
TB1	-25 °C til -15 °C	Látið ná stofuhita. lðublandið.

2. lðublandið eða pípettið DNA og skiljið síðan stutta stund í skilvindu.

3. Vistið eftirfarandi TAG-forrit á lotuhitaranum:

- Veljið forhitunarvalkostinn fyrir lokið og stillið á 100 °C
- Stillið hvarfmagnið á 50 µl
- 55 °C í 5 mínútur
- Haldið við 10 °C

Ferli

1. Bætið 2–30 µl af DNA í hvern brunn á 96 brunna PCR plötu þannig að heildarinntaksmagnið sé 50–1.000 ng. Ef DNA-rúmmál er < 30 µl, bætið nukleasa-fríu vatni út í DNA sýnin til að heildarrúmmálið verði 30 µl.
2. lðublandið eBLTS vandlega þar til perlurnar dreifast alveg.
3. Blandið eftirfarandi rúmmáli saman í rör til að útbúa Tagmentation Master Mix. Margfaldið hvert rúmmál með fjölda sýna sem verið er að vinna úr.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)
 Umframmagn prófefnis er innifalið í rúmmálinu.
4. Pípettið Tagmentation Master Mix vandlega til að blanda.
5. Skiptið Tagmentation Master Mix rúmmálinu jafnt í lengju með 8 sýnaglösum.
6. Með því að nota 200 µl fjölrása pípettu skal flytja 20 µl af Tagmentation Master Mix í hvern brunn á PCR - plötunni sem inniheldur sýni. Notið nýja enda fyrir hvern sýnisdálk eða röð.
7. Fargið 8 röra röðinni eftir að Tagmentation Master Mix hefur sett í.
8. Notið 200 µl fjölrása pípettu, stillta á 40 µl, og pípettið hvert sýni 10 sinnum til að blanda. Notið nýja enda fyrir hvern sýnisdálk.

Einnig er hægt að innsigla PCR -plötuna og hrista við 1.600 snúninga á mínútu í 1 mínútu.

- Innsiglið plötuna og setjið hana síðan á forforritaða lotuhitarann og keyrið TAG-forritið.
- Bíðið þar til TAG-forritið hefur náð 10 °C stöðugum hitaog fjarlægið síðan plötuna strax.
- Látið 96-brunna PCR -plötunnar standa við stofuhita í 2 mínútur og haldið síðan áfram í næsta skref.

Hreinsun eftir merkingu

Þetta skref þvæir DNA-ið sem er merkt með lykli á eBLTS fyrir PCR-mögnun.

Einnota vörur

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96-brunna segulstandur fyrir PCR-plötu
- Límpétti
- 8-röra ræma
- Pípettuoddar
 - 20 µl fjölrása pípettur
 - 200 µl fjölrása pípettur
- Undirbúningur fyrir síðari aðgerð:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Vísislyklaplata

Um prófefni

- Gætið þess að nota viðeigandi segulstand fyrir plötuna. Notkun MIDI-plötu segulstands fyrir PCR-plötu gæti komið í veg fyrir að TWB2 festist við perlur.
- Pípettið TWB2 hægt til að lágmarka froðumyndun og forðast ranga rúmmálsupptöku og ófullnægjandi blöndun.

Undirbúningur

- Undirbúið eftirfarandi einnota vörur:

Vara	Geymsla	Leiðbeiningar
EPM	-25 °C til -15 °C	Þíðið á ís í eina klukkustund. Hvolfið til að blanda og skiljið síðan stuttlega með skilvindu.
ST2	15 °C til 30 °C	Ef botnfall sést skal hita við 37 °C í 10 mínútur og síðan iðublanda þar til botnfallið er uppleyst. Notið við stofuhita.
TWB2	15 °C til 30 °C	Notið við stofuhita.
Vísislyklaplata	-25 °C til -15 °C	Þíðið við stofuhita í 30 mínútur.

Ferli

1. Bætið við 10 µl ST2 við hvert merkingarhvarf. Ef þú notar fjölrása pípettu, pípettið ST2 í 8 röra ræmu og flytjið síðan viðeigandi rúmmál yfir á PCR-plötuna. Notið nýja enda fyrir hvern sýnisdálk eða röð.
2. rNotið 200 µl pípettu stillta á 50 µl og pípettið hægt og rólega hvern brunn 10 sinnum til að perlurnar dreifist aftur.
Einnig er hægt að innsigla plötuna og hrista við 1.600 snúninga á mínútu í 1 mínútu. Endurtakið eftir þörfum.
3. Innsiglið plötuna og skiljið síðan með skilvindu við 280 × g í 10 sekúndur.
4. Inkúberið við stofuhita í 5 mínútur.
5. Setjið á segulstand fyrir PCR-plötu og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (3 mínútur).
6. [**≤48 sýni**] Þvoið þrisvar sinnum eins og hér segir.
 - a. Notið 200 µl fjölrása pípettu stillta á 60 µl, fjarlægið og fargið ofanvökva án þess að raska perlukorninu.
 - b. Fjarlægið af segulstandinum.
 - c. Strax á eftir skal bæta 100 µl TWB2 hægt og rólega beint á perlurnar.
 - d. Pípettið hægt þar til perlurnar eru fullkomlega dreifðar aftur. Einnig er hægt að innsigla plötuna og hrista við 1.600 snúninga á mínútu í 1 mínútu.
 - e. Ef skvettur eiga sér stað, spinnið niður við 280 × g í 10 sekúndur.
 - f. Setjið á segulstand fyrir PCR-plötu og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (3 mínútur).
Skiljið plötuna eftir á segulstandinum og TWB2 í brunnum til að koma í veg fyrir ofþornun við þriðja þvottinn. Fjarlægið og fargið ofanvökvanum eftir að PCR Master Mix hefur verið útbúið.
 - g. Notið 200 µl fjölrása pípettu stillta á 100 µl, fjarlægið og fargið ofanvökva.
 - h. Endurtakið skref b–g tvisvar sinnum þar til samtals hafa farið fram þrír þvottar.
7. [**>48 sýni**] Þvoið þrisvar sinnum eins og hér segir.
 - a. Framkvæmið skref b og c í 1-dálka til 2-dálka skrefum þar til allir dálkar hafa verið unnir til að koma í veg fyrir ofþornun.
 - b. Notið 200 µl fjölrása pípettu stillta á 60 µl, fjarlægið og fargið ofanvökva.
 - c. Fjarlægið af segulstandinum.
 - d. Strax á eftir skal bæta 100 µl TWB2 hægt og rólega beint á perlurnar.
 - e. Pípettið hægt þar til perlurnar eru að fullu dreifðar aftur. Einnig er hægt að innsigla plötuna og hrista við 1.600 snúninga á mínútu í 1 mínútu.
 - f. Ef skvettur eiga sér stað, spinnið niður við 280 × g í 10 sekúndur.
 - g. Setjið á segulstand fyrir PCR-plötu og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (3 mínútur).
Skiljið plötuna eftir á segulstandinum og TWB2 í brunnum til að koma í veg fyrir ofþornun við þriðja þvottinn. Fjarlægið og fargið ofanvökvanum eftir að PCR Master Mix hefur verið útbúið.
 - h. Notið 200 µl fjölrása pípettu stillta á 100 µl, fjarlægið og fargið ofanvökva.
 - i. Takið plötuna af segulstandinum og bætið 100 µl TWB2 hægt og rólega beint á perlurnar.
 - j. Endurtakið skref h og i í 1- eða 2-dálka skrefum þar til allir dálkar hafa verið unnir.

- k. Endurtakið skref e–h tvisvar sinnum fyrir þrjá þvotta alls.
8. Geymið á segulstandinum þar til skref 4 í *Procedure* kaflanum í *Amplify Tagmented DNA*. TWB2 verður eftir í brunnunum til að koma í veg fyrir að perlurnar ofþorni.

Magna upp merkt DNA

Þetta skref magnar merkt DNA með því að nota PCR-forrit með takmarkaðri lotu. PCR-skrefið bætir við vísi 1 (i7) vísilyklum, vísi 2 (i5) vísilyklum og röðum sem eru nauðsynlegar fyrir myndun raðgreiningarklasa.

Einnota vörur

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Vísislyklaplata
- 96 brunna PCR-plata
- Núkleasalaust vatn
- Límpétti
- 1,5 ml örskiljunarrör
- Pípettuoddar
 - 20 µl fjölrása pípettur
 - 200 µl fjölrása pípettur

Um prófefni

- Vísilykilspötur
 - Brunnur getur innihaldið >10 µl af vísilyklum.
 - Ekki bæta sýnum við vísiplötuna með lykilvísunum.
 - Hver brunnur á vísislyklaplötunni er einnota.

Undirbúningur

1. Undirbúið eftirfarandi einnota vörur:

Vara	Geymsla	Leiðbeiningar
EPM	-25 °C til -15 °C	Þíðið við 4 °C á ís í eina klukkustund. Hvolfið til að blanda og skiljið síðan stuttlega með skilvindu.
Vísislyklaplata	-25 °C til -15 °C	Þíðið við stofuhita í 30 mínútur.

2. Vistið eftirfarandi eBLTS PCR-forrit á lotuhitara með því að nota viðeigandi fjölda PCR-lotna eins og tilgreint er í töflunni hér fyrir neðan.

- Veljið forhitunarvalkostinn fyrir lokið og stillið á 100 °C
- Stillið hvarfmagnið á 50 µl
- 72 °C í 3 mínútur
- 98 °C í 3 mínútur
- X lotur af:
 - 98 °C í 20 sekúndur
 - 60 °C í 30 sekúndur
 - 72 °C í 1 mínútu
- 72 °C í 3 mínútur
- Haldið við 10 °C

Heildarkeyrslutími er ~38 mínútur fyrir 9 lotur og ~46 mínútur fyrir 12 lotur.

Dæmi um inntaksgerð	Fjöldi PCR lotna(X)
10–49 ng gDNA	12
50–1.000 ng gDNA	9
50–1.000 ng gDNA dregið úr FFPE	12
gDNA dregið úr blóði	9

Ferli

1. Sameinið eftirfarandi til að undirbúa PCR. Master Mix Margfaldið hvert rúmmál með fjölda sýna sem verið er að vinna úr.
 - EPM (23 µl)
 - Núkleasalaust vatn (23 µl)
 Umframmagn prófefnis er innifalið í rúmmálinu.
2. Pípettið PCR Master Mix 10 sinnum til að blanda og skiljið síðan stuttlega með skilvindu.
3. Með plötuna á segulstandinum, notið 200 µl fjölrásapípettu til að fjarlægja og farga TWB2. Froða sem situr eftir á veggjum brunnsins hefur ekki neikvæð áhrif á safnið.
4. Fjarlægið af segulstandinum.
5. Bætið strax 40 µl af PCR Master Mix beint ofan á perlurnar í hverjum brunni.
6. Pípettið strax til að blanda þar til perlurnar dreifast að fullu aftur. Einnig er hægt að innsigla plötuna og hrista við 1.600 snúninga á mínútu í 1 mínútu.

7. Innsiglið plötuna og skiljið síðan með skilvindu við 280 × g í 10 sekúndur.
8. Skiljið vísilyklaplötuna í skilvindu við 1.000 × g í 1 mínútu.
9. Undirbúið vísilyklaplötuna.
 - [< [96 sýni] Stingið nýjum pípettuoddi í gegnum álfilmupéttinguna á vísilyklaplötunni fyrir hvern brunn, aðeins fyrir þann fjölda sýna sem verið er að vinna úr.
 - [96 sýni] Setjið nýja hálf-jaðraða PCR-plötu yfir vísilyklaplötuna og þrýstið fast niður til að gata álfilmupéttinguna. Fargið PCR-plötunni sem notuð var til að stinga gat á álpéttinguna.
10. Með því að nota nýjan pípettuodd, bætið 10 µl af fyrirfram pöruðum vísilyklum í hvern brunn.
11. Notið pípettu stillta á 40 µl og pípettið 10 sinnum til að blanda. Einnig er hægt að innsigla plötuna og hrista við 1.600 snúninga á mínútu í 1 mínútu.
12. Innsiglið plötuna og skiljið síðan með skilvindu við 280 × g í 10 sekúndur.
13. Setjið á lotuhitarann og keyrið eBLTS PCR-forrit.

ÖRUGGUR STÖÐVUNARSTAÐUR

Ef stöðvar er, skal geyma við -25 °C til -15 °C í allt að 30 daga.

Hreinsa söfn

Í þessu skrefi er tvíhliðaperluhreinsunaraðferð notuð til að hreinsa mögnuðu söfnin.

Einnota vörur

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Nýundirbúið 80% etanól (EtOH)
- 96-brunna 0,8 ml pólýprópýlen djúpbrunnsgeymsluplata (MIDI-plata)
- 96-brunna PCR-plata
- Segulstandur fyrir MIDI-plötu
- Segulstandur fyrir PCR-plötu
- 1,5 ml örskiljunarrör
- Núkleasalaust vatn

Um prófefni

- Cleanup Beads
 - Iðublandið fyrir hverja notkun.
 - Iðublandið oft til að tryggja að perlurnar dreifist jafnt.
 - Sogið og dreifið hægt vegna seigju lausnarinnar.

Undirbúningur

1. Undirbúið eftirfarandi einnota vörur:

Vara	Geymsla	Leiðbeiningar
CB	Stofuhiti	Iðublandið og hvolfið til að blanda þar til liturinn á vökvanum er einsleitur.
RSB	2 °C til 8 °C	Þíðið við stofuhita í 30 mínútur. Iðublandið.

Ferli

1. Hristið 96 brinna PCR-plötuna við 1.800 snúninga á mínútu í 1 mínútu og skilvindið síðan stuttlega.
2. Setjið á segulstand fyrir PCR-plötu og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (1 mínúta).
3. Iðublandið CB 3 sinnum í 10 sekúndur og snúið síðan við nokkrum sinnum til að fá fram dreifu.
4. Fyrir hágæða gDNA, skal gera eftirfarandi.
 - a. Bætið 77 µl af nukleasa-fríu vatni í hvern brunn á nýrri MIDI-plötu.
 - b. Bætið 88 µl CB í hvern brunn á nýrri MIDI plötu.
 - c. Færið 45 µl af ofanvökva úr hverjum brunni á PCR-plötunni yfir á samsvarandi brunn MIDI-plötunnar.
 - d. Fargið PCR-plötunni.
 - e. Pípettið hvern brunn 10 sinnum til að blanda. Einnig er hægt að innsigla plötuna og hrista við 1.800 snúninga á mínútu í 1 mínútu.
 - f. Innsiglið plötuna og inkúberið við stofuhita í 5 mínútur.
 - g. Athugið hvort loftbólur séu til staðar. Ef það sést, snúið niður í skilvindu.
 - h. Setjið á segulstand fyrir MIDI-plötu og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (5 mínútur).
 - i. Meðan á inkúberingu stendur skal iðublanda vandlega CB og bæta síðan 20 µl í hvern brunn á *nýrri* MIDI-plötu.
 - j. Færið 200 µl af ofanvökva úr hverjum brunni á MIDI-plötunni yfir á samsvarandi brunn nýrrar MIDI-plötu (sem inniheldur 20 µl CB).
 - k. Fargið fyrstu MIDI-plötunni.
 - l. Pípettið hvern brunn á nýju MIDI-plötunni 10 sinnum til að blanda. Einnig er hægt að innsigla plötuna og hrista við 1.800 snúninga á mínútu í 1 mínútu.
5. Fyrir útdregið FFPE, gerið eftirfarandi.
 - a. Bætið 81 µl CB í hvern brunn á nýrri MIDI plötu.
 - b. Færið 45 µl af ofanvökva úr hverjum brunni á PCR-plötunni yfir á samsvarandi brunn MIDI-plötunnar.
 - c. Fargið PCR-plötunni.
 - d. Pípettið hvern brunn 10 sinnum til að blanda. Einnig er hægt að innsigla plötuna og hrista við 1.800 snúninga á mínútu í 1 mínútu.
6. Innkúberið við stofuhita í 5 mínútur.
7. Athugið hvort loftbólur séu til staðar. Ef það sést, snúið niður í skilvindu.

8. Setjið á segulstand fyrir MIDI-plötu og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (5 mínútur).
9. Fjarlægið og fargið ofanvökvanum án þess að raska perlunum.
10. Þvoið perlurnar á eftirfarandi hátt.
 - a. Með plötuna á segulstandinum skal bæta við 200 µl af fersku 80% EtOH án þess að blanda.
 - b. Inkúberið í 30 sekúndur.
 - c. Fjarlægið og fargið ofanvökvanum án þess að raska perlunum.
11. Þvoið perlurnar **aftur**.
12. Loftþurrkið á segulstandinum í 5 mínútur.
13. Á meðan loftþurrkun stendur, notið 20 µl pípettu til að fjarlægja og farga afgangs EtOH.
14. Fjarlægið af segulstandinum.
15. Bætið 17 µl af RSB út í perlurnar.
16. Innsiglið plötuna og hristið við 1.800 snúninga á mínútu í 2 mínútur.
17. Inkúberið við stofuhita í 2 mínútur.
18. Athugið hvort loftbólur séu til staðar. Ef það sést, snúið niður í skilvindu.
19. Setjið á segulstand fyrir MIDI-plötu og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (2 mínútur).
20. Flytjið 15 µl af ofanvökva yfir á nýja 96-brunna PCR -plötu.

ÖRUGGUR STÖÐVUNARSTAÐUR

Ef verið er að stoppa skal innsigla plötuna og geyma hana við -25 °C til -15 °C í allt að 30 daga.

Sameina forauðguð söfn

Þetta skref sameinar DNA-söfn með einkvæmum vísum í eitt safn með allt að 12 söfnum.

Sameiningaraðferð.

Sameina má eftir rúmmáli eða massa. Notið eftirfarandi töflu til að ákvarða viðeigandi aðferð fyrir inntakið.

Tafla 2 Ráðlagðar aðferðir við sameiningu

Sýnisinntak	Sameiningaraðferð
10–49 ng gDNA	Massi
50–1.000 ng gDNA	Rúmmál
gDNA dregið úr FFPE	Massi
gDNA dregið úr blóði	Rúmmál

- Einþátta auðgun krefst þess ekki að forauðguð söfn séu sameinið. Hins vegar gæti verið nauðsynlegt að bæta við RSB.
- Eftir magngreiningu á forauðguðu safni er hægt að sameina allar gerðir inntaks eftir massa til að ná sem bestu jafnvægi vísins.
- Lokaafrakstur forauðgaðra safna, sem myndast í aðskildum tilraunaundirbúningi, getur verið breytilegur. Því er mælt með að blanda sýnum saman eftir massa til að ná sem bestu jafnvægi í vísun.
- Notið 1þátta auðgun í eftirfarandi tilfellum.
 - 10–49 ng gDNA
 - 50–1.000 ng gDNA dregið úr FFPE
 - Lág tíðnigreining minnihlutasamsæta við köllun á líkamstilbrigðum.

Sameining eftir massa

Í eftirfarandi tilvikum skal magngreina söfnin til að nota DNA-massa fyrir hvert safn fyrir auðgun sem tilgreind er í [Sameina forauðguð söfn með jafnri þéttni á síðu 32](#).

- 10–49 ng gDNA sýnisinntak
- 50–1.000 ng gDNA dregið úr FFPE sýnisúttaki
- Lág tíðnigreining minnihlutasamsæta við greiningu á líkamstilbrigðum
- gDNA dregið úr blóði til að tryggja sem besta jafnvægi vísanna

Magnmæla forauðguð söfn

- Keyrið 1 µl af forauðguðum söfnum með því að nota þá flúrljómunar-magngreiningaraðferð sem að eigin vali sem notar dsDNA innskotsefni.
 - Fyrir 50–1.000 ng af hágæða gDNA má búast við ≥ 500 ng afrakstri forauðgaðs safns.
 - Fyrir 50–1.000 ng af gDNA sem einangrað er úr FFPE má búast við 500–6.000 ng afrakstri forauðgaðs safns, allt eftir gæðum upphafssýnisins.

ATHUGIÐ Fyrir magngreiningaraðferðir með mismunandi skekkjum skal hæfnigreina magngreiningaraðferðina fyrir þetta verkflæði. Þéttiniðurstöður geta verið mismunandi eftir því hvaða aðferð er notuð.

Sameina forauðguð söfn með jafnri þéttni

Notið eftirfarandi töflu til að ákvarða þann DNA-massa sem þarf til auðgunar fyrir hvert safn, miðað við sýnisgerð og samsetningu auðgunar. Besta mögulega auðgun og afköst prófsins eru ekki tryggð þegar notuð eru lægri afköst forauðgaðs safns en mælt er með.

Heildarmassi DNA í auðgunarhvörfum ætti ekki að fara yfir 6.000 ng.

Sýnisinntak	Samsetning auðgunar	DNA-massi á hvert safn (ng)	Heildar DNA-massi safns (ng)
Hágæða gDNA	12	250–500	3.000–6.000
gDNA dregið úr FFPE	1	200	200

- Skráið vísa fyrir söfnin sem á að sameina í þessu skrefi.
- Reiknið út, út frá þéttni hvers safns, það rúmmál sem þarf að bæta við auðgunarhvörfin til að ná tilskildum DNA massa.
 - Hágæða gDNA Reiknið út rúmmál safnsins sem þarf fyrir 250–500 ng inntak.
 - gDNA dregið úr FFPE Reiknið út rúmmál safnsins sem þarf fyrir 200 ng inntak.
- Bætið útreiknuðu rúmmáli fyrir hvert safn í sama brunninn á PCR plötunni.
- Ef notað er hágæða gDNA skal framkvæma eitt af eftirfarandi byggt á heildarrúmmáli sameinuðu forauðguðu safnanna:
 - Ef rúmmál forauðgaðs safns = 30 µl, haldið þá áfram með [Blöndunarþreifarar á síðu 34](#).
 - Ef rúmmál forauðgaðs safns er <30 µl, bætið RSB út í þar til heildarrúmmálið er 30 µl.
 - Ef rúmmál forauðgaðs safns >30 µl, notið perluaðferð eða lofttæmisþykki til að þykkja sameinaða safnið. Bætið RSB út í þykka sameinaða safnið þar til heildarrúmmálið er 30 µl.
- Ef notað er gDNA sem er dregið úr FFPE skal framkvæma eitt af eftirfarandi byggt á heildarrúmmáli sameinuðu forauðguðu safnanna:
 - Ef rúmmál forauðgaðs safns = 7,5 µl, haldið þá áfram með [Blöndunarþreifarar á síðu 34](#).

- Ef rúmmál forauðgaðs safns er <7,5 µl, bætið RSB út í þar til heildarrúmmálið er 7,5 µl.

ÖRUGGUR STÖÐVUNARSTAÐUR

Ef þú ert að stoppa skaltu innsigla plötuna og geyma hana við 25 °C til 15 °C í allt að 30 daga.

Sameining eftir rúmmáli

Þegar inntakið er 50–1.000 ng gDNA þarf ekki að magngreina og staðla einstök söfn sem myндуð eru í sömu tilraun.

Til að ná sem bestum afköstum skal aðeins sameina forauðguð safnasýni sem útbúin eru af sama notanda, með sömu próefefnislotu og sömu vísilyklaplötu.

1. Skrá skal vísa fyrir söfnin sem á að sameina í þessu skrefi.
2. Sameinið eftirfarandi forauðgað safn og RSB rúmmál fyrir auðgunarsamsetninguna í sama brunn á nýrri PCR-plötu.

Rúmmálið sem fæst er 30 µl.

Samsetning auðgunar *	Rúmmál hvers forauðgaðs safns (µl)	RSB rúmmál (µl)
1-þátta	14	16
2-þátta	14	2
3-þátta	10	0
4-þátta	7,5	0
5-þátta	6	0
6-þátta	5	0
7-þátta	4,2	0,6
8-þátta	3,7	0,4
9-þátta	3,3	0,3
10-þátta	3	0
11-þátta	2,7	0,3
12-þátta	2,5	0

*Nánari upplýsingar um óhefðbundnar samsetningar (2-þátta til 11-þátta), má finna [Takmarkanir verklags á síðu 2](#) (Takmarkanir aðgerðar).

ÖRUGGUR STÖÐVUNARSTAÐUR

Ef þú ert að stoppa skaltu innsigla plötuna og geyma hana við 25 °C til 15 °C í allt að 30 daga.

[Valfrjálst] Gera fyrirfram auðguð söfn hæf

Ef safnað er saman eftir rúmmáli til að magngreina forauðguðu söfnin skal nota flúrljómunaraðferð sem notar dsDNA millilitarefni. Til að gera forauðguðu söfnin hæf skal nota DNA-brotagreiningartæki með viðeigandi brotagreiningarbúnaði.

Notið 1 µl samtals til að flokka safngögn. Forauðguð söfn eru nógu þétt til að leyfa litlar þynningar fyrir magngreiningu eða brotagreiningu.

Blöndunarpreifarar

Þetta skref bindur marksvæði DNA með föngunarpreifurum.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit prófeyfni eru samhaf við bæði Illumina og auðgunar-DNA fákirnispjöld frá þriðja aðila. Fyrir nánari upplýsingar um nauðsynlegar forskriftir fyrir spjöld frá þriðja aðila, sjá [Enrichment Probe Panel Requirements á síðu 9](#).

Einnota vörur

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB jafnalausn 2 + IDT NXT Blockers) (blátt lok)
- Preifaraspjald auðgunar
- 96-brunna PCR-plata
- Límpétti
- Undirbúningur fyrir síðari aðgerð:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (gulbrúnt lok)

Um prófeyfni

- NHB2 fellur út og aðgreinist við geymslu.
- Auðgunarspjald preifara vísar til valins auðgunarfákirnispjalds frá Illumina söluaðila.

Undirbúningur

1. Undirbúið eftirfarandi einnota vörur:

Vara	Geymsla	Leiðbeiningar
EHB2	2 °C til 8 °C	Látið ná stofuhita. Iðublandið. Ef kristallar og skýjun sjást skal endurtaka iðublöndun eða pípetta lausnina upp og niður þar til hún verður tær.

Vara	Geymsla	Leiðbeiningar
Preifaraspjald auðgunar	-25 °C til -15 °C (Illumina)	Fyrir bæði Illumina og spjöld frá þriðja aðila, látið ná stofuhita. Iðublandið til að blanda.
NHB2 (blátt lok)	-25 °C til -15 °C	Þíðið við stofuhita. Þegar sýnið nær stofuhita, forhitið það í örsýnahitakassa að sama hitastigi og preifarinn sem þú notar í 5 mínútur. Iðublandið á hámarkshraða þrisvar sinnum í 10 sekúndur í hvert skipti til að ná fram dreifu. Skiljið stuttlega í skilvindu. Pípettið upp og niður frá botni rörsins. Ef kristallar og skýjun sjást skal endurtaka iðublöndun eða pípetta lausnina upp og niður þar til hún verður tær. Notið á meðan það er volgt til að forðast að botnfall myndist aftur.
SMB3*	2 °C til 8 °C	Ef haldið er áfram í næsta skref strax eftir 90 mínútna biðtíma í HYB-forritinu, skal láta prófefnið ná stofuhita í að minnsta kosti 2 klukkustundir áður en HYB-forritið er notað.
EEW* (gulbrúnt rör)	-25 °C til -15 °C	Ef haldið er áfram í næsta skref strax eftir 90 mínútna biðtíma í HYB-forritinu, skal láta prófefnið ná stofuhita í að minnsta kosti 2 klukkustundir áður en HYB-forritið er notað. Við stofuhita, forhitið í örsýnishitakassa að viðeigandi blöndunar- og föngunarhita í 30 mínútur áður en HYB-kerfinu lýkur.

*Ef á að stöðva áður en næsta aðgerð er framkvæmd skal fresta undirbúningi þessa prófefnis þar til komið er að þeirri aðgerð.

2. Vistaðu eftirfarandi HYB-forrit á lotuhitaranum með því að nota viðeigandi fjölda lotna, sem eru taldar upp í [Tafla 3](#).

- Veljið forhitunarvalkostinn fyrir lokið og stillið á 100 °C
- Stillið hvarfmagnið.
 - [Hágæða (gDNA)] 100 µl
 - [gDNA dregið úr FFPE] 25 µl
- 98 °C í 5 mínútur
- X lotur, 1 mínútu hver, byrjað við 98 °C í fyrstu lotunni og síðan lækkað um 2 °C í hverri lotu
- Haldið í 90 mínútur við viðeigandi hitastig:
 - [gDNA dregið úr FFPE] 58 °C
 - [80 mer þreifaraspjöld] 58 °C
 - [Líkamleg tilbrigðaköllun] 58 °C
 - [Öll önnur] 62 °C

Heildarkeyrslutími er ~115 mínútur.

Tafla 3 Fjöldi lotna á sýni eða spjaldi

Sýni og gerð spjalds	Fjöldi lotna (X)
gDNA dregið úr FFPE (óháð gerð spjalds)	20
80 mer þreifaraspjöld (óháð sýnisgerð)	20
Greining líkamsfrumusértækra erfðabreytileika	20
Öll önnur sýni og spjöld	18

Ferli

1. **[Hágæða gDNA]** Bætið eftirfarandi prófefnum við hvert sameinað safn á PCR-plötunni *í þeirri röð* sem þau eru talin upp.
Búið ekki til aðalblöndu (master mix). Að búa til aðalblöndu af NHB2 og EHB2 hefur neikvæð áhrif á auðgunarafköst.
 - NHB2 (blátt lok) (50 µl)
 - þreifaraspjald auðgunar (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. **[Hágæða gDNA]** Notið pípettu sem er stillt á 90 µl og pípettið hvern brunn 10 sinnum til að blanda.
3. **[gDNA dregið úr FFPE]** Bætið eftirfarandi prófefnum við *í þeirri röð sem þau er talin upp* við hvert sameinað safn í PCR-plötunni.
Búið ekki til aðalblöndu (master mix). Að búa til aðalblöndu af NHB2 og EHB2 hefur neikvæð áhrif á auðgunarafköst.

- NHB2 (blátt lok) (12,5 µl)
 - Þreifaraspjald auðgunar (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. [gDNA unnið úr FFPE] Notið pípettu sem er stillt á 20 µl og pípettið hvern brunn 10 sinnum til að blanda.
 5. Innsiglið plötuna og skiljið síðan með skilvindu við 280 × g í 10 sekúndur.
 6. Setjið sýnisplötuna á forforritaða lotuhitarann og keyrið HYB-forritið.
 7. Haldið strax áfram í næsta ferli þegar viðhaldshiti HYB-forritsins lýkur.

**VARÚÐ**

Útfelling á sér stað ef hitastig blöndunarhrvarsins fellur niður fyrir stofuhita.

Fanga blandaða þreifara

Þetta skref notar Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) til að fanga þreifara sem hafa verið blandaðir við áhugaverð marksvæði.

Einnota vörur

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (gulbrúnt lok)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5 ml örskiljunarrör
- 96 brunna MIDI-plata
- 96 brunna PCR-plata
- Límpétti
- Segulstandur fyrir MIDI-plötu
- Undirbúningur fyrir síðari aðgerð:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Um prófefni

- EEW
 - Tryggið að EEW hafi verið þítt við stofuhita í að minnsta kosti 2 klukkustundir áður en það er forhitað í örsýnahitakassa.
 - Tryggið að EEW hafi verið hitað í örsýnahitakassa í 30 mínútur áður en HYB-forritinu lýkur.

- Skiljið EEW eftir í örsýnahitakassa þegar það er ekki í notkun. EEW ætti að vera heitt allan tímann sem verkferlið stendur yfir.
- Getur orðið skýjað eftir að það nær stofuhita.
- Getur litið út fyrir að vera gult.
- SMB3
 - SMB3 verður að vera við stofuhita fyrir notkun.

Undirbúningur

1. Undirbúið eftirfarandi einnota vörur:

Vara	Geymsla	Leiðbeiningar
SMB3	2 °C til 8 °C	Látið standa í 2 klukkustundir til að ná stofuhita. Hvolfið og iðublandið síðan þar til hún verður dreifa.
EEW (gulbrúnt rör)	-25 °C til -15 °C	Eftir 2 klukkustundir í hitakassa við stofuhita skal forhita í örsýnishitakassa að viðeigandi blöndunar- og föngunarhita í 30 mínútur áður en HYB-forritinu lýkur.
EE1	-25 °C til -15 °C	Þíðið við stofuhita og iðublandið síðan.
HP3	-25 °C til -15 °C	Þíðið við stofuhita og iðublandið síðan.
ET2	2 °C til 8 °C	Látið ná stofuhita. Iðublandið.
EPM	-25 °C til -15 °C	Þíðið á ís í eina klukkustund. Iðublandið og skiljið síðan stuttlega í skilvindu. Setjið til hliðar á ís.
PPC	-25 °C til -15 °C	Þíðið á ís í eina klukkustund. Iðublandið og skiljið síðan stuttlega í skilvindu. Setjið til hliðar á ís.

2. Forhitið einn örsýnishitakassa með MIDI hitablokkarinnleggi til að setja sýnisplötuna í ræktun við eitt eftirfarandi hitastiga. Hægt er að nota annan örsýnishitakassa (valfrjálst) til að forhita EEW. Leggið EEW ofan á MIDI hitablokkarinnleggið.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer á hvert þreifaraspjald] 58 °C
 - [Líkamleg tilbrigðaköllun] 58 °C
 - [Öll önnur] 62 °C

Ferli

Föngun

1. Bæta SMB3 við samsvarandi brunn á nýrri MIDI-plötu eins og hér segir.
 - [Hágæða gDNA] Bæta við 250 µl SMB3.

- **[gDNA dregið úr FFPE]** Bætið við 62,5 µl SMB3.
2. Notið pípettu sem er stillt á 100 µl fyrir hágæða gDNA eða 25 µl fyrir FFPE, flytjið hvert sameinað safn af 96 brunna PCR-plötunni í samsvarandi brunn á nýju MIDI-plötunni.
 3. Innsiglið plötuna og hristið við 1.200 snúninga á mínútu í 4 mínútur.
 4. Ef skvettur eiga sér stað skal skilvinda plötuna stuttlega.
 5. Setjið sameinuðu safnplötuna á MIDI hitablokkarinnleggið í örsýnahitakassanum, undir EEWrörinu, lokið því og látið síðan ræktast í 15 mínútur við viðeigandi hitastig:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer preifaraspjöld] 58 °C
 - [Líkamleg tilbrigðaköllun] 58 °C
 - [Öll önnur] 62 °C
 6. Fjarlægið plötuna með sameinuðu söfnunum og skiljið við 280 × g í 30 sekúndur.
 7. Setjið strax á segulstand fyrir MIDI-spjald og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (2 mínútur).
 8. **[High quality (Hágæða) gDNA]** Notið pípettu stillta á 200 µl, fjarlægið og fargið öllum ofanvökva úr hverjum brunni án þess að raska perlukorninu.
 9. **[gDNA dregið úr FFPE]** Notið pípettu stillta á 90 µl, fjarlægið og fargið öllum ofanvökva úr hverjum brunni án þess að raska perlukorninu.
 10. Fjarlægið og fargið öllum afgangsofanvökva.

Þvo

1. Fjarlægið af segulstandinum.
2. **[Hágæða gDNA]** Fjarlægið EEW fljótt úr örsýnahitakassanum og bætið 200 µl í hvern brunn.
3. **[gDNA dregið úr FFPE]** Fjarlægið EEW fljótt úr örsýnahitakassanum og bætið 50 µl í hvern brunn.
4. Skilið ónotuðum EEW í örsýnahitakassa og haldið heitu.
5. Innsiglið og hristið við 1.800 snúninga á mínútu í 4 mínútur.
6. Setjið sýnisplötuna á MIDI hitablokkarinnleggið í örsýnahitakassanum, undir EEW rörinu, lokið því og látið síðan inkúbera í 5 mínútur við viðeigandi hitastig:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer preifaraspjöld] 58 °C
 - [Líkamleg tilbrigðaköllun] 58 °C
 - [Öll önnur spjöld] 62 °C
7. Setjið strax á segulstand fyrir MIDI-spjald og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (2 mínútur).
8. Notið pípettu sem er stillt á 200 µl fyrir hágæða DNA eða 50 µl fyrir FFPE, fjarlægið og fargið öllum ofanvökva úr hverjum brunni.
9. Endurtakið skref 1–8 tvisvar sinnum fyrir þrjá þvotta alls.

Flutningspvoltur

1. Fjarlægið af segulstandinum.
2. **[Hágæða gDNA]** Fjarlægið EEW skjótt úr örsýnahitakassanum og bætið 200 µl í hvern brunn.
3. **[gDNA dregið úr FFPE]** Fjarlægið skjótt EEW úr örsýnahitakassanum og bætið 50 µl í hvern brunn.
4. Lokið og hristið við 1.800 snúninga á mínútu í 4 mínútur. Ef skvettur eiga sér stað skal lækka hraðann niður í 1.600 snúninga á mínútu.
5. Færið perluendurdreifuna yfir á nýja MIDI-plötu.
Sum sýni gætu orðið eftir í brunnum.



VARÚÐ

Flutningur prófefnisins lágmarkar flutning á leifum prófefa sem geta hamlað PCR í síðari skrefum.

6. Setjið sýnisplötuna á MIDI hitablokkarinnleggið í örsýnahitakassanum, lokið lokinu og látið síðan inkúbera í 5 mínútur við viðeigandi hitastig:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer þreifaraspjöld] 58 °C
 - [Líkamleg tilbrigðaköllun] 58 °C
 - [Öll önnur] 62 °C
7. Setjið strax á segulstand fyrir MIDI-spjald og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (2 mínútur).
8. Notið pípettu sem er stillt á 200 µl fyrir hágæða gDNA eða 50 µl fyrir FFPE. Fjarlægið og fargið öllum ofanvökva úr hverjum brunni..
9. Skiljið plötuna með skilvindu við 280 × g í 30 sekúndur.
10. Setjið á segulstand fyrir MIDI-plötu í 10 sekúndur.
11. Notið 20 µl pípettu til að fjarlægja og farga afgangsvökva úr hverjum brunni.
12. Haldið strax áfram að **Elute á síðu 40** til að koma í veg fyrir óhóflega þornun perlanna og tap á afrakstri safnsins.

Elute

1. Blandið eftirfarandi rúmmáli saman til að útbúa Elution Master Mix. Margfaldið hvert rúmmál með fjölda sameinaðra safna sem verið er að vinna úr.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Viðbótar umframmagn prófefnis er innifalið í rúmmálinu.
2. Iðublandið og skiljið síðan stuttlega með skilvindu.
3. Fjarlægið MIDI-plötuna af segulstandinum.

4. Bætið 23 µl af Elution Master Mix í hvern brunn.
5. Innsiglið plötuna og hristið við 1.800 snúninga á mínútu í 2 mínútur.
6. Inkúberið plötuna við stofuhita í 2 mínútur.
7. Skiljið í skilvindu við 280 × g í 30 sekúndur.
8. Setjið á segulstand fyrir MIDI-plötu og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (2 mínútur).
9. Færið 21 µl af ofanvökva af MIDI-plötunni í samsvarandi brunn á nýrri 96-brunna PCR-plötu.
10. Fargið MIDI-plötunni.
11. Bætið 4 µl ET2 í hvern brunn sem inniheldur 21 µl af ofanvökva.
12. Stillið pípettuna á 20 µl og pípettið hægt hvern brunn 10 sinnum til að blanda.
13. Innsiglið plötuna og skiljið síðan með skilvindu við 280 × g í 10 sekúndur.
14. Inkúberið plötuna við stofuhita í 1 mínútu.

Magna auðgað safn

Í þessu skrefi er PCR notað til að magna forauðgað safn.

Einnota vörur

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Límpétti

Undirbúningur

1. Undirbúið eftirfarandi einnota vörur:

Vara	Geymsla	Leiðbeiningar
EPM	-25 °C til -15 °C	Þíðið við 4 °C eða á ís í eina klukkustund. Hvolfið til að blanda og skiljið síðan stuttlega með skilvindu. Setjið til hliðar á ís.
PPC	-25 °C til -15 °C	Þíðið við 4 °C á ís í eina klukkustund. Iðublandið og skiljið síðan stuttlega með skilvindu. Setjið til hliðar á ís.

2. Vistið eftirfarandi AMP-forrit á lotuhitaranum með því að nota viðeigandi fjölda PCR-lotna, sem eru taldar upp í eftirfarandi töflu.

- Veldu forhitunarvalkostinn fyrir lokið og stilltu á 100 °C
- Stillið hvarfmagnið á 50 µl
- 98 °C í 45 sekúndur
- (X) lotur af:
 - 98 °C í 30 sekúndur
 - 60 °C í 30 sekúndur
 - 72 °C í 30 sekúndur
- 72 °C í 5 mínútur
- Haldið við 10 °C

Heildarkeyrslutími er ~35 mínútur.

Sýni og gerð spjalds	(X) Lotur
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) fyrir hágæða gDNA	10
Illumina Exome Panel (CEX) fyrir FFPE	12
Öll önnur sýni og spjöld	12 ¹²³⁴

¹ Hægt er að stilla allt að 15 lotur fyrir lítil spjöld frá þriðja aðila með síðari fínstillingum. Ef FFPE er notað er hægt að stilla fjölda lotna upp í 17.

² Hægt er að stilla allt að 17 lotur fyrir spjöld frá þriðja aðila sem hafa aðeins 500 þreifara. Ef FFPE er notað er hægt að stilla fjölda lotna upp í 19.

³ Hægt er að stilla allt að 14 lotur fyrir FFPE-sýni.

⁴ Aukinn fjöldi PCR-lotna gæti leitt til hærri afritunartíðni og minni brotastærða fyrir FFPE-sýni.

Ferli

1. Bætið 5 µl PPC í hvern brunn.
2. Bætið 20 µl EPM í hvern brunn.
3. Innsiglið plötuna og hristið við 1.200 snúninga á mínútu í 1 mínútu.
4. Skiljið plötuna í skilvindu við 280 × g í 10 sekúndur.
5. Setjið á forforritaða lotuhitarann og keyrið AMP-forritið.

ÖRUGGUR STÖÐVUNARSTAÐUR

Ef þú ert að hætta, geymdu við 2 °C til 8 °C í allt að tvo daga. Einnig er hægt að láta það vera á lotuhitaranum í allt að 24 klukkustundir.

Hreinsa magnað auðgað safn

Þetta skref notar Cleanup Beads til að hreinsa auðgaða safnið og fjarlægja óæskileg efni.

Einnota vörur

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Nýundirbúið 80% etanól (EtOH)
- Límpétti
- 96 brunna MIDI-plata
- 96 brunna PCR-plata
- Segulstandur fyrir MIDI-plötu

Um prófefni

- Cleanup Beads
 - Iðublandið fyrir hverja notkun.
 - Iðublandið oft til að tryggja að perlurnar dreifist jafnt.
 - Sogið og dreifið hægt vegna seigju lausnarinnar.

Undirbúningur

1. Undirbúið eftirfarandi einnota vörur:

Vara	Geymsla	Leiðbeiningar
CB	Herbergishitastig	Iðublandið og hvolfið til að blanda þar til liturinn á vökvanum er einsleitur.
RSB	2 °C til 8 °C	Látið ná stofuhita. Iðublandið.

2. Útbúið nýtt 80% EtOH úr algeru etanóli.

Ferli

1. Skiljið PCR-plötuna með skilvindu við 280 × g í 10 sekúndur.
2. Iðublandið CB 3 sinnum í 10 sekúndur og hvolfið síðan.
3. Bætið 40,5 µl CB í hvern brunn á nýrri **MIDI** plötu.
4. Færið 45 µl úr hverjum brunni á PCR-plötunni yfir á samsvarandi brunn MIDI-plötunnar.
5. Innsiglið plötuna og hristið við 1.800 snúninga á mínútu í 1 mínútu.
6. Setjið MIDI-plötuna í hitakassa við stofuhita í 5 mínútur.
7. Skiljið í skilvindu við 280 × g í 10 sekúndur.

8. Setjið á segulstand fyrir MIDI-plötu og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (5 mínútur).
9. Notið pípettu sem er stillt á 95 µl, fjarlægið og fargið öllum ofanvökva úr hverjum brunni.
10. Þvoið tvisvar sinnum eins og hér segir.
 - a. Með plötuna á segulstandinum skal bæta við 200 µl af fersku 80% EtOH án þess að blanda.
 - b. Inkúberið í hitakassa í 30 sekúndur.
 - c. Fjarlægið og fargið ofanvökvanum án þess að raska perlunum.
11. Loftþurrkið á segulstandinum í 5 mínútur.
12. Á meðan loftþurrkun stendur, notið 20 µl pípettu til að fjarlægja og farga afgangs EtOH úr hverjum brunni.
13. Fjarlægið af segulstandinum og bætið við 32 µl RSB í hvern brunn.
14. Innsiglið plötuna og hristið við 1.800 snúninga á mínútu í 1 mínútu.
15. Inkúberið plötuna við stofuhita í 5 mínútur.
16. Skiljið í skilvindu við 280 × g í 10 sekúndur.
17. Setjið á segulstand fyrir MIDI-plötu og bíðið þar til vökvinn er orðinn tær (2 mínútur).
18. Færið 30 µl af ofanvökva af 96-brunna MIDI-plötunni yfir í samsvarandi brunn á nýrri PCR-plötu.
19. Fargið MIDI-plötunni.

ÖRUGGUR STÖÐVUNARSTAÐUR

Ef þú ert að stoppa skaltu innsigla plötuna og geyma hana við -25 °C til -15 °C í allt að 7 daga.

Athuga auðguð söfn

Til að magngreina tvíþátta gDNA-inntak skal nota flúrljómunaraðferð sem notar innskotslitarefni. Forðist aðferðir sem mæla heildarkjarnsýru, eins og NanoDrop eða aðrar útblámagleypniaðferðir.

1. Keyrið 1 µl af auðguðu söfnunum með magngreiningaraðferðinni.

ATHUGIÐ Heildarmólstyrkur þreifara hefur hlutfallsleg áhrif á afrakstur safnsins eftir auðgun.

Búist er við meðalstærð innskots upp á 125–235 bp og dreifingu safnbrot á stærðarbilinu ~200 bp til ~1000 bp.

Þynna söfn að upphafspéttni

Þetta skref þynnir söfn niður í upphafspéttni fyrir raðgreiningarkerfið og er fyrsta skrefið í raðþynningu. Eftir þynningu að upphafspéttni er lokið eru söfnin tilbúin til eðlisbreytingar og þynningar að lokahleðslupéttni.

Fyrir raðgreiningu, óháð því hvaða auðgunarpreifingarspjald þú notar, Illumina mælir með því að setja upp þörunarkeyrslu með 151 lotu á lestur (2 × 151) og 10 lotum á hvern vísislestur. Til að fá færri skaraða lestra eða minni hráa þekju er hægt að raðgreina niður í 2 × 126 eða 2 × 101.

1. Reiknið mólstyrksgildi safnsins eða sameinaðra safna með eftirfarandi formúlu.

- Fyrir söfn sem eru hæf með DNA-brotagreiningartæki skal nota meðalstærðina sem fæst fyrir safnið.
- Fyrir allar aðrar aðferðir við hæfnigreiningu skal nota 350 bp sem meðalstærð safns.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{meðalstærð safns (bp)}} = \text{Mólstyrkur (nM)}$$

Til dæmis, ef styrkur safnsins er 20 ng/μl og meðalstærðin er 350 bp, þá er mólstyrksgildið sem fæst 86,58 nM.

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

2. Með því að nota mólstyrksgildið, reiknið út rúmmál RSB og safn sem þarf til að þynna söfnin í upphafspéttni kerfisins.

Raðgreiningarkerfi	Lágmarksrúmmál safns sem krafist er (μl)	Upphafspéttni (nM)	Lokahleðslupéttni (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) eða 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM er upphafspéttni fyrir lokahleðslupéttni upp á 350 pM. Ef nauðsyn krefur skal aðlaga lokahleðslupéttni með því að nota eftirfarandi töflu.

Lokahleðslupéttni (pM)	Péttni sameinaðs safns (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25

Lokahleðslupéttni (pM)	Péttni sameinaðs safns (nM)
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Þynna söfn með RSB:

- **Söfn sem hafa verið magngreind sem fjölrunasafn**—Þynnið safnið að upphafspéttni kerfisins.
- **Söfn sem hafa verið magngreind hvert fyrir sig**—Þynnið hvert safn að upphafspéttni kerfisins. Setjið 10 µl af hverju þynntu safni í rör til að búa til sameinað safn með mörgum plexum.

4. Fylgið leiðbeiningunum um eðlisbreytingu og þynningu fyrir kerfið til að þynna það að lokahleðslupéttni.

- Fyrir NextSeq 550Dx System, sjá [Undirbúningur fyrir NextSeq 550Dx raðgreiningu á síðu 46](#).
- Fyrir MiSeqDx System, sjá [Undirbúningur fyrir MiSeqDx raðgreiningu á síðu 48](#).
- Fyrir NovaSeq 6000Dx System, sjá [Undirbúningur fyrir NovaSeq 6000Dx raðgreiningu á síðu 49](#).

Lokahleðslupéttni er byrjunarpunktur og almennt viðmið. Fínstillið styrkleika fyrir vinnsluflæði og magngreiningaraðferð út frá síðari raðgreiningarkeyrslum eða með titrun á flæðisflögu.

Undirbúningur fyrir NextSeq 550Dx raðgreiningu

Notið eftirfarandi leiðbeiningar til að eðlisbreyta og þynna söfn fyrir raðgreiningu á NextSeq 550Dx sequencing system.

Einnota vörur

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

Undirbúningur

Útbúið *nýja* þynningu af 0,2 N NaOH til að eðlisbreyta söfnum fyrir raðgreiningu. Til að koma í veg fyrir að smávægilegar pípettunarvillur hafi áhrif á endanlega NaOH péttni er útbúið auka rúmmál.



VARÚÐ

Nýþynnt 0,2N NaOH er nauðsynlegt fyrir eðlisbreytingarferlið. Óviðeigandi eðlisbreyting getur dregið úr afrakstri.

1. Undirbúið eftirfarandi einnota vörur:

Vara	Geymsla	Leiðbeiningar
HT1	-25 °C til -15 °C	Þíðið við stofuhita. Geymið við 2 °C til 8 °C þar til tilbúið er að þynna eðlisbreytt söfn.

- Blandið eftirfarandi rúmmáli saman í örskiljunarröri til að útbúa nýja þynningu af NaOH:
 - Vatn í rannsóknarstofuhæfu ástandi (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)
 Niðurstaðan er 1 ml af 0,2N NaOH.
- Hvolfið rörinu við nokkrum sinnum til að blanda.
- Blandið eftirfarandi rúmmáli saman í örskiljunarrör til að undirbúa 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.
 - Vatn í rannsóknarstofuhæfu ástandi (800µl)
 - 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)
 Niðurstaðan er 1 ml af 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

ATHUGIÐ Haldið rörinu lokuðu. Notið nýja þynningu innan **12 klukkustunda**.

Eðlisbreyta söfnum

- Sameinaðu eftirfarandi rúmmál af safni og nýþynntu 0,2N NaOH í örskiljunarröri.
 - 10 µl safn
 - 10 µl af 0,2N NaOH
- Iðublandið stuttlega og skiljið síðan í skilvindu við 280 × g í 1 mínútu.
- Inkúberið við stofuhita í 5 mínútur.
- Bætið við 10 µl af 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Þynna eðlisbreytt söfn að 20 pM

- Bætið 970 µl af forkældu HT1 í rörið sem inniheldur eðlisbreytt söfn. Niðurstaðan er 20 pM eðlisbreytt safn.
- Iðublandið stuttlega og skiljið síðan í skilvindu við 280 × g í 1 mínútu.
- Setjið 20 pM söfnin á ís þar til búið er að halda áfram með lokapynningu.

Þynna söfn að hleðslupéttni

- Bætið eftirfarandi rúmmáliút í til að þynna eðlisbreyttu 20 pM safnlausnina í 1,2 pM.
 - Eðlisbreytt safnlausn (78 µl)
 - Forkælt HT1 (1222 µl)
 Heildarrúmmálið er 1,3 ml við 1,2 pM.

2. Hvolfið til að blanda og notið síðan púlsskiljun.
3. Haldið áfram í raðgreiningu. Fyrir leiðbeiningar, sjá *NextSeq 550Dx leiðarvísir fyrir mælitæki* (skjal nr. 1000000009513) og *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx í NextSeq 550Dx Application User Guide* (skjal nr. 200025238).

Undirbúningur fyrir MiSeqDx raðgreiningu

Notið eftirfarandi leiðbeiningar til að eðlisbreyta og þynna söfn fyrir raðgreiningu á MiSeqDx-raðgreiningarkerfi

Einnota vörur

- HT1 (blöndunarjafnari)
- 1N NaOH

Undirbúningur

Útbúið *nýja* þynningu af 0,2 N NaOH til að eðlisbreyta söfnum fyrir raðgreiningu. Til að koma í veg fyrir að smávægilegar pípettarvillur hafi áhrif á endanlega NaOH þéttni er útbúið auka rúmmál.



VARÚÐ

Nýþynnt 0,2N NaOH er nauðsynlegt fyrir eðlisbreytingarferlið. Óviðeigandi eðlisbreyting getur dregið úr afrakstri.

1. Undirbúið eftirfarandi einnota vörur:

Vara	Geymsla	Leiðbeiningar
HT1	-25 °C til -15 °C	Þíðið við stofuhita. Geymið við 2 °C til 8 °C þar til tilbúið er að þynna eðlisbreytt söfn.

2. Blandið eftirfarandi rúmmáli saman í örskiljunarröri til að útbúa nýja þynningu af NaOH:

- Vatn í rannsóknarstofuhæfu ástandi (800 µl)
- 1N NaOH (200 µl)

Niðurstaðan er 1 ml af 0,2N NaOH.

ATHUGIÐ Haldið rörinu lokaðu. Notið nýja þynningu innan **12 klukkustunda**.

Eðlisbreyta 4 nM safni

1. Blandið eftirfarandi rúmmáli saman í örskiljunarröri.
 - 4 nM safn (5 µl)
 - 0,2N NaOH (5 µl)
2. Iðublandið stuttlega og skiljið síðan í skilvindu við 280 × g í 1 mínútu.

- Inkúberið við stofuhita í 5 mínútur.
- Bætið 990 µl af forkældu HT1 í rörið sem inniheldur eðlisbreytta safnið. Niðurstaðan er 1 ml af 20 pM eðlisbreyttu safni.

Þynnt eðlisbreytt 20 pM safn

- Þynnið að æskilegri þéttni með því að nota eftirfarandi rúmmál.

Þéttni	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM safn	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Forkælt HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- Hvolfið til að blanda og notið síðan púlsskiljun.
- Haldið áfram í raðgreiningu. Fyrir leiðbeiningar, sjá *MiSeqDx leiðarvísir fyrir mælitæki fyrir MOS v4 (skjal nr. 200010452)* og *Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Workflow Guide for MiSeqDx (skjal nr. 200015661)*.

Undirbúningur fyrir NovaSeq 6000Dx raðgreiningu

Notið eftirfarandi leiðbeiningar til að eðlisbreyta og þynna söfn fyrir raðgreiningu á NovaSeq 6000Dx raðgreiningarkerfinu.

Einnota vörur

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

Undirbúningur

Útbúið *nýja* þynningu af 0,2 N NaOH til að eðlisbreyta söfnum fyrir raðgreiningu. Til að koma í veg fyrir að smávægilegar pípettarvillur hafi áhrif á endanlega NaOH þéttni er útbúið auka rúmmál.



VARÚÐ

Nýþynnt 0,2N NaOH er nauðsynlegt fyrir eðlisbreytingarferlið. Óviðeigandi eðlisbreyting getur dregið úr afrakstri.

- Blandið eftirfarandi rúmmáli saman í örskiljunarrör til að þynna 1N NaOH í 0,2N NaOH:

Tafla 4 S2 stilling

Prófefni	Rúmmál fyrir eina flæðisflögu (µl)	Rúmmál fyrir tvær flæðisflögur (µl)
Vatn í rannsóknarstofuhæfu ástandi	40	80
Stock 1N NaOH	10	20

Þetta rúmmál gefur 50 µl af 0,2N NaOH fyrir eina flæðisflögu eða 100 µl af 0,2N NaOH fyrir tvær flæðisflögur.

Tafla 5 S4 stilling

Prófefni	Rúmmál fyrir eina flæðisflögu (µl)	Rúmmál fyrir tvær flæðisflögur (µl)
Vatn í rannsóknarstofuhæfu ástandi	80	160
Stock 1N NaOH	20	40

Þetta rúmmál gefur 100 µl af 0,2N NaOH fyrir eina flæðisflögu eða 200 µl af 0,2N NaOH fyrir tvær flæðisflögur.

2. Snúið nokkrum sinnum við til að blanda eða iðublandið vel.
3. Blandið eftirfarandi rúmmáli saman í örskiljunarrör til að undirbúa 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.
 - Vatn í rannsóknarstofuhæfu ástandi (600 µl)
 - 1M Tris-HCl, pH 8,0 (400 µl)
 Niðurstaðan er 1 ml af 400 mM Tris-HCl, pH 8,0

ATHUGIÐ Haldið rörinu lokuðu. Notið nýja þynningu innan **12 klukkustunda**.

Búa til staðlaða safnssameiningu

Hleðslupéttni getur verið breytileg eftir því hvernig safnið er undirbúið og eftir þeim magngreiningar- og stöðlunaraðferðum sem notaðar eru.

Notið eftirfarandi leiðbeiningar til að staðla söfn í viðeigandi þéttni og síðan sameina þau. Söfn sem eru raðgreind á sömu flæðisflögu verða að vera sameinuð í eina staðlaða sameiningu.

ATHUGIÐ Hámarksfjöldi sýna sem hægt er að keyra á hverri rein með Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit er 192. Þessi takmörkun stafar af heildarfjölda UD-vísa í setti A og B.

Staðla styrk safna fyrir sameiningu

1. Ákvarðið nauðsynlega þéttni sameinaða safnsins út frá æskilegri lokahleðslupéttni.

- Fyrir lokahleðslupéttni upp á 350 pM er nauðsynleg péttni safnsins 1,75 nM.
- Til að ákvarða péttni sameinaða safnsins fyrir aðra lokahleðslupéttni, sjá [þynna söfn að upphafspéttni á síðu 45](#).

2. Staðla styrk safna fyrir sameiningu með því að nota 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.

Fyrir aðstoð við þynningu safna niður í réttan styrk, sjá [Pooling Calculator](#) á Illumina vefsíðunni.

Ráðlögð hleðsupéttni

Ákjósanlegasta péttni DNA-hleðslu fer eftir gerð safnsins og stærð innskots. Fyrir söfn >450 bp gæti hærri hleðslupéttni verið nauðsynleg.

Sameina stöðluð söfn og bæta við valfrjálsum PhiX samanburði

1. Sameinið viðeigandi rúmmál hvers staðlaðs safns í nýju örskiljunarröri til að fá eitt eftirfarandi lokarúmmál:

Stilling	Lokarúmmál (µl)
S2	150
S4	310

2. [Valfrjálst] Hækkið 1% óeðlisbreytt PhiX> eins og hér segir.

- Þynnið 10 nM PhiX í 2,5 nM með því að nota 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
- Bætið við viðeigandi rúmmáli af óeðlisbreyttu 2,5 nM PhiX við rör sameinaðs safns sem hefur ekki verið eðlisbreytt.

Stilling	Óeðlisbreytt 2,5 nM PhiX (µl)	Óeðlisbreytt sameinað safn (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Við íblöndun PhiX er mælt með 1% magni til að tryggja söfn í góðu jafnvægi. Söfn með lítinn fjölbreytileika geta þurft meira. Til að nota PhiX-samanburð með söfnum sem hafa litla fjölbreytni skal hafa samband við Illumina tæknilega aðstoð til að fá leiðbeiningar.

Sameinuð eðlisbreytt söfn og valfrjáls PhiX samanburður

1. Bætið við 0,2N NaOH í rörið með óeðlisbreytttri safnasameiningu og valfrjálsum PhiX eins og hér segir.

Flæðisflaga	0,2N NaOH	Óeðlisbreytt safnasameining (µl)	Niðurstöðurúmmál
S2	37	150	187 µl, eða 187,9 µl með PhiX
S4	77	310	387 µl, eða 388,9 µl með PhiX

- Lokið og iðublandið síðan stuttlega.
- Skilvindið við 280 × g í allt að 1 mínútu.

4. Inkúberið við stofuhita í 8 mínútur til að eðlisbreyta.
5. Bætið við 400 mM Tris-HCl, pH 8,0, eins og hér segir til að hlutleysa.

Stilling	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Niðurstöðurúmmál
S2	38	225 µl, eða 225,9 µl með PhiX
S4	78	465 µl, eða 466,9 µl með PhiX

6. Lokið og iðublandið síðan stuttlega.
7. Skilvindið við 280 × g í allt að 1 mínútu.
8. Flytjið allt rúmmálið af eðlisbreytta safninu eða eðlisbreytta safninu og PhiX í NovaSeq 6000Dx safnsrörið.
9. Haldið áfram í raðgreiningu. Leiðbeiningar er að finna í *NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation* (skjal # 200010105) og *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx* fyrir NovaSeq 6000Dx (skjal # 200014776).

Vandamálagreining

Notið eftirfarandi töflu til að finna lausnir á vandamálum í verkflæðinu. Ef raðgreiningarkeyrsla eða undirbúningur safns fyrir sýni mistekst tvisvar sinnum gæti frekari vandamálagreining verið nauðsynleg. Hafa samband við Illumina tæknilega aðstoð.

Athugun	Möguleg orsök	Ráðlagðar aðgerðir
Raðgreiningarkeyrsla stenst ekki keyrðar Quality Control Specifications (Gæðaeftirlitsforskriftir)	Notanda- eða rannsóknarstofubúnaðarvilla í prófunarferlinu	Athugið auðguð söfn til að tryggja viðeigandi afrakstur safns og dreifingu brotastærða. Endurtakið undirbúning safnsins úr einu af eftirfarandi skrefum eftir því hvar grunuð notkunar- eða búnaðarvilla átti sér stað. Ef óþekkt eða önnur villa kom upp, hafið samband við Illumina tæknilega aðstoð til að leysa úr vandamálum með keyrsluna. • Endurraða söfnum. Sjá nánari upplýsingar í Undirbúningur fyrir NextSeq 550Dx raðgreiningu á síðu 46, Undirbúningur fyrir MiSeqDx raðgreiningu á síðu 48 eða Undirbúningur fyrir NovaSeq 6000Dx raðgreiningu á síðu 49. • Endurauðga söfn. Sjá Blöndunarþreifarar á síðu 34. • Hefja undirbúning safns frá upphafi verkflæðisins. Sjá nánari upplýsingar í Leiðbeiningar um notkun á síðu 19.
	Vandamál með tækið	Hafið samband við Illumina tæknilega aðstoð.
Villa við FASTQ myndun eða almenn villa í raðgreiningarkerfi (t.d. netvilla, villur við hleðslu/afhleðslu prófefna o.s.frv.)	Vandamál með hugbúnað eða tæki	Sjá nánari upplýsingar um eininguna eða forritið til að aðstoða við greiningu, eða skoðið NextSeq 550Dx leiðarvísir fyrir mælitæki (skjal nr. 1000000009513) , MiSeqDx leiðarvísir fyrir mælitæki fyrir MOS v4 (skjal nr. 200010452) eða NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation (skjal nr. 200010105) . Hafið samband við Illumina tæknilega aðstoð til að fá frekari aðstoð.

Athugun	Möguleg orsök	Ráðlagðar aðgerðir
DNA-safnið skilar ekki nægilegum afrakstri til raðgreiningarhleðslu	Kröfur um sýnisílag voru ekki uppfylltar	Tryggið viðeigandi sýnisílag og endurtakið undirbúning safnsins. Sjá Ráðleggingar um sýnisinntak á síðu 16 .
	Notkunar- eða búnaðarvilla í prófunarferlinu	Endurtakið undirbúning safnsins úr einu af eftirfarandi skrefum eftir því hvar grunuð notkunar- eða búnaðarvilla átti sér stað. Ef óþekkt eða önnur villa kom upp, hafið samband við Illumina tæknilega aðstoð til að leysa úr vandamálum með keyrsluna. • Endurraða söfnum. Sjá nánari upplýsingar í Undirbúningur fyrir NextSeq 550Dx raðgreiningu á síðu 46, Undirbúningur fyrir MiSeqDx raðgreiningu á síðu 48 eða Undirbúningur fyrir NovaSeq 6000Dx raðgreiningu á síðu 49. • Endurauðga söfn. Sjá Blöndunarþreifarar á síðu 34. • Hefja undirbúning safns frá upphafi verkflæðisins. Sjá Leiðbeiningar um notkun á síðu 19.
	Kröfur um auðgunarþreifaraspjald voru ekki uppfylltar	Tryggið að auðgunarþreifaraspjaldið sé viðeigandi og endurtakið undirbúning safnsins. Sjá Enrichment Probe Panel Requirements á síðu 9 .

Afkastaeiginleikar

Afköst með heilum exóm spjöldum

Afköst exóm spjalda voru prófuð með því að nota lægsta (50 ng) og hæsta (1.000 ng) ráðlagða inntakið af Coriell Cell Line gDNA NA12878, með þekktu sannleiksmengi fyrir greiningu á kímlínutilbrigði (Coriell platínuerfðamengi). Exóm spjald 1 (45 Mb) og exóm spjald 2 (36,8 Mb) voru notuð sem dæmigerð spjöld. Tuttugu og fjórir tæknilegar tvítekningar voru prófaðar með Illumina DNA Prep with Enrichment Dx aðferðinni með exóm spjaldi 1 (45 Mb) í tveimur 12-pátta auðgunarhvärfum. Tólf tæknilegar tvítekningar voru prófaðir með Illumina DNA Prep with Enrichment Dx aðferðinni með exóm spjaldi 2 (36,8 Mb) í einu 12-pátta auðgunarhvarfi. Auðguðu söfnin voru síðan raðgreind á NextSeq 550Dx sequencing system með DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager einingunni.

Eftirfarandi tafla sýnir meðalgildi fyrir aukaraðgreiningu og afkastamælikvarða tilbrigðisköllunar í tæknilegum tvítekingum sem prófaðar voru með hverju spjaldi.

Tafla 6 Assay Performance With Two Whole Exome Panels (Prófunarafköst með tveimur heilum exóm spjöldum)

Spjald	Padded Unique Read Enrichment	Einsleitni þekju	Fragment Length Median	SNV Recall ¹	SNV Precision ²	Indel Recall ¹	Indel Precision ²
Exóm spjald 1 (45 Mb)	80%	96%	186 bp	96%	99%	90%	89%
Exóm spjald 2 (36,8 Mb)	93%	98%	188 bp	96%	99%	92%	93%

¹ Recall=jákvæðar niðurstöður/(sannar jákvæðar niðurstöður + rangar jákvæðar niðurstöður)

² Precision=Sannar jákvæðar niðurstöður/(sannar jákvæðar niðurstöður + rangar jákvæðar niðurstöður)

Greiningarmörk

Horizon HD799 DNA viðmiðunarstaðallinn var notaður til að prófa greiningarmörk. HD799 samanstendur af miðlungs skertu formalínmeðhöndluðu DNA með þekktum SNV í samsætutíðni á bilinu 1–24,5%. Lægsta ráðlagða DNA-inntakið (50 ng) var notað og greiningartíðni SNV með $\geq 5,0\%$ tilbrigðasamsætutíðni (VAF) var metin. 16 tæknilegar endurtekningar voru prófaðar í gegnum Illumina DNA Prep with Enrichment Dx prófun með FFPE-vinnuflæði, auðgað með auðgunarspjaldi fyrir fjölkrabbamein (1,94 Mb) í 16 (1-þátta) auðgun og síðan raðgreint á NextSeq 550Dx tæki með DNA GenerateFASTQ Dx einingu.

Öll sýnin stóðust kröfur um afköst hvers spjalds fyrir sig, eins og sýnt er í eftirfarandi töflu.

Tafla 7 Sýnisafköst fyrir greiningarmörk

Spjald	Greiningartíðni tilbrigða af SNV-gildum $\geq 5,0\%$ VAF	Meðaltal Einsleitni þekju
Auðgunarspjald fyrir fjölkrabbamein (1,94 Mb, 523 gen)	100%	99%

Truflandi efni

Áhrif hugsanlegra truflunarefna voru metin í Illumina DNA Prep with Enrichment Dx með því að meta afköst prófunarinnar í návist truflandi efna.

Truflun í heilblóði

Parasetamól (utanaðkomandi efnasamband, lyf), kreatínín og þríglýseríð (innræn umbrotsefni) voru prófuð með því að blanda þeim í heilblóðsýni úr mönnum áður en DNA-útdráttur var gerður. Til að meta truflanir af völdum blóðsöfnunar (stuttar blóðtökur) var EDTA einnig bætt í heilblóðsýni. Að auki, til að meta truflanir sem stöfuðu af undirbúningi sýna var etanól í sameindaflokki bætt í DNA sem var dregið úr heilblóði.

Eftirfarandi tafla sýnir prófunarþéttni fyrir hvert truflunarefni.

Tafla 8 Hugsanlega truflandi efni og þéttni prófuð í heilblóði

Prófunarefni	Prófunarþéttni
Parasetamól	15,6 mg/dl* Þrisvar sinnum hærri en hæsta þéttni sem búast má við eftir meðferðarskammt lyfs.
Kreatínín	15 mg/dl* Hæsta þéttni sem sást í þýði.
Þríglýseríð	1,5 g/dl* Hæsta þéttni sem sást í þýði.
EDTA	6 mg/ml Þéttin er þrisvar sinnum meiri en búist er við í blóði, safnað í EDTA-rörum.
Etanól í sameindaflokki	15% v/v Í skolvökva eftir DNA-útdrátt.

*Samkvæmt CLSI EP37-ED1:2018

Fyrir hvert truflandi efni voru 12 tæknilegar endurtekningar prófaðar í gegnum Illumina DNA Prep with Enrichment Dx prófun, auðgað með exómspaldi (45 Mb) í einpátta (12-plex) auðgun og síðan raðgreint á NextSeq 550Dx tæki með DNA GenerateFASTQ Dx einingunni.

Fyrir bæði efnin sem prófuð voru uppfylltu öll 12 sýnin kröfur um afköst sýnanna og engin truflun á afköstum prófunarinnar kom fram.

Truflun í FFPE-vef

Tvö FFPE-sýni úr ristli og endaparmi voru prófuð með og án blóðrauða, 0,1 mg á 10 µm FFPE-sneið, til að sýna verstu hugsanlegu sviðsmynd þar sem 50% FFPE-vefjasýni voru menguð með háu blóðrauðagildi í blóði. Sýnin voru Illumina DNA Prep with Enrichment Dx prófuð með auðgunarspaldi fyrir fjölkrabbameinsgen 1 (1,94 Mb), sem dæmigert spjald fyrir einpátta auðgun. Auðguðu söfnin voru síðan raðgreind á NextSeq 550Dx tæki með DNA GenerateFASTQ Dx einingunni. Öll sýnin uppfylltu kröfur um afköst sýnanna og sýnt hefur verið fram á að blóðrauði truflar ekki afköst prófunarinnar.

Til að meta truflanir sem stöfuðu af undirbúningi sýna var tveimur útrænum efnasamböndum bætt við DNA sem dregið var úr FFPE-vefsýni úr þvagblöðrukrabbameini. Útrænu efnin sem prófuð voru eru útdráttarlausnir sem almennt eru notaðar við DNA-útdráttarferli og eru skráð með prófuðu magni í eftirfarandi töflu.

Prófunarefnislausnirnar eru fáanlegar í súlnubýggðum DNA-einangrunarsettum.

Tafla 9 Hugsanlega truflandi útræn efni og þéttni prófuð í FFPE

Prófunarefni	Prófunarþéttni (µl/30 µl skolvökvi)
Afparafínunarlausn	113 x 10 ⁻⁶
Þvottajafnalausn AW2	0,417

Fyrir hvert truflandi efni voru átta tæknilegar endurtekningar prófaðar í gegnum Illumina DNA Prep with Enrichment Dx prófun, auðgað með fjölkrabbameins auðgunarspjaldi (1,94 Mb) í einþátta auðgun og síðan raðgreint á NextSeq 550Dx tæki með DNA GenerateFASTQ Dx einingu.

Fyrir bæði efnin sem prófuð voru uppfylltu öll átta sýnin frammistöðukröfur og engin merki um truflun á afköstum prófunarinnar komu fram.

Víxlmengun

Coriell-frumulínan gDNA NA12878 (kvenkyns, 10 sýni), Coriell-frumulínan gDNA NA12877 (karlkyns, 12 sýni) og samanburðarhópur án sniðmáts (NTC, 2 sýni) var prófaður í gegnum Illumina DNA Prep with Enrichment Dx prófun í skákborðsplötuuppsetningu. Öll sýni notuðu hæstu ráðlögðu gDNA inntök (1.000 ng) sem ströngustu skilyrði til að meta víxlmengun sýna. Prófanir voru framkvæmdar tvisvar af tveimur aðskildum notkunaraðilum. Exómspjald 1 (45 Mb) var notað í 12-þátta auðgunarhvörfum. Auðguðu söfnin voru síðan raðgreind á NextSeq 550Dx tæki með DNA GenerateFASTQ Dx. Metið var með því að meta þekju Y-litnings úr karlkyns erfðamengi í kvenkyns sýnum með því að bera hana saman við bakgrunnsgildi úr heilli plötu af kvenkyns sýnum og við vísisframsetningu NTC-sýnanna.

Tafla 10 Niðurstöður víxlmengunar

Kvenkynssýni með þekju á Y-litningi karla sem fer yfir <3x grunnsuð.	Vísisframsetning í NTC
100%	<0,0005%

Afkastaeiginleikar DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Afkastaeiginleikar DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NovaSeq 6000Dx er að finna í *NovaSeq 6000Dx Instrument Package Insert (skjal nr. 200025276)*.

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx á NextSeq 550Dx veitir sömu aukagreiningarferla og forritið á NovaSeq 6000Dx, þar á meðal eftirfarandi þrjú verkflæði: Myndun FASTQ-skráa, myndun FASTQ- og VCF-skráa fyrir kímlínutilbrigði og myndun FASTQ- og VCF-skráa til að greina líkamleg tilbrigði.

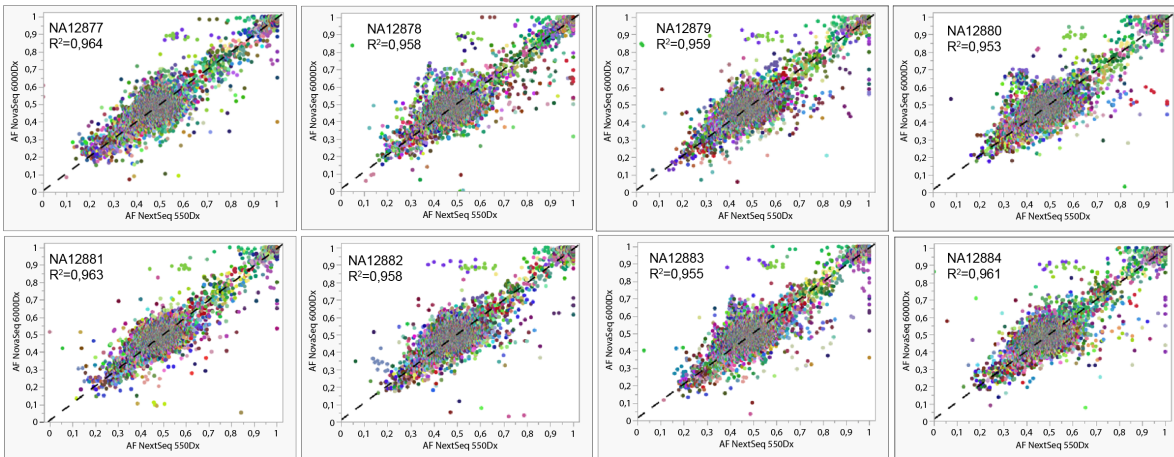
Sambærileg afköst aukagreiningar fengust úr sama undirbúningi safnsins sem raðgreint var á báðum kerfum. Greiningartíðni tilbrigða ([Tafla 11](#)) og tíðnisamræmi ([Mynd 1](#)) fyrir gDNA-sýni úr Coriell-frumulínu voru metin með dæmigerðri prófun sem hönnuð var til að kanna fjölbreytt úrval gena sem ná yfir 1.970.505 grunna (9.232 mörk) yfir alla 23 litninga mannsins. Átta platínuerfðamengissýni voru prófuð, sjö í sex endurteknum prófum (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) og eitt (NA12881) í fimm endurteknum prófum (sjá [Mynd 1](#)). Raðgreining á söfnum var gerð með þremur keyrslum á NovaSeq 6000Dx og NextSeq 550Dx tækjunum, og tilbrigðaköllun var framkvæmd með FASTQ og VCF myndun fyrir greiningarvinnuflæði til að greina kímlínuafbrigði í DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application.

Byggt á sterkri fylgni milli afkasta forritsins á NovaSeq 6000Dx og NextSeq 550Dx tækjunum, eru afkastaeiginleikar sem tengjast aukagreiningu, og eru tilgreindir í fylgiseðli *NovaSeq 6000Dx tækisins* (skjal nr. 200025276), einnig taldir eiga við um DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx NextSeq 550Dx forritið.

Tafla 11 Afköst forrita – Greiningartíðni tilbrigða fyrir SNV, innskot og úrfellingar

Spjald	Greiningartíðni tilbrigða á NovaSeq 6000Dx	Greiningartíðni tilbrigða á NextSeq 550Dx
Fjöl-erfðamengisspjald (1,97 Mb, 9.232 mörk, 23 litningar)	99,9%	99,9%

Mynd 1 Samanburður á tilbrigðistíðni fyrir keyrslur NovaSeq 6000Dx og NextSeq 550Dx með DRAGEN fyrir IDPE Dx Application-greiningu



Viðauki: Illumina UD Indexes Adapter Sequences.

Þessum einkvæmu tvöföldu (UD) vísilyklum er raðað á plötuna til að framfylgja ráðlagðri pörunarstefnu. Vísilyklarnir eru 10 basar að lengd, í stað hefðbundinna átta basa.

Vísir 1 (i7) vísilyklar

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Vísir 2 (i5) vísilyklar

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Eftirfarandi raðgreining er notuð til að snyrta Read 1 og Read 2.

CTGTCTCTTATACACATCT

Plata A/Sett 1 Vísilyklar

Heiti vísis	i7-basar í vísilykli	i5 basar í vísilykli
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GGCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA

Heiti vísis	i7-basar í vísilykli	i5 basar í vísilykli
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTAGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG

Heiti vísis	i7-basar í vísilykli	i5 basar í vísilykli
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	ACTGTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC

Heiti vísis	i7-basar í vísilykli	i5 basar í vísilykli
UDP0068	TGTTCCGTG	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	AGACACATA
UDP0084	GTCCACTTGT	GGCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	KATTGAGTAKT
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	KATTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACG	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Plata B/Sett 2 Vísilyklar

Heiti vísis	i7-basar í vísilykli)	i5 basar í vísilykli)
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	KATTGAGTAKT	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	GGGCCTGTCCT	KATTURCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Heiti vísis	i7-basar í vísilykli)	i5 basar í vísilykli)
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	KÁTTGGATT	KATTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCTG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA

Heiti vísis	i7-basar í vísilykli)	i5 basar í vísilykli)
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	CGCGCTAGA
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	CCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC

Heiti vísis	i7-basar í vísilykli)	i5 basar í vísilykli)
UDP0185	GTGGAGCCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGGTGTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Útgáfuferill

Skjal	Dagsetning	Lýsing á breytingu
Skjal nr. 200038118 v01	Desember 2025	- Fjarlægð tilvísun í Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Module fyrir NextSeq 550Dx. - Skýrari verklagsreglur við hreinsun eftir merkingum. - Uppfært hlutanúmer skjals MiSeqDx tækjaleiðbeininga fyrir MOS v4.
Skjal nr. 200038118 útgáfa 00	Júlí 2023	Fyrsta útgáfa. Þetta skjal kemur í stað fyrra skjals 200019584. Breytingar frá skjali 200019584 v2 yfir í þetta nýja skjal: - Bætt við efni til að styðja við raðgreiningu á NextSeq 550Dx tæki með því að nota DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application fyrir NextSeq 550Dx. - Listi yfir skýrð prófefni sem ekki fylgja. - Upplýsingum um tilkynningar um atvik hefur verið bætt við kaflann Varnaðarorð og varúðarráðstafanir. - Skýrari væntingar um auðgunarsöfn. - Bætt við leiðbeiningum um að undirbúa 400 mM Tris-HCl, pH 8,0. - Fjarlægð innsláttarvilla í undirbúningsskrefi raðgreiningar. Breytingar sem áður voru gerðar á skjali 200019584: - Bætt við efni til að styðja við raðgreiningu á NovaSeq 6000Dx Instrument. - Bætt við heiti raðgreiningarkerfa og vörulistanúmerum. - Upplýsingum um einstaka tvöfalda vísun var eytt fyrir safn sem notar aðeins eina vísun.

Einkaleyfi og vörumerki

Þetta skjal og innihald þess eru eign Illumina, Inc. og dótturfélaga þess („Illumina“) og eru eingöngu ætluð til samningsbundinnar notkunar viðskiptavina þess í tengslum við notkun þeirrar vöru/vara sem lýst er hér og í engum öðrum tilgangi. Þetta skjal og efni þess skal ekki notað eða dreift í neinum öðrum tilgangi og/eða á annan hátt miðlað, birt eða afritað án skriflegs samþykkis Illumina. Með þessu skjali veitir Illumina ekki leyfi samkvæmt einkaleyfi, vörumerki, höfundarrétti eða fordæmisrétti, né öðrum sambærilegum réttindum þriðja aðila.

Með þessu skjali veitir Illumina ekki leyfi samkvæmt einkaleyfi, vörumerki, höfundarrétti eða fordæmisrétti, né öðrum sambærilegum réttindum þriðja aðila. Lesa verður og skilja allt innihald þessa skjals að fullu áður en slík vara eða vörur eru notaðar.

EF ALLAR LEIÐBEININGAR SEM HÉR ER AÐ FINNA ERU EKKI LESNAR OG ÞEIM SÉRSTAKLEGA FYLGT GETUR ÞAÐ LEITT TIL SKEMMDA Á VÖRUNNI/VÖRUNUM, MEIÐSLA Á FÓLKI, ÞAR Á MEÐAL NOTENDUM EDA ÖÐRUM, OG SKEMMDA Á ÖÐRUM EIGNUM OG ÞAÐ MUN ÖGILDA ALLA ÁBYRGÐ SEM GILDIR UM VÖRUNA/VÖRURNAR.

ILLUMINA BER EKKI ÁBYRGÐ Á RANGRI NOTKUN ÞEIRRA VARA SEM HÉR ER LÝST (ÞAR MEÐ TALID EINSTAKA HLUTA EDA HUGBÚNAÐ).

© 2025 Illumina, Inc. Allur réttur áskilinn.

Öll vörumerki eru eign Illumina, Inc. eða viðkomandi eigenda. Sérstakar upplýsingar um vörumerki eru á www.illumina.com/company/legal.html.

Tengiliðaupplýsingar



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornía 92122 Bandaríkin
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (utan Norður-Ameríku)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Ástralskur bakhjarl

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

Vörumerkingar

Til að fá ítarlegt yfirlit yfir tákn sem birtast á umbúðum og merkingum vörunnar, sjá táknaskýringar á support.illumina.com á flípanum *Documentation* (Skjöl) fyrir settið þitt.