

NAUDOTI IN VITRO DIAGNOSTIKAI. TIK EKSPORTUI.

Numatytoji paskirtis

„Illumina“® DNAPrep with Enrichment Dx rinkinys yra reagentų ir eksploatacinių medžiagų rinkinys, naudojamas mėginių bibliotekoms iš genominės DNR, gautos iš žmogaus ląstelių ir audinių, ruošti *in vitro*. Norint paruošti bibliotekas, nukreiptas į konkrečius dominančius genomo regionus, reikalingi naudotojo pateikti zondo skydeliai. Sukurtos mėginių bibliotekos skirtos naudoti „Illumina“ „Illumina“ sekvenavimo sistemose. „Illumina“® „DNA Prep with Enrichment Dx“ apima programinę įrangą, skirtą sekvenavimui, stebėjimui ir analizei.

Procedūros principai

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys skirtas DNR sekos bibliotekoms, prisodrintoms tikslinėms sritims iš žmogaus ląstelių ir audinių gautos genominės DNR, paruoštoms rankiniu būdu.

Tiksliniam sodrinimui reikalingos naudotojo tiekiamos biotinilintos oligonukleotidų grupės. „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys yra suderinama su įvairiais grupių dydžiais, įskaitant mažas grupes (<20 000 zondų) ir dideles grupes (>200 000 zondų). Sukurtos prisodrintos bibliotekos yra skirtos sekvenavimui „Illumina“ sekvenavimo sistemose.

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys procedūrą sudaro šie veiksmi:

- **Žymėjimo genominė DNR** – naudoja Enrichment BLT Small (eBLTS) DNR įvesties žymėjimui. Žymėjimo metu gDNR yra suskaidyta ir pažymėta adapteriais vienu veiksmu. Norint prisotinti žymėjimo eBLTS reakcijoje esančią informaciją, reikia įvesti mažiausiai 50 ng DNR. Kai prisotintas, eBLTS suskaido nustatytą DNR molekulių skaičių, kad būtų sukurtos normalizuotos nuoseklios fragmentų dydžio pasiskirstymo bibliotekos.
- **Valymas po žymėjimo** – išvalo adapteriu pažymėtą DNR, kad eBLTS ją naudotų amplifikacijoje.
- **Stiprinti pažymėtą DNR** – sustiprina pažymėtą DNR, naudodamas riboto ciklo PGR programą. DNR fragmentų galuose pridedami unikalūs dvigubi (UD) indeksai, kurie užtikrina dvigubą unikalų DNR bibliotekų brūkšninį kodavimą ir klasterių generavimą sekvenavimo metu.
- **Bibliotekų valymas** – naudoja granulių valymo procedūrą, kad būtų galima išvalyti ir pasirinkti sustiprintas DNR bibliotekas pagal dydį.
- **Telkinių bibliotekos** – tai DNR bibliotekos su unikaliais indeksais, kurias sudaro 12 bibliotekų. Bibliotekas galima telkti pagal tūrį arba pagal masę.
- **Zondų hibridizavimas** – tai hibridizacijos reakcija, kurios metu dvigrandės DNR bibliotekos yra denatūruojamos, o biotinilintų DNR zondų skydelis hibridizuojamas į tikslinius genomų regionus.
 - „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys yra suderinamas su keliomis plokštėmis. „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys nėra sodrinimo skydelio. Zondų skydelius tiekia naudotojas ir jie turi atitikti reikiamas specifikacijas. „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys Reagentai yra

suderinami tiek su „Illumina“, tiek su trečiosios šalies sodrinimo DNR oligonukleotidų skydeliais, kurie atitinka reikiamas specifikacijas. Informacijos apie būtinas trečiųjų šalių skydelių specifikacijas žr. [Prisodrinimo zondo plokštelės reikalavimai 11 psl.](#)

- **Hibridizuotų zondų fiksavimas** – naudoja Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) biotinilintus zondus, hibridizuotus į tikslines dominančias sritis.
- **Prisodrintų bibliotekų stiprinimas** – naudojamas PGR prisodrintoms bibliotekoms stiprinti.
- **Sustiprintų prisodrintų bibliotekų valymas** – naudojama granulių valymo procedūra prisodrintoms ir sekvenavimui paruoštomis bibliotekoms.
- **Sekoskaita** – prisodrintų bibliotekų sekvenavimas atliekamas naudojant „MiSeqDx™“, „NextSeq 550Dx™“ arba „NovaSeq 6000Dx™“ sekvenavimo sistemas. „MiSeqDx“ atveju integruotas DNR generavimas FASTQ Dx „Local Run Manager“ modulis naudojamas sekvenavimo serijos sąrankai, serijai stebėti ir FASTQ kurti iš bazių identifikavimų. Naudojant „NextSeq 550Dx“ su „DRAGEN Server“ ir „NovaSeq 6000Dx, DRAGEN, skirtą „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ programa naudojama tyrimų serijos sąrankai ir antrinei analizei, naudojant kelias galimas darbo eigas.

Procedūros apribojimai

- Naudoti *in vitro* diagnostikai.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys yra suderinama su žmogaus ląstelių ir audinių genomine DNR.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys yra suderinamas su dvigrandėmis 50–1 000 ng DNR įvestimis. Našumas negarantuojamas, kai įvestys viršija šias ribas.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys neįtraukiami DNR ekstrahavimui skirti reagentai. Analitinių tyrimų rezultatai, įskaitant [Veikimo charakteristikos 58 psl.](#) pateiktus trukdžių tyrimus, buvo gauti naudojant visos sudėties kraują ir FFPE kaip tipinius mėginių tipus su tipiniais DNR ekstrakcijos rinkiniais. Visus diagnostinius tyrimus, sukurtus naudoti su „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys reagentais, reikia visiškai patvirtinti visais veikimo aspektais naudojant pasirinktą DNR ekstrakcijos rinkinį.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys nerekomenduojama naudoti prastos kokybės FFPE mėginiams, kurių $\Delta Cq > 5$. Naudojant mėginius, kurių $\Delta Cq > 5$ gali padidėti bibliotekos paruošimo gedimo tikimybė ir sumažėti tyrimo našumas.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys reagentai buvo sukonfigūruoti ir ištirti dėl mėginio įvesties, sodrinimo reakcijų ir telkinio, nurodyto toliau pateiktoje lentelėje.

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys	Mėginio įvestis	Sodrinimo reakcijos	Sodrinimo kompleksiškas
16 mėginių rinkinys	Prasta kokybė (FFPE)	16 reakcijų	1 pleksas
96 mėginių rinkinys	Aukštos kokybės (pvz., visos sudėties kraujas)	8 reakcijos	12 pleksų

- FFPE įvesties apdorojimas buvo išbandytas ir rekomenduojamas tik 1 plekso sodrinimo reakcijoms, naudojant 16 mėginių rinkinį.
- 96 mėginių rinkinyje galimi nestandartiniai rezginiai (nuo 2 iki 11 pleksų), tačiau turi šiuos apribojimus:
 - Mėginių apdorojimas 2–11 pleksų sodrinimo reakcijose sumažina rinkinio pralaidumą.
 - Optimalūs rezultatai nėra garantuojami. Norint gauti tinkamą sodrinimo išėigą nestandartiniais rezginiais, gali prireikti papildomo optimizavimo.
 - Mažo nerūpestingumo telkimo strategijoms (nuo 2 iki 8 pleksų) norint optimizuoti spalvų balansą, reikia pasirinkti skirtingų sekų indekso adapterius, kad būtų galima sėkmingai atlikti sekvenavimą ir duomenų analizę. „MiSeqDx“ ir „NextSeq 550Dx“ DNR generavimas FASTQ Dx modulis suteikia pagal spalvas subalansuotų indeksų kombinacijų parinktis nustatant vykdymą. Daugiau informacijos apie telkimo strategijas rasite [Telkimo metodai 34 psl.](#)
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys yra tik prisodrintų bibliotekų, kurios yra sekvenuojamos tik „MiSeqDx“, „NextSeq 550Dx“ ir „NovaSeq 6000Dx“. Norint naudoti kitas sekvenavimo sistemas, reikia atlikti išsamų visų veikimo aspektų patvirtinimą.
- Sodrinimo plokštės nėra įtrauktos į šį produktą. Exploatavimo [Veikimo charakteristikos 58 psl.](#) pateikti analitinių tyrimų rezultatai gauti naudojant reprezentatyvius sodrinimo skydelius ir pateikiami tik informaciniais tikslais. Analizinės veikimo charakteristikos padeda parodyti bendrąsias tyrimo galimybes ir nenustato jokių konkrečių tyrimų teiginių galimybių ar tinkamumo. Reikia patikrinti visus visų su šiais reagentais naudoti sukurtų diagnostinių tyrimų veikimo aspektus.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys yra suderinamas tiek su „Illumina“, tiek su trečiųjų šalių sodrinimo plokštėmis. Tačiau trečiųjų šalių sodrinimo skydelių, kurie neatitinka skydelio reikalavimų, veikimas negarantuojamas. Informacijos apie plokštės reikalavimus žr. [Prisodrinimo zondo plokštės reikalavimai 11 psl.](#)
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys naudoja 2 val. hibridizacijos laiką. Ilgesnio hibridizacijos laiko naudojimas gali turėti įtakos našumo metrikai.
- „MiSeqDx“ skirti DNR generavimas FASTQ Dx „Local Run Manager“ moduliai pateikia tik FASTQ failus. Jei naudojate šiuos modulius, turite atlikti antrinės analizės patvirtinimą.

- DRAGEN, skirtą „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“, programą galima rasti „NextSeq 550Dx“ su „DRAGEN Server“ ir „NovaSeq 6000Dx“. Programa palaiko kelias antrinės analizės darbo eigas, įskaitant FASTQ generavimą, FASTQ ir VCF generavimą gemalo variantui aptikti ir FASTQ bei VCF generavimo somatiniam variantui aptikti. Jei naudojate VCF generavimo programą, antrinės analizės patvirtinimo atlikti nereikia. Taikymo apribojimai gali būti tokie:
 - Įvedimai > 18 bp ilgio ir išbraukimai > 21 bp nebuvo patvirtinti.
 - Dideli variantai, įskaitant multinukleotidų variantus (MNV) ir didelius tarpus / iškritas, išvestiniame VCF faile gali būti pateikiami kaip atskiri mažesni variantai.
 - Apie mažus MNV pranešama kaip apie atskirus išvesties VCF failo variantus.
 - Apie iškritas pranešama VCF faile pagal ankstesnės bazės VCF formato koordinatę. Todėl prieš įtraukdami į ataskaitą, kad atskira priskirta bazė yra homozigotinis referentas, patikrinkite greta esančias bazes.
 - Specifiniai genocitų linijos apribojimai:
 - DRAGEN, skirtą „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“, programos „Gemline FASTQ“ ir VCF kartos analizės darbo eiga skirta kokybiniais rezultatais, susijusiems su „Gemline“ varianto priskyrimu (pvz., homozigotiniu, heterozigotiniu, laukiniu).
 - Kopijų skaičiaus kitimas gali turėti įtakos tam, ar variantas identifikuojamas kaip homozigotinis, ar heterozigotinis.
 - Sistema praneš ne daugiau kaip du variantus viename lokuse, net jei yra kopijavimo numerio variacija.
 - Somatiniais variantams taikomi apribojimai
 - DRAGEN, skirtą „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“, programos „Somatic FASTQ“ ir VCF generavimo analizės darbo eiga skirta pateikti kokybinius somatinio varianto priskyrimo rezultatus (t. y. somatinio varianto buvimą).
 - Somatinio FASTQ ir VCF generavimo analizės darbo eiga negali atskirti gemalo ir somatinį variantus. Darbo eiga naudojama norint aptikti variantus plataus intervalo variantų dažniuose, tačiau varianto dažnis negali būti naudojamas norint atskirti somatinius variantus nuo gonocitų linijos variantų.
 - Normalus mėginio audinys turi įtakos variantų aptikimui. Pranešta aptikimo riba yra pagrįsta santykiniu varianto dažniu, nustatytu pagal visą DNR, gautą iš naviko ir normalaus audinio.
 - Jei tame pačiame lokuse priskiriamas daugiau nei vienas varianto alelis, nė vienas alelis nebus nurodomas kaip pereinantys variantai. Vietoje to bus pranešama apie visą alelių rinkinį, bet filtruojama per daugialypę žymą.

Gaminio komponentai

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys sudaro tokie komponentai:

- „Illumina“ „DNA Prep with Enrichment Dx“ su UD indeksų rinkiniu A, katalogo Nr. 20051354 (16 mėginių) arba Nr. 20051352 (96 mėginiai)

- „Illumina“ „DNA Prep with Enrichment Dx“ su UD indeksų rinkiniu B, katalogo Nr. 20051355 (16 mėginių) arba Nr. 20051353 (96 mėginiai)
- „Local Run Manager“ DNR generavimas FASTQ Dx „MiSeqDx“ modulis, katalogo Nr. 20063022
- DRAGEN, skirtą „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ programą, skirtą „NovaSeq 6000Dx“, katalogas Nr. 20074609
- DRAGEN, skirtą „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ programą, skirtą „NextSeq 550Dx“, katalogas Nr. 20074730

Pateikti reagentai

Norint užbaigti tyrimą, „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ reikia „Illumina“ „DNA Prep with Enrichment Dx“ su UD indeksais A arba „Illumina“ „DNA Prep with Enrichment Dx“ su UD indeksų rinkiniu B. Galite atlikti šį bibliotekos paruošimo ir sodrinimo reakcijų skaičių naudodami 16 mėginių arba 96 mėginių rinkinį.

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys	Mėginio įvestis	Sodrinimo reakcijos	Sodrinimo kompleksifikumas
16 mėginių rinkinys	Prasta kokybė (FFPE)	16 reakcijų	1 pleksas
96 mėginių rinkinys	Aukštos kokybės (pvz., visos sudėties kraujas)	8 reakcijos	12 pleksų

„Illumina“ „DNA Prep with Enrichment Dx“ su UD indeksų rinkiniu A/B

„Illumina“ „Prep Dx Tagmentation Reagents 1“, laikyti temperatūroje nuo 15 °C iki 30 °C

Šie reagentai siunčiami kambario temperatūros. Nedelsdami komponentus perkeltkite į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad jie neprarastų savybių.

Reagento pavadinimas	Mėgintuvėlių skaičius		Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
	16 mėginių (Nr. 20050020)	96 mėginiai (Nr. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Raudona	350 µl	Ploviklio tirpalas vandenyje.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Žalia	41 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų.
Cleanup Beads (CB)	1	Netaikoma*	Raudona	10 ml	Kietafazės paramagnetinės granulės buferiniame vandeniniame tirpale.

* Cleanup Beads 96 mėginiai yra įtraukti į „Illumina“ „Prep Dx Cleanup Beads 96“ mėginius (Nr. 20050030).

„Illumina“ „Prep Dx“ valymo granulės (96 mėginiai), laikyti 15 °C iki 30 °C temperatūroje

96 mėginių rinkiniuose Cleanup Beads yra įtraukti į „Illumina“ „Prep Dx“ valymo granules (katalogo Nr. 20050030). Šis reagentas siunčiamas kambario temperatūroje. Nedelsdami komponentus perkeltkite į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad jie neprarastų savybių. 16 mėginių rinkiniuose Cleanup Beads yra įtraukti į „Illumina“ „Prep Dx“ žymėjimo reagentus 1 (katalogo Nr. 20050020).

Reagento pavadinimas	Kiekis	Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
Cleanup Beads (CB)	4	Raudona	10 ml	Kietafazės paramagnetinės granulės buferiniame vandeniniame tirpale.

„Illumina“ „Prep Dx Tagmentation Reagents 2“, laikyti nuo 2 °C iki 8 °C temperatūroje

Šie reagentai siunčiami užšaldyti. Nedelsdami komponentus perkeltkite į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad jie neprarastų savybių. eBLTS Atsarginį mėgintuvėlį laikykite vertikaliai, kad granulės visada būtų panardintos į buferį.

Reagento pavadinimas	Mėgintuvėlių skaičius		Dangtelio spalva	Užpildymo tūris		Veikliosios medžiagos
	16 mėginių (Nr. 20050021)	96 mėginiai (Nr. 20050026)		16 mėginių	96 mėginiai	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Geltona	200 µl	290 µl	Streptavidino magnetinės granulės, susijusios su transposomais buferiniame vandeniniame tirpale, kuriame yra glicerolio, EDTA, ditiotritolio, druskos ir ploviklio.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Skaidri	1,8 ml	1,8 ml	Buferinis vandeningas tirpalas.

„Illumina“ „Prep Dx Tagmentation Reagents 3“, laikyti nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje

Šie reagentai siunčiami užšaldyti. Nedelsdami komponentus perkeltkite į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad jie neprarastų savybių.

Reagento pavadinimas	Mėgintuvėlių skaičius		Dangtelio spalva	Užpildymo tūris		Veikliosios medžiagos
	16 mėginių (Nr. 20050022)	96 mėginiai (Nr. 20050027)		16 mėginių	96 mėginiai	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Skaidri	290 µl	290 µl	Buferinis vandeningas tirpalas, kuriame yra magnio druskos ir dimetilformamido.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Skaidri	200 µl	610 µl	DNR polimerazė ir dNTP buferiniame vandeniniame tirpale.

„Illumina“ „DNR Prep Dx“ sodrinimo reagentai 1 (16 mėginių), laikyti 2 °C iki 8 °C temperatūroje

16 mėginių rinkinių DNR „Illumina“ „Prep Dx“ sodrinimo reagentuose 1 (katalogo Nr. 20050023) yra šie reagentai. 96 mėginiai rinkinių reagentai yra įtraukti į „Illumina“ „Prep Dx“ sodrinimo reagentus 1 (katalogo Nr. 20050028).

Šie reagentai siunčiami užšaldyti. Nedelsdami komponentus perkeltkite į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad jie neprarastų savybių.

Reagento pavadinimas	Mėgintuvėlių skaičius	Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Skaidri	1,2 ml	Streptavidino magnetinės granulės buferiniame vandeniniame tirpale, kuriame yra formamido, ploviklio ir druskos.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Skaidri	1,8 ml	Buferinis vandeninis tirpalas.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Skaidri	200 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Skaidri	200 µl	Buferinis vandeninis tirpalas.

„Illumina“ „Prep Dx“ sodrinimo reagentai 1 (96 mėginiai), laikyti 2 °C iki 8 °C temperatūroje

96 mėginių rinkiniuose į „Illumina“ 1 „Prep Dx“ sodrinimo reagentus (katalogo Nr. 20050028) įtraukiami šie reagentai. 16 mėginių rinkinių reagentai yra įtraukti į „Illumina“ DNR Prep Dx“ sodrinimo reagentus 1 (katalogo Nr. 20050023).

Šie reagentai siunčiami užšaldyti. Nedelsdami komponentus perkeltkite į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad jie neprarastų savybių.

Reagento pavadinimas	Mėgintuvėlių skaičius	Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Skaidri	1,2 ml	Streptavidino magnetinės granulės buferiniame vandeniniame tirpale, kuriame yra formamido, ploviklio ir druskos.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Skaidri	1,8 ml	Buferinis vandeninis tirpalas.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Skaidri	200 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Skaidri	200 µl	Buferinis vandeninis tirpalas.

„Illumina“ „DNR Prep Dx“ sodrinimo reagentai 2, laikyti -25 °C iki -15 °C temperatūroje

Šie reagentai siunčiami užšaldyti. Nedelsdami komponentus perkeltkite į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad jie neprarastų savybių.

Reagento pavadinimas	Mėgintuvėlių skaičius		Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
	16 mėginių (Nr. 20050024)	96 mėginiai (Nr. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Skaidri	580 µl	Ploviklio tirpalas vandenyje.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Geltonas	4,1 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų ir ploviklio.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Skaidri	320 µl	PGR pradmenų (oligonukleotidų) mišinys.
2N NaOH (HP3)	1	1	Skaidri	200 µl	2N natrio hidroksido (NaOH) tirpalas.

Reagento pavadinimas	Mėgintuvėlių skaičius		Dangtelio spalva	Užpildymo tūris	Veikliosios medžiagos
	16 mėginių (Nr. 20050024)	96 mėginiai (Nr. 20050029)			
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Mėlyna	480 µl	Buferinis vandeninis tirpalas su Cot-1 DNR, perpildyta medžiaga ir formamidu
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Skaidri	200 µl	DNR polimerazė ir dNTP buferiniame vandeniame tirpale.

„Illumina“ Unikalus dviejų indeksų Dx rinkinys A/B, laikomas temperatūroje nuo -25 °C iki -15 °C

Šie reagentai siunčiami užšaldyti. Nedelsdami komponentus perkelkite į laikymo vietą, kurioje palaikoma nurodyta temperatūra, kad jie neprarastų savybių. Indekso adapterio sekų ieškokite [Priedas: „Illumina“ UD indeksų adapterio sekos 63 psl.](#)

Komponentas	Kiekis
„Illumina“ Unikalus dviejų indeksų Dx rinkinys A (96 indeksai), Nr. 20050038	1
„Illumina“ Unikalus dviejų indeksų Dx rinkinys B (96 indeksai), Nr. 20050039	1

Reagentai (nepateikti)

Reikalingi reagentai (nepateikti)

- DNR ekstrahavimo ir valymo reagentai
- DNR kiekybinio nustatymo reagentai
- Etanolis (200 stiprumo molekulinės biologijos reikmėms)
- Vanduo be branduolių
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 1N NaOH tirpalas, molekulinės biologijos laipsnis
- Jei naudojama „NextSeq 550Dx“ sekvenavimo sistema:
 - 200 mM Tris, pH 7,0 (galima praskiesti nuo 1 M Tris-HCL, pH 7,0)

- „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinys v2.5 (300 ciklų), (katalogo Nr. 20028871)
- Jei naudojate „MiSeqDx“ sekvenavimo sistemą:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalogo Nr. 20037124)
- Jei naudojate „NovaSeq 6000Dx“ sekvenavimo sistemą:
 - 400 mM Tris, pH 8,0 (galima praskiesti nuo 1 M Tris-HCL, pH 8,0)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (katalogo Nr. 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (katalogo Nr. 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalogo Nr. 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalogo Nr. 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalogo Nr. 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (katalogo Nr. 20062291)

Prisodrinimo zondo plokštelės reikalavimai

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys reagentai yra suderinami ir su „Illumina“, ir su trečiųjų šalių sodrinimo DNR oligonukleotidų plokštelėmis. Jei naudojate trečiųjų šalių biotinilintus DNR zondus (fiksiuotus arba pasirinktinius skydelius), įsitikinkite, kad jie atitinka reikiamas specifikacijas.

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys buvo optimizuotas ir patvirtintas naudojant toliau nurodytas trečiųjų šalių plokštelių specifikacijas. Palyginamas našumas negarantuojamas naudojant trečiųjų šalių plokšteles, kurios neatitinka specifikacijų.

- 80 bp arba 120 bp zondo ilgis
- Nuo 500 iki 675 000 zondų
- Viengrandė arba dvigrandė DNR
- Bendra zondo įvestis ≥ 3 pmols sodrinimui esant rezginiams nuo 1-plekso iki 12-pleksų

Laikymas ir naudojimas

- Kambario temperatūra yra nuo 15 °C iki 30 °C.
- Reagentai išlieka stabilūs, jei jie laikomi nurodytomis sąlygomis, iki nurodytos galiojimo pabaigos datos, nurodytos ant rinkinių etikečių. Informacijos apie laikymo temperatūrą žr. [Pateikti reagentai 5 psl.](#)
- Užšaldyti reagentai išlieka stabilūs ne ilgiau kaip keturis užšaldymo ir atšildymo ciklus, kurie vyksta iki nurodytos galiojimo pabaigos datos.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys procedūrą sudaro šie saugūs sustojimo taškai:
 - Po [Stiprinti pažymėtą DNR 29 psl.](#), amplifikuotos bibliotekos yra stabilios iki 30 dienų, kai laikomos temperatūroje nuo -25 °C iki -15 °C.

- [Bibliotekų valymas 32 psl.](#), išvalytos amplifikuotos bibliotekos išlieka stabilios iki 30 dienų, kai yra laikomos temperatūroje nuo -25 °C iki -15 °C.
- Po [Iš anksto prisodrintų bibliotekų telkinys 34 psl.](#) susietos bibliotekos yra stabilios iki 30 dienų, kai yra laikomos temperatūroje nuo -25 °C iki -15 °C.
- Po [Sustiprinti prisodrintą biblioteką 44 psl.](#), prisodrintų, amplifikuotų bibliotekų plokštelė ant termociklerio gali likti iki 24 val. Taip pat plokštelę 2–8 °C temperatūroje galima laikyti iki 48 val.
- Galutines išvalytas prisodrintas bibliotekas galima laikyti temperatūroje nuo -25 °C iki -15 °C iki 7 dienų.
- Jei kokios nors „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys pakuotės ar komponentai yra pažeisti ar sugadinti, keipkitės į „Illumina“ klientų aptarnavimo skyrių.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) gali sudaryti matomas nuosėdas arba kristalus. Jei pastebima nuosėdų, 10 min. įkaitinkite 37 °C temperatūroje, tada maišykite sūkuriniu maišytuvu, kol nuosėdos ištirps.
- Hybridization Oligos (HYB) ir Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) reikia iš anksto įkaitinti iki tos pačios temperatūros, kokia yra taikoma kiekvienam mėginio tipui ir zondo skydeliui skirta hibridizacijos palaikymo temperatūra. Daugiau informacijos apie HYB ir EEW tvarkymą žr. skyrių [Procedūros pastabos 17 psl.](#)
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) ir HYB Buffer+IDT NXT blokatoriai (NHB2) gali sukurti kristalus ir drumstumą. Jei pastebimi kristalai ir drumstumas, išmaišykite sūkuriniu maišytuvu arba traukdami pipete maišykite aukštyn ir žemyn, kol tirpalas bus skaidrus. Prieš traukdami pipete būtinai įkaitinkite NHB2.
- Tvarkydami Cleanup Beads (CB), laikykitės šių geriausios praktikos pavyzdžių:
 - Niekada neužšaldykite granulių.
 - Prieš naudodami granules, jas išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, kol gausite tinkamą suspensiją ir spalva taps vienalytė.
- Tvarkydami Enrichment BLT Small (eBLTS), laikykitės šių geriausios praktikos pavyzdžių:
 - eBLTS mėgintuvėlį laikykite vertikaliai, kad granulės visada būtų panardintos į buferį.
 - eBLTS kruopščiai išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, kol granulės bus vėl suspenduotos. Kad granulės vėl nebūtų perkeltos, centrifuguoti prieš lašinant pipete nerekomenduojama.
 - Jei granulės yra prilipusios prie 96 šulinėlių plokštelės šono arba viršaus, centrifuguokite 280 × g 3 sek., tada pipete resuspenduokite.
- Tvarkydami indekso adapterio plokšteles, laikykitės šių geriausios praktikos pavyzdžių:
 - Nedėkite mėginių į indekso adapterių plokštelę.
 - Kiekviena indeksinės plokštelės duobutė skirta naudoti tik vieną kartą.

Reikalinga įranga ir medžiagos – nepridėta

Be „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys, prieš pradėdami protokolą įsitikinkite, kad turite reikiamą įrangą ir medžiagas.

Įranga

Prieš pradėdami vykdyti protokolą, įsitikinkite, kad turite reikalingą įrangą.

Protokolas buvo optimizuotas ir patvirtintas naudojant elementus su išvardytomis specifikacijomis. Palyginamas našumas negarantuojamas naudojant įrangą, kuri neatitinka specifikacijų.

Kai kurie elementai reikalingi tik konkrečioms darbo eigoms. Šie elementai yra nurodyti atskirose lentelėse.

- Toliau nurodytų specifikacijų termocikleris.
 - Šildomas dangtis
 - Mažiausias temperatūros kontrolės diapazonas nuo 10 °C iki 98 °C
 - Mažiausias $\pm 0,25$ °C temperatūros tikslumas
 - Didžiausias reakcijos tūris 100 μ l
 - Suderinama su 96 duobučių viso pločio padėklo PGR plokštelėmis
- Mikromėginio inkubatorius su šiomis specifikacijomis:
 - Aplinkos temperatūros diapazonas nuo +5,0 °C iki 99,0 °C
 - Suderinama su 96 šulinėlių MIDI plokštelėmis
- Mikromėginio inkubatoriaus įdėklai suderinami su 96 šulinėlių MIDI plokštelėmis
- Didelės spartos mikroplokštelių kratytuvas, kurio maišymo greitis yra 200–3 000 aps./min.
- Magnetinis stovas suderinamas su 96 šulinėlių PGR plokštelėmis
- Magnetinis stovas suderinamas su 96 šulinėlių MIDI plokštelėmis
- Fluorometras suderinamas su jūsų kiekybinio įvertinimo metodu
- DNR fragmentų analizatorius
- Tiksliosios pipetės:
 - 10 μ l vieno kanalo ir daugiakanalės pipetės
 - 20 μ l vieno kanalo ir daugiakanalės pipetės
 - 200 μ l vieno kanalo ir daugiakanalės pipetės
 - 1 000 μ l vieno kanalo pipetės
 - Tikslios pipetės užtikrina tikslų reagento ir mėginio pristatymą. Vieno kanalo arba kelių kanalų pipetės galima naudoti, jei jos reguliariai kalibruojamos ir tikslios 5 % nurodytos apimties.
- Mikroplokštelių centrifuga
- Mikrocentrifuga
- Viena iš šių „Illumina“ sekvenavimo sistemų:
 - „MiSeqDx“ prietaisas, katalogo Nr. DX-410-1001
 - „NextSeq 550Dx“ prietaisas, katalogo Nr. 20005715 su pasirenkamu „Illumina DRAGEN Server“, skirtu „NextSeq 550Dx“, katalogo Nr. 20086130
 - „NextSeq 6000Dx“ prietaisas, katalogo Nr. 20068232

- [Pasirinktinai] Vakuumo koncentratorius
- [FFPE] PGR aptikimo realiuoju laiku sistema

Medžiagos

Prieš pradėdami protokolą įsitikinkite, kad turite reikiamų medžiagų.

Kai kurie elementai reikalingi tik konkrečioms darbo eigoms. Šie elementai yra nurodyti atskirose lentelėse.

Protokolas buvo optimizuotas ir patvirtintas naudojant išvardytus elementus. Palyginamas našumas negarantuojamas naudojant alternatyvias medžiagas.

- Filtruoti pipetės antgaliai
- Kūginiai centrifugavimo mėgintuvėliai, 15 ml arba 50 ml
- Mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai, 1,5 ml
- RNazės / DNazės neturintys daugiakanaliai reagentų rezervuarai, vienkartiniai
- RNazės / DNazės neturinčios 8 mėgintuvėlių juostelės ir dangteliai
- Serologinės pipetės
- 96 šulinėlių polipropileno giliųjų šulinėlių laikymo plokštelė, 0,8 ml (MIDI plokštelė)
- „Hard-Shell“ 96 šulinėlių viso pločio padėklo PGR plokštelės
- [FFPE] qPCR plokštelės, suderinamos su qPCR instrumentu
- Klijų sandarikliai 96 šulinėlių plokštelėms su šiomis specifikacijomis:
 - Nulupamas, optiškai skaidrus poliesteris
 - Tinka uždengtomis PGR plokštelėms
 - Stiprūs klijai, atlaikantys kelis temperatūros pokyčius nuo –40 °C iki 110 °C
 - Be DNazės / RNazės
- Plastikinės eksploatacinės medžiagos, suderinamos su pasirinktu kiekybinio įvertinimo metodu
- Fluorometrinis dsDNR kiekybinio įvertinimo rinkinys, suderinamas su pasirinkta kiekybinio įvertinimo sistema:
 - Iš anksto prisodrintoms sustiprintoms bibliotekoms kiekybiškai įvertinti galima naudoti platų kiekybinio įvertinimo rinkinį.
 - Vertinant prisodrintas bibliotekas, kiekybinio įvertinimo rinkinio diapazonas priklauso nuo naudojamo zondo skydelio.
- Fragmentų analizės rinkinys, skirtas bibliotekų kvalifikacijai su pasirinkta kvalifikacijų sistema:
 - Kvalifikuojančioms iš anksto prisodrintoms sustiprintoms bibliotekoms galima naudoti plataus asortimento rinkinį.
 - Kvalifikuotoms prisodrintoms bibliotekoms kvalifikacijų rinkinio asortimentas priklauso nuo naudojamo zondo skydelio.

- [Pasirinktinis] DNR ekstrahavimo iš žmogaus ląstelių ir audinių rinkinys. Galima naudoti bet kurį patvirtintą ekstrahavimo metodą.

Mėginių surinkimas, transportavimas ir laikymas



DĖMESIO!

Su visais mėginiais elkitės taip, tarsi jie būtų potencialios infekcinės medžiagos.

- Šis tyrimas yra suderinamas su genomine DNR, gauta iš žmogaus ląstelių ir audinių.
- Rinkoje parduodamos išgrynintos gDNR atveju įsitikinkite, kad mėginiai buvo vežami tinkamomis sąlygomis ir laikomi pagal gamintojo instrukcijas. Laikykitės gerosios praktikos, susijusios su gDNR laikymo ir atšildymo ciklais.
- Norėdami įvesti visą kraują, laikykitės kraujo paėmimo, transportavimo ir laikymo reikalavimų, taikomų pasirinktam DNR ekstrahavimo metodui. Galima naudoti bet kurį patvirtintą ekstrahavimo metodą. Visos sudėties kraujo transportavimo procedūra turi atitikti visus taikomus valstybės institucijų reikalavimus, reglamentuojančius etiologinių medžiagų transportavimą.
- DNR ekstrahavimui iš FFPE audinio galima naudoti bet kokį patvirtintą ekstrahavimo metodą. Laikykitės pasirinktų ekstrahavimo metodo naudojimo instrukcijų ir rekomendacijų, kad nustatytumėte šias praktikas:
 - Formalino fiksavimas ir parafino įterpimo metodas audiniams, siekiant užtikrinti geriausią išskirtos DNRkokybę.
 - FFPE mėginių saugojimas.
 - Pradiniai medžiagos reikalavimai, pvz., FFPE sekcijų skaičius ir storis. Dauguma valymo metodų rekomenduoja naudoti šviežiai nukirptas dalis.

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys reagentuose yra galimai pavojingų cheminių medžiagų. Pavojus žmogui kyla pavojingų medžiagų įkvėpus, nurijus, patekus ant odos ir į akis. Dėvėkite tinkamai nuo pavojaus saugančias apsaugines priemones, įskaitant akių apsaugos priemones, pirštines ir laboratorinį chalātą. Su panaudotais reagentais elkitės kaip su cheminėmis atliekomis ir utilizuokite laikydamiesi taikomų regiono, nacionalinių ir vietinių įstatymų bei teisės aktų. Su aplinkosauga, sveikatos apsauga ir saugumu susijusios papildomos informacijos ieškokite saugos duomenų lapuose (SDL) adresu support.illumina.com/sds.html.
- Apie rimtus nelaimingus atsitikimus, susijusius su šiuo gaminiu, nedelsdami praneškite įmonei „Illumina“ bei šalių narių, kuriose gyvena naudotojas ir pacientas, kompetentingoms institucijoms.
- Su visais kraujo mėginiais dirbkite taip, tarytum būtų žinoma, kad jie yra užkrėsti žmogaus imunodeficito virusu (ŽIV), žmogaus hepatito B virusu (HBV) ir kitais krauju pernešamais patogeniniais agentais (bendros atsargumo priemonės).

- Laikykitės įprastų laboratorinių atsargumo priemonių. Nesiurbkite pipetės burna. Darbo vietoje nevalgykite, negerkite ir nerūkykite. Dirbdami su mėginiais ir rinkinių reagentais mūvėkite vienkartinės pirštines bei dėvėkite laboratorinį chalātą. Baigę dirbti su mėginiais ir rinkinių reagentais, kruopščiai nusiplaukite rankas.
- Kad nepakenktumėte mėginių ar reagentų kokybei, prieš pradėdami vykdyti protokolą įsitikinkite, kad visi natrio hipochlorito garai, susidarę valant, visiškai išsiskleidė.
- Mėginių užteršimas kitais PGR produktais / amplikonais gali sukelti netikslus ir nepatikimus rezultatus. Norėdami išvengti užteršimo, laikykitės šių geriausios praktikos pavyzdžių:
 - Naudokitės tinkama laboratorine praktika ir laikykitės laboratorinės higienos.
 - Atlikite darbo eigos veiksmus nurodytose išankstinės ar vėlesnės amplifikacijos srityse.
 - Panaudotus reagentus išankstinės amplifikacijos srityje laikykite prieš išvalydami bibliotekas.
 - Išankstinės amplifikacijos reagentus atskirkite nuo vėlesnės amplifikacijos reagentų.
 - Kad išvengtumėte užteršimo, pasirūpinkite, kad prieš amplifikaciją ir po jos būtų naudojama specialioji įranga (pvz., pipetės, pipetinių antgalių, maišytuvai ir centrifugos).
- Vengti kryžminės taršos Tarp mėginių ir dozavimo reagentų naudokite šviežius pipetinių antgalius. Filtruotų antgalių naudojimas sumažina amplikono pernešimo ir kryžminio mėginio užteršimo riziką.
 - Pridėdami arba perkeldami mėginius arba reagentų reakcijos mišinius, pakeiskite kiekvieno mėginio antgalius.
 - Pridėdami indekso adapterius daugiakanale pipete, pakeiskite antgalius tarp kiekvienos eilutės arba stulpelio. Jei naudojate vieno kanalo pipetę, pakeiskite kiekvieno mėginio antgalius.
 - Nepanaudotas indekso adapterio plokšteles išimkite iš darbo zonos.
- Etanolio plovimo etapuose laikykitės tokios geriausios praktikos:
 - Visada paruoškite šviežio 80 % etanolio. Etanolis gali absorbuoti vandenį iš oro, o tai gali turėti įtakos rezultatams.
 - Plovimo metu įsitikinkite, kad visas etanolis yra pašalintas iš šulinėlių apačios. Likęs etanolis gali paveikti rezultatus.
 - Laikykitės nustatyto magnetinio stovo žingsnių džiovinimo laiko, kad užtikrintumėte visišką garavimą. Likęs etanolis gali turėti įtakos vėlesnių reakcijų veikimui.
- Prieš naudodami visada paruoškite pagrindinius mišinius ir niekada nelaikykite kombinuotų darbo tirpalų.
- Kai procedūrų nesilaikoma, kaip nurodyta pakuotės lapelyje, jų veiksmingumas „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys negarantuojamas.
- Nenaudokite jokių rinkinio komponentų, jei jų galiojimo laikas, nurodytas tyrimo dėžutės etiketėje, pasibaigęs.
- Nekeiskite rinkinio komponentų iš skirtingų „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinių. Rinkiniai nurodyti rinkinio etiketėje.

Procedūros pastabos

DNR įvesties rekomendacijos

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys Protokolas yra suderinamas su aukštos kokybės 50–1 000 ng dvigrandėmis genominėmis DNR (gDNR) įvestimis.

Įsitikinkite, kad pradiniam gDNR mėginyje nėra > 1 mM EDTA ir jame nėra organinių teršalų, pvz., fenolio ir etanolio. Šios medžiagos gali trukdyti žymėjimo reakcijai ir sukelti tyrimo gedimą.

gDNR įvestis $\geq$ 50 ng

Jei DNR įvestis yra nuo 50 iki 1 000 ng, pradinio gDNR mėginio apskaičiuoti ir normalizuoti nereikia.

gDNR įvestis < 50 ng

Galima naudoti 10–50 ng DNR įvestis, atliekant šiuos koregavimus:

- Jei naudojama 10–49 ng gDNR įvestis, rekomenduojama kiekybiškai įvertinti pradinį gDNR mėginį, kad būtų galima nustatyti PGR ciklą, reikalingą po žymėjimo, skaičių. Norėdami kiekybiškai įvertinti dvigrandę gDNR įvestį, naudokite fluorometrinį metodą. Venkite būdų, kuriais matuojama bendra nukleorūgštis, pvz., „NanoDrop“ ar kitų UV sugeriamumo būdų.
- Šis protokolas nenormalizuoja galutinės iš anksto prisodrintos bibliotekos išeigos nuo 10 iki 49 ng gDNA, todėl prieš ir po prisodrinimo reikia kiekybiškai įvertinti ir normalizuoti bibliotekas.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys buvo charakterizuota ir patikrinta 50–1 000 ng DNR įvestims. Negalima garantuoti lygiavertio produkto veiksmingumo, jei gDNR įvestis < 50 ng.

Kraujo įvedimo rekomendacijos

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys yra suderinamas su gDNR, išgauta iš periferinio viso kraujo. Galima naudoti bet kurį patvirtintą ekstrahavimo metodą. Išskiriant gDNA iš viso kraujo, nereikia atlikti pradinio įvestos DNR kiekybinio įvertinimo ir gaunama „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys normalizuota iš anksto prisodrinta biblioteka.

Šie veiksniai gali neigiamai paveikti DNR kiekį, gautą iš viso kraujo mėginių, todėl bibliotekos normalizavimas:

- Kraujo mėginio amžius
- Laikymo sąlygos
- Pagrindinės sveikatos būklės, turinčios įtakos baltųjų kraujo kūnelių skaičiui

FFPE audinio mėginio įvesties rekomendacijos

Naudokite šiuos FFPE DNR kokybės kriterijus, kad nustatytumėte tinkamą įvestį sėkmingam bibliotekos paruošimui:

- FFPE mėginiams, kurių ΔCq vertė ≤ 5 , rekomenduojama DNR įvestis yra 50–1 000 ng.
- „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ nerekomenduojama naudoti prastos kokybės FFPE mėginiams, kurių $\Delta Cq > 5$. Galima naudoti mėginius, kurių $\Delta Cq > 5$, tačiau gali padidėti bibliotekos paruošimo gedimo tikimybė arba sumažėti tyrimo našumas.

FFPE ekstrahavimas

Naudokite nukleorūgšties izoliavimo metodą, kuris sukuria didelį išeiginį kiekį, sumažina mėginio suvartojimą ir išsaugo mėginio vientisumą. Galite naudoti bet kurį patvirtintą DNR ekstrahavimo iš FFPE mėginių metodą. Išskiriant gDNA iš FFPE audinio, nereikia atlikti pradinio įvestos DNR kiekybinio įvertinimo ir gaunama „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys normalizuota iš anksto prisodrinta biblioteka.

FFPE DNR kvalifikacija

Prieš naudojant iš FFPE audinio išskirta gDNR turi būti tinkama. Siekiant optimalaus veikimo, įvertinkite DNR mėginio kokybę naudodami patvirtintą iš FFPE mėginių išgautos DNR priskyrimo metodą. „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys Protokolas yra suderinamas su FFPE DNR mėginiais, kurių ΔCq vertė ≤ 5 . „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys Nerekomenduojama naudoti prastos kokybės FFPE mėginiams, kurių $\Delta Cq > 5$. Galima naudoti mėginius, kurių $\Delta Cq > 5$, tačiau gali padidėti bibliotekos paruošimo gedimo tikimybė arba sumažėti tyrimo našumas.

[Pasirinktinai] FFPE etaloniniai mėginiai

Atlikdami protokolą naudokite apibūdintas etalonines medžiagas, pvz., „Horizon HD799“ (DNR), kaip teigiamą kontrolę. Priskirtos FFPE medžiagos iš ląstelių linijos, gautos iš ksenografų, taip pat gali būti naudojamos kaip etaloniniai mėginiai. Prieš naudodami fluorometrinio metodu kiekybiškai įvertinkite pamatines medžiagas.

PASTABA Naudojant teigiamą kontrolinį mėginį arba neigiamą kontrolinį mėginį, vartojami reagentai ir sumažėja bendras nežinomų mėginių, kuriuos galima apdoroti, skaičius.

Rekomendacija dėl mėginio įvesties

Mėginių įvesties rekomendacijos yra „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys apibendrintos toliau pateiktoje lentelėje.

1 lentelė Rekomendacija dėl mėginio įvesties

Mėginio įvesties tipas	Mėginio įvesties suma	Reikalingas įvesties DNR kiekybinis įvertinimas	Reikiama DNR įvesties kokybė	Normalizuotos iš anksto prisodrintos bibliotekos išeigos
gDNR	10–49 ng	Taip	260/280 santykis 1,8–2,0	Ne

Mėginio įvesties tipas	Mėginio įvesties suma	Reikalingas įvesties DNR kiekybinis įvertinimas	Reikiama DNR įvesties kokybė	Normalizuotos iš anksto prisodrintos bibliotekos išeigos
gDNR	50–1 000 ng	Ne	260/280 santykis 1,8–2,0	Taip
gDNR iš kraujo	50–1 000 ng	Ne	260/280 santykis 1,8–2,0	Taip
gDNR iš FFPE	50–1 000 ng	Taip	ΔCq vertė ≤ 5	Ne

PGR eBLTS programos rekomenduojami PGR ciklai koreguojami atsižvelgiant į mėginio įvesties koncentraciją ir kokybę. Daugiau informacijos žr. [Stiprinti pažymėtą DNR 29 psl.](#)

Patarimai ir darbo metodai

Stenkitės išvengti taršos

- Pridėdami arba perkeldami mėginius, pakeiskite *kiekvieno mėginio antgalius*.
- Pridėdami indekso adapterius daugiakanale pipete, pakeiskite antgalius tarp *kiekvienos eilutės* arba *stulpelio*. Jei naudojate vieno kanalo pipetę, pakeiskite kiekvieno mėginio antgalius.

Plokštelės sandarinimas

- Prieš atlikdami toliau nurodytus protokolo veiksmus, guminiu voleliu visada užsandarinkite 96 šulinėlių plokštelę nauju lipniu sandarikliu, kad padengtumėte plokštelę:
 - Lenkimo veiksmas
 - Inkubacijos veiksmas. Netinkamai užsandarinus plokštelę, inkubacijos metu skystis gali išgaruoti.
 - Centrifugavimo veiksmas
 - Hibridizavimo veiksmas
- Įsitikinkite, kad kraštai ir šulinėliai yra visiškai užsandarinti, kad sumažėtų kryžminio užteršimo ir išgaravimo rizika.
 - Jei ant plokštelės šulinėlių sandariklio ar šonų pastebima skysčio ar kondensato, prieš atidarydami centrifuguokite pagal poreikį.
- Plokštelę padėkite ant lygaus paviršiaus ir lėtai nuimkite plėvelę.

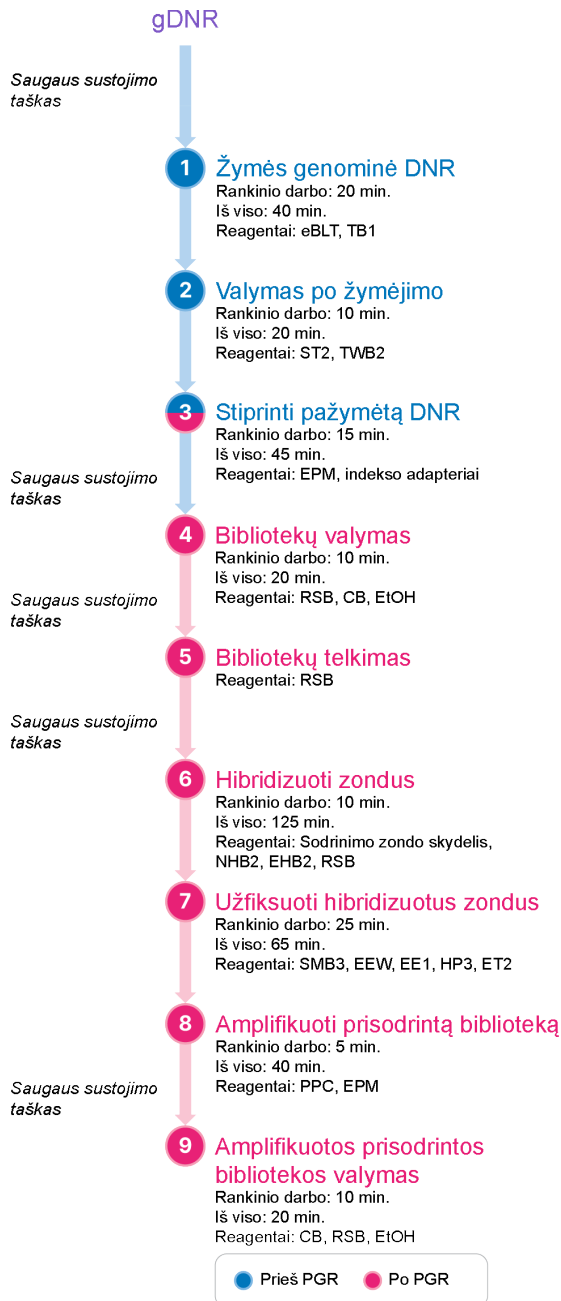
Naudojimas Enrichment BLT Small (eBLTS)

- eBLTS atsarginį mėgintuvėlį laikykite vertikaliai šaldytuve, kad granulės visada būtų panardintos į buferį.
- Prieš pat naudojimą kruopščiai išmaišykite eBLTS atsarginį mėgintuvėlį, kol granulės bus resuspenduotos. Kad granulės vėl nebūtų perkeltos, centrifuguoti prieš lašinant pipete nerekomenduojama.

- Jei granulės yra prilipusios prie 96 šulinėlių plokštelės šono arba viršaus, centrifuguokite $280 \times g$ 3 sek., tada pipete resuspenduokite.
- PlaudamieBLTS:
 - Plokštei naudokite tinkamą magnetinį stovą.
 - Plokštelę laikykite ant magnetinio stovo, kol instrukcijose bus nurodyta ją išimti.
 - Jei granulės įsiurbiamos į pipetės antgalius, sulašinkite atgal į plokštelę ant magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 min.).

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys Darbo eiga

Toliau pateiktoje diagramoje pavaizduota „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys darbo eiga. Saugūs sustojimo taškai pažymėti tarp žingsnių. Laiko skaičiavimai grindžiami 12 mėginių apdorojimu 12 pleksų sodrinimu.



Naudojimo instrukcija

Šiame skyriuje aprašomas „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys protokolas.

- Peržiūrėkite planuojamą išsamią sekoskaitos darbo eigą nuo mėginio iki analizės, kad užtikrintumėte produktų ir eksperimento parametrų suderinamumą.
- Prieš tęsdami patvirtinkite rinkinio turinį ir įsitikinkite, kad turite reikiamų komponentų, įrangos ir medžiagų.
 - Trečiųjų šalių biotinilinti zondai turi atitikti konkrečius reikalavimus. Norėdami įsitikinti, kad trečiosios šalies zondai atitinka reikalavimus, žr. [Prisodrinimo zondo plokštelės reikalavimai 11 psl.](#)
- Laikykitės protokolo nurodyta tvarka, naudodami nurodytus tūrius ir inkubacijos parametrus.
- Jei protokole nenurodytas saugaus sustojimo taškas, nedelsdami pereikite prie kito veiksmo.
- Kuriant pagrindinį mišinį, perviršis įtraukiamas į pateiktus tūrius.
- Būtinai naudokite tinkamą magnetinį stovą savo plokštelės tipui.

Pasiruošimas telkimui

Šis žingsnis reikalingas siekiant užtikrinti sėkmingą prisodrintų bibliotekų sekvenavimą. Bibliotekų telkimas gali įvykti prieš prisodrinimą ir prieš sekvenavimą.

Prieš prisodrinimą – atskiros indeksuotos sustiprintos bibliotekos, sujungiamos, kad būtų prisodrintos su pasirinktu zondo skydeliu. Tai sukuria daugialypį prisodrintų bibliotekų telkinį. FFPE mėginio įvedimui apdorojimas buvo išbandytas ir rekomenduojamas tik 1-plekso sodrinimo reakcijoms. Aukštos kokybės gDNR, buvo išbandytas su 12 pleksų, bet galima naudoti 2 arba 11 pleksų.

Prieš sekvenavimą 1 plekso prisodrintos bibliotekos ir (arba) daugialypės bibliotekos sujungiamos kartu prieš sekvenavimą. Prisodrintų bibliotekų, kurios gali būti sekvenuojamos, skaičius priklauso nuo kiekvieno mėginio tikslinio nuskaitymo gylio jūsų sekvenavimo sistemoje.

Unikalus dvigubas indeksavimas

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys naudoja unikalius dvigubus indeksus.

- Dvigubai indeksuotos bibliotekos prideda 1 indekso (i7) ir 2 indekso (i5) sekas, kad sukurtų unikaliai pažymėtas bibliotekas.
- UD indeksai turi skirtingas, nesusijusias indeksų sekas i7 ir i5 indeksų nuskaitymui. Indeksai yra 10 bazių ilgio.

Indeksų adapterių su įvairiomis sekomis pasirinkimas susietoms bibliotekoms optimizuoja spalvų balansą, kad būtų galima sėkmingai atlikti sekvenavimą ir duomenų analizę. Pleksų telkiniai, kurie yra ≥ 10 pleksų, iš esmės yra subalansuoti pagal spalvą, todėl galite naudoti bet kokį indekso adapterio derinį. Sekvenavimo metu DNR generavimas FASTQ Dx „Local Run Manager“ modulyje pateikiamos pagal spalvą subalansuotų indeksų derinių parinktys ir pranešama, jei pasirinktų indeksų derinių įvairovė yra nepakankama.

Informacijos apie „Illumina“ UD indekso adapterio sekas ir plokštelių išdėstymus žr. [Priedas: „Illumina“ UD indeksų adapterio sekos 63 psl.](#)

Palaikomi sodrinimo pleksai

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys reagentai konfigūruojami ir tiriami naudojant 1 ir 12 pleksų sodrinimo kompleksškumą. Nors galimi ir kiti sodrinimo pleksai, kai kuriems pleksams reikia papildomo išankstinio sodrinimo bibliotekos paruošimo ir sodrinimo zondų skydelio reagentų.

Norint gauti tinkamą prisodrinimo kompleksškumą nestandartiniam prisodrinimui, gali prireikti papildomo optimizavimo. Optimalūs rezultatai nėra garantuojami.

- **Sodrinimo kompleksškumas** – prisodrintų bibliotekų (1–12) telkimas į vieną sodrinimo reakciją hibridizacijai su sodrinimo zondo grupėmis. Pavyzdžiui, derinant 12 iš anksto prisodrintų bibliotekų sukuriama 12 pleksų sodrinimo telkinys.
- **Sodrinimo reakcija** – unikalių sodrinimo reakcijos paruošimų skaičius, neatsižvelgiant į iš anksto prisodrintų bibliotekų, sutelktų kiekvienai reakcijai, skaičių. Pavyzdžiui, viena sodrinimo reakcija gali paruošti 1 pleksą arba 12 pleksų sodrinimo telkinį.

Norėdami apskaičiuoti bendrą vėliau prisodrintų bibliotekų skaičių, sodrinimo kompleksškumą kiekvienai reakcijai padauginkite iš sodrinimo reakcijų skaičiaus. Pavyzdžiui, viena 12 pleksų sodrinimo telkinio sodrinimo reakcija sukuria 12 vėliau prisodrintų bibliotekų telkinį.

Susiedami iš anksto prisodrintas bibliotekas, „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys reagentai palaiko šias sodrinimo reakcijas ir kompleksškumą.

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys Reagentai	Sodrinimo reakcijos	Sodrinimo kompleksškumas
16 mėginių rinkinys	16 reakcijų	1 pleksas
96 mėginių rinkinys	8 reakcijos	12 pleksų

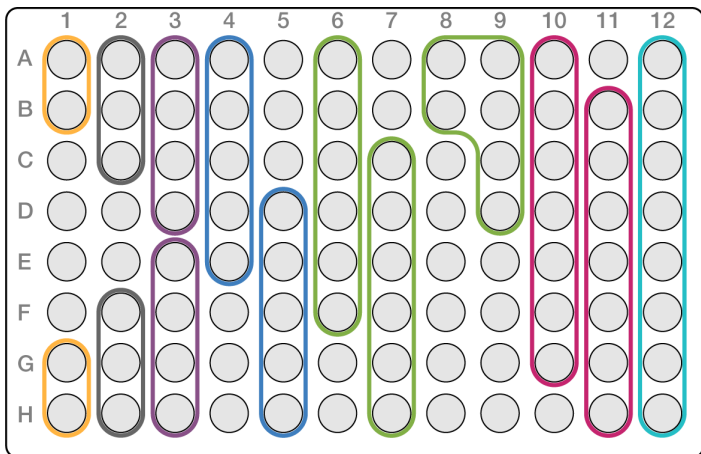
Nuo dviejų iki aštuonių pleksų telkimo strategijos

Toliau pateiktoje lentelėje rodomi indekso adapteriai (šulinėliai), kuriuos galima susieti į 2–8pleksų grupę, o spalviniu kodu pažymėtas skaičius iliustruoja kiekvieną derinį.

Sutelkite bet kokį rezginį ≥ 2 iš stulpelio viršaus arba apačios. Negalima telkti vienoje eilutėje.

Sudėtingumas	Deriniai	Spalva pav.
2	Pirmieji arba paskutiniai du šulinėliai stulpelyje: • A ir B • G ir H C–F eilutės nenaudojamos.	Oranžinė

Sudėtingumas	Deriniai	Spalva pav.
3	Pirmieji arba paskutiniai trys šulinėliai stulpelyje: - A–C - F–H D ir E eilutės nenaudojamos.	Pilka
4	Pirmieji arba paskutiniai keturi šulinėliai stulpelyje: - A–D - E–H	Violetinė
5	Pirmieji arba paskutiniai penki šulinėliai stulpelyje: - A–E - D–H	Mėlyna
6	[1 parinktis] Pirmieji arba paskutiniai šeši šulinėliai stulpelyje: - A–F - C–H [2 parinktis] Pirmieji (A ir B) arba paskutiniai du šulinėliai (G ir H) viename stulpelyje ir visi keturi gretimame stulpelyje esantys šulinėliai.	Žalia
7	Pirmieji arba paskutiniai septyni šulinėliai stulpelyje: - A–G - B–H	Rožinė
8	Visas stulpelis.	Žalsvai mėlyna



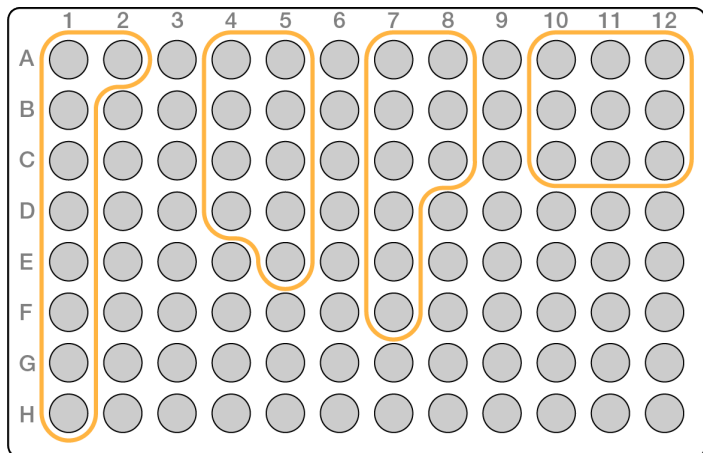
Devynių sluoksnių telkimo strategijos

Naudokite indekso adapterius iš bet kokių šulinėlių, kurie optimizuoja spalvų balansą sekos vykdymo metu, pavyzdžiui:

- A1–H1 ir A2
- A4–D4 ir A5–E5

- A7–F7 ir A8–C8
- A10–C10, A11–C11 ir A12–C12

Toliau pateiktame paveikslėlyje pavaizduoti visi keturi pavyzdžiai.



Žymės genominė DNR

Šiame etape naudojama Enrichment BLT Small (eBLTS) žymės DNR. Tai procesas, kuris fragmentuoja ir žymi DNR su adapterių sekomis.

Eksploatacinės medžiagos

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (geltonas dangtelis)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Vanduo be branduolių
- 96 šulinėlių PGR plokštelė
- Klijų sandariklis
- Mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai, 1,7 ml
- 8 mėgintuvėlių juostelė
- Pipetės antgaliai
 - 200 µl daugiakanalių pipečių

**PERSPĖJIMAS**

Šiame reagentų rinkinyje yra galimai pavojingų cheminių medžiagų. Pavojus žmogui kyla pavojingų medžiagų įkvėpus, nurijus, patekus ant odos ir į akis. Dėvėkite tinkamai nuo pavojaus saugančias apsaugines priemones, įskaitant akių apsaugos priemones, pirštines ir laboratorinį chalata. Su panaudotais reagentais elkitės kaip su cheminėmis atliekomis ir utilizuokite laikydamiesi taikomų regiono, nacionalinių ir vietinių įstatymų bei teisės aktų. Su aplinkosauga, sveikatos apsauga ir saugumu susijusios papildomos informacijos ieškokite saugos duomenų lapuose (SDL) adresu support.illumina.com/sds.html.

Apie reagentus

- eBLTS reikia laikyti 2–8 °C temperatūroje. Nenaudokite tų, eBLTS kurie buvo laikomi žemesnėje kaip 2 °C temperatūroje.
- Necentrifuguokite eBLTS.

Paruošimas

1. Paruoškite šias eksploatacines medžiagas:

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
eBLTS (geltonas dangtelis)	2 °C– 8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros. Prieš pat naudodami sumaišykite. Necentrifuguokite prieš pipetuodami.
TB1	-25 °C--15 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.

2. Sukdami išmaišykite sūkuriniu maišytuvu arba pipete užlašinkite DNR, tada trumpai centrifuguokite.
3. Termocikleryje įrašykite šią TAG programą:
 - Pasirinkite iš anksto pašildyto dangčio parinktį ir nustatykite 100 °C.
 - Nustatykite 50 µl reakcijos tūrio vertę
 - 55 °C 5 min.
 - Laikykite 10 °C temperatūroje.

Procedūra

1. Į kiekvieną 96 šulinėlių PGR plokštelės šulinėlį įpilkite 2–30 µl DNR, kad bendras įvesties kiekis būtų 50–1 000 ng.
Jei DNR tūris < 30 µl, į DNR mėginius įpilkite vandens be nukleazės, kad bendras tūris būtų 30 µl.
2. Kruopščiai išmaišykite eBLTS sūkuriniu maišytuvu, kol granulės bus visiškai resuspenduotos.
3. Nurodytus turius sujunkite mėgintuvėlyje, kad paruoštumėte pagrindinį žymens mišinį. Kiekvieną tūrį padauginkite iš apdorojamų mėginių skaičiaus.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Reagentų perteklius yra įtrauktas į tūrį.
4. Pipete kruopščiai lašinkite žymens pagrindinį mišinį ir sumaišykite.
5. Žymens pagrindinio mišinio tūrį vienodai padalykite į 8 mėgintuvėlių juostelę.
6. Naudodami 200 µl daugiakanalę pipetę, 20 µl pažymėtą pagrindinį mišinį perkelkite į kiekvieną PGR plokštelės, kurioje yra mėginys, šulinėlį. Kiekvienam mėginio stulpeliui ar eilutei naudokite šviežius antgalius.
7. Išdavus žymens pagrindinį mišinį, išmeskite 8 mėgintuvėlių juostelę.
8. Naudodami 200 µl daugiakanalę pipetę, nustatytą ties 40 µl, pipete lašinkite kiekvieną mėginį 10 kartų ir sumaišykite. Kiekvienam mėginio stulpeliui naudokite šviežius antgalius.
Arba užsandarinkite PGR plokštelę ir 1 min. plokštelių maišytuvu purtykite 1 600 aps./min. greičiu.
9. Sandarinkite plokštelę, o tada padėkite ant užprogramuototermociklerio ir paleiskite TAG programą.
10. Palaukite, kol TAG programa pasieks 10 °C temperatūrą, tada nedelsdami išimkite plokštelę.
11. 96 šulinėlių PGR plokštelę palikite pastovėti kambario temperatūroje 2 min., tada pereikite prie kito veiksmo.

Valymas po žymėjimo

Atliekant šį veiksmą prieš eBLTS PGR amplifikaciją išplaunama su adapteriu susieta DNR.

Eksploatacinės medžiagos

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96 šulinėlių PGR plokštelės magnetinis stovas
- Klijų sandariklis
- 8 mėgintuvėlių juostelė
- Pipetės antgaliai
 - 20 µl daugiakanalių pipečių
 - 200 µl daugiakanalių pipečių
- Pasiruošimas vėlesnei procedūrai:

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Indeksų adapterių plokštelė

Apie reagentus

- Būtinai naudokite tinkamą magnetinį stovą savo plokštei. Naudojant MIDI plokštelės magnetinį stovą PGR plokštei, gali TWB2 būti užkirstas kelias granuliu priliptumui.
- TWB2 Pipetę pumpuokite lėtai, kad kuo mažiau putotų ir būtų išvengta neteisingo tūrio įpurškimo ir neviseiško sumaišymo.

Paruošimas

1. Paruoškite šias eksploatacines medžiagas:

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
EPM	-25 °C iki -15 °C	Atšildykite ant ledo 1 val. Apverskite, kad sumaišytumėte, tada trumpai centrifuguokite.
ST2	15 °C iki 30 °C	Jei yra nuosėdų, įkaitinkite 37 °C temperatūroje 10 min., tada sukite, kol nuosėdos ištirps. Naudokite kambario temperatūroje.
TWB2	15 °C iki 30 °C	Naudokite kambario temperatūroje.
Indeksų adapterių plokštelė	-25 °C iki -15 °C	Atšildykite 30 min. kambario temperatūroje.

Procedūra

1. Į kiekvieną žymėjimo reakciją ST2 įpilkite 10 µl. Jei naudojate daugiakanalę pipetę, pipete įlašinkite ST2 į 8 mėgintuvėlių juostelę ir perkelti atitinkamus tūrius į PGR plokštelę. Kiekvienam mėginio stulpeliui ar eilutei naudokite šviežius antgalius.
2. Naudodami 200 µl pipetės rinkinį iki 50 µl, lėtai pipete pripildykite kiekvieną šulinėlį 10 kartų, kad vėl suspenduotumėte granules.
Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 min. purtykite 1 600 aps./min. greičiu. Pakartokite, jei reikia.
3. Užsandarinkite plokštelę ir 10 sek. centrifuguokite 280 × g.
4. Inkubuokite 5 min. kambario temperatūroje.
5. Uždėkite ant PGR plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (3 minutes).
6. [≤48 mėginiai] Tris kartus plaukite taip, kaip nurodyta toliau.
 - a. Naudodami 200 µl daugiakanalį pipetės rinkinį iki 60 µl, pašalinkite ir išmeskite supernatantą nepažeisdami granuliu granulių.
 - b. Nuimkite nuo magnetinio stovo.
 - c. Iškart po to lėtai įpilkite 100 µl TWB2 tiesiai į granules.

- d. Pipetę pumpuokite lėtai, kol granulės bus visiškai iš naujo suspenduotos. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 min. purtykite 1 600 aps./min. greičiu.
 - e. Jei purslų pasitaiko, 10 sek. gręžkite 280 x g.
 - f. Uždėkite ant PGR plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (3 min.). Plokštelę palikite ant magnetinio stovo ir TWB2 šulinėliuose, kad atliekant trečiąjį plovimą jie neperdžiūtų. Po PGR pagrindinio mišinio paruošimo pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
 - g. Naudodami 200 µl daugiakanalę pipetę, nustatytą į 100 µl, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
 - h. b–g veiksmus pakartokite du kartus (iš viso trys plovimai).
7. [**>48 mėginiai**] Tris kartus plaukite kaip nurodyta toliau.
- a. Atlikite veiksmus b ir c kas 1 arba 2 stulpelius, kol bus apdoroti visi stulpeliai, kad jie neperdžiūtų.
 - b. Naudodami 200 µl daugiakanalę pipetę, nustatytą į 60 µl, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
 - c. Nuimkite nuo magnetinio stovo.
 - d. Iškart po to lėtai lašinkite 100 µl TWB2 tiesiai ant granulių.
 - e. Pipetę pumpuokite lėtai, kol granulės bus visiškai iš naujo suspenduotos. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 min. purtykite 1 600 aps./min. greičiu.
 - f. Jei purslų pasitaiko, 10 sek. gręžkite 280 x g.
 - g. Uždėkite ant PGR plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (3 min.). Plokštelę palikite ant magnetinio stovo ir TWB2 šulinėliuose, kad atliekant trečiąjį plovimą jie neperdžiūtų. Po PGR pagrindinio mišinio paruošimo pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
 - h. Naudodami 200 µl daugiakanalę pipetę, nustatytą į 100 µl, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
 - i. Nuimkite nuo magnetinio stovo ir lėtai pripilkite 100 µl TWB2 tiesiai prie granulių.
 - j. Kartokite veiksmus h ir i kas 1 arba 2 stulpelius, kol bus apdoroti visi stulpeliai.
 - k. Pakartokite e–h veiksmus du kartus, jei iš viso plovėte tris kartus.
8. Laikykite magnetinį stovą iki skyriaus *Pažymėtos DNR amplifikavimas* skirsnio *Procedūra* nurodyto 4 veiksmo.
- TWB2 lieka šulinėliuose, kad granulės neperdžiūtų.

Stiprinti pažymėtą DNR

Atlikus šį veiksmą sustiprinamas pažymėtas DNR, naudojant riboto ciklo PGR programą. Atlikus PGR veiksmą papildomi 1 indekso (i7) adapteriai, 2 indekso (i5) adapteriai ir sekos, reikalingos klasterių generavimui sekoms nustatyti.

Eksploatacinės medžiagos

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Indeksų adapterių plokštelė
- 96 šulinėlių PGR plokštelė

- Vanduo be branduolių
- Klijų sandariklis
- Mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai, 1,5 ml
- Pipetės antgaliai
 - 20 µl daugiakanalių pipečių
 - 200 µl daugiakanalių pipečių

Apie reagentus

- Indeksų adapterių plokštelės
 - Duobutėje gali būti > 10 µl indekso adapterių.
 - Nedėkite mėginių į indekso adapterių plokštelę.
 - Kiekviena indeksinės plokštelės duobutė skirta naudoti tik vieną kartą.

Paruošimas

1. Paruoškite šias eksploatacines medžiagas:

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
EPM	-25 °C iki -15 °C	Atšildykite 4 °C temperatūroje arba ant ledo 1 val. Apverskite, kad sumaišytumėte, tada trumpai centrifuguokite.
Indeksų adapterių plokštelė	-25 °C iki -15 °C	Atšildykite 30 min. kambario temperatūroje.

2. Šiluminiame cikleryje įrašykite toliau nurodytą eBLTS PGR programą naudodami atitinkamą PGR ciklų skaičių, nurodytą toliau esančioje lentelėje.

- Pasirinkite iš anksto pašildyto dangčio parinktį ir nustatykite 100 °C.
- Nustatykite 50 µl reakcijos tūrio vertę
- 72 °C 3 min.
- 98 °C 3 min.
- X ciklai:
 - 98 °C 20 sek.
 - 60 °C 30 sek.
 - 72 °C 1 min.
- 72 °C 3 min.
- Laikykite 10 °C temperatūroje.

Bendra veikimo trukmė yra ~38 min. 9 ciklams ir ~46 min. 12 ciklų.

Mėginio įvesties tipas	PGR ciklų skaičius (X)
10–49 ng gDNR	12
50–1 000 ng gDNR	9
50–1 000 ng dDNR išskirta iš FFPE	12
gDNR, išskirta iš kraujo	9

Procedūra

- Norėdami paruošti PGR pagrindinį mišinį, sujunkite toliau nurodytus elementus. Kiekvieną tūrį padauginkite iš apdorojamų mėginių skaičiaus.
 - EPM (23 µl)
 - Vanduo be branduolių (23 µl)
 Reagentų perteklius yra įtrauktas į tūrį.
- Pipete įlašinkite PGR pagrindinį mišinį 10 kartų, kad sumaišytumėte, tada trumpai centrifuguokite.
- Kai plokštelė yra ant magnetinio stovo, išimkite ir išmeskite TWB2 naudodami 200 µl daugiakanalę pipetę. Putos, kurios lieka ant šulinėlio sienų, neturi neigiamos įtakos bibliotekai.
- Nuimkite nuo magnetinio stovo.
- Nedelsdami įpilkite 40 µl PGR pagrindinio mišinio tiesiai ant kiekvieno šulinėlio granulių.
- Nedelsdami pipete sumaišykite, kol granulės bus visiškai suspenduotos. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 min. purtykite 1 600 aps./min. greičiu.
- Užsandarinkite mėginio plokštelę ir centrifuguokite 280 × g 10 sek.
- DNR surišimo plokštelę 1 min. centrifuguokite 1 000 × g greičiu.
- Paruoškite indekso adapterio plokštelę.
 - [< 96 mėginiai] Folijos sandariklį užverkite ant indekso adapterio plokštelės nauju pipetės antgaliu kiekvienam šulinėliui tik už apdorojamų mėginių skaičių.
 - [96 mėginiai] Naują PGR plokštelę su pusiniu padėklu sulygiuokite virš rodyklės adapterio plokštelės ir paspauskite žemyn, kad pradurtumėte folijos sandariklį. Išmeskite PGR plokštelę, naudojamą folijos sandarikliui pradurti.
- Naudodami naują pipetės antgalį, į kiekvieną šulinėlį įpilkite 10 µl iš anksto paruoštų indekso adapterių.
- Pipetės rinkiniu iki 40 µl pipetę sumaišykite 10 kartų. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 min. purtykite 1 600 aps./min. greičiu.
- Užsandarinkite plokštelę ir 10 sek. centrifuguokite 280 × g.
- Bibliotekų plokštelę padėkite ant iš anksto užprogramuoto termociklerio ir paleiskite eBLTS PGR programą.

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, sandariai uždarykite plokštelę ir ne daugiau kaip 30 dienų ją saugokite temperatūroje nuo -25 °C iki -15 °C.

Bibliotekų valymas

Šiame etape naudojamos dvipusės granulių valymo procedūros, skirtos supaprastintoms bibliotekoms išvalyti.

Eksploatacinės medžiagos

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Šviežiai paruoštas 80 % etanolis (EtOH)
- 96 šulinėlių 0,8 ml polipropileno „Deepwell“ laikymo plokštelė (MIDI plokštelė)
- 96 šulinėlių PGR plokštelė
- MIDI plokštelės magnetinis stovas
- PGR plokštelės magnetinis stovas
- Mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai, 1,5 ml
- Vanduo be branduolių

Apie reagentus

- Cleanup Beads
 - Prieš kiekvieną naudojimą išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.
 - Dažnai maišykite sūkuriniu maišytuvu, kol granulės tolygiai pasiskirstys.
 - Dėl tirpalo klampumo siurbkite ir dozuokite lėtai.

Paruošimas

1. Paruoškite šias eksploatacines medžiagas:

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
CB	Kambario temperatūra	Sukite ir apverskite, kad sumaišytumėte, kol skysčio spalva taps vienalytė.
RSB	2–8 °C	Atšildykite 30 min. kambario temperatūroje. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.

Procedūra

1. 1 min. pakratykite 96 šulinėlių PGR plokštelę 1 800 aps./min. greičiu, tada trumpai centrifuguokite.
2. Uždėkite ant PGR plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (1 min.).
3. Maišykite CB 3 kartus po 10 sek., tada kelis kartus apverskite, kad vėl sustabdytumėte.
4. Aukštos kokybės gDNR atlikite šiuos veiksmus:
 - a. Į kiekvieną naujos MIDI plokštelės šulinėlį įpilkite 77 µl vandens be branduolio.

- b. Į CB kiekvieną MIDI plokštelės šulinėlį įpilkite 88 µl.
 - c. 45 µl supernatanto iš kiekvieno PGR plokštelės šulinėlio perpilkite į atitinkamą MIDI plokštelės šulinėlį.
 - d. Išmeskite PGR plokštelę.
 - e. Pipete kiekvieną šulinėlį pripildykite 10 kartų, kad sumaišytumėte. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 min. purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
 - f. Užsandarinkite plokštelę ir 5 min. inkubuokite kambario temperatūroje.
 - g. Patikrinkite, ar nėra oro burbuliukų. Jei pastebite, nusukite žemyn.
 - h. Uždėkite ant MIDI plokštelės magnetinį stovą ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (5 min.).
 - i. Inkubacijos metu kruopščiai išmaišykite CB, tada į kiekvieną naujos MIDI plokštelės šulinėlį įpilkite 20 µl.
 - j. Perpilkite 200 µl supernatanto iš kiekvieno pirmosios MIDI plokštelės šulinėlio į atitinkamą naujos MIDI plokštelės šulinėlį (kuriame yra 20 µl CB).
 - k. Išmeskite pirmąją MIDI plokštelę.
 - l. Pipete kiekvieną naujos MIDI plokštelės šulinėlį pripildykite 10 kartų, kad sumaišytumėte. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 min. purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
5. Išskirto FFPE atveju atlikite šiuos veiksmus.
- a. Į CB kiekvieną naujos MIDI plokštelės šulinėlį įpilkite 81 µl.
 - b. 45 µl supernatanto iš kiekvieno PGR plokštelės šulinėlio perpilkite į atitinkamą MIDI plokštelės šulinėlį.
 - c. Išmeskite PGR plokštelę.
 - d. Pipete kiekvieną šulinėlį pripildykite 10 kartų, kad sumaišytumėte. Arba užsandarinkite plokštelę ir 1 min. purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
6. Inkubuokite 5 minutes kambario temperatūroje.
7. Patikrinkite, ar nėra oro burbuliukų. Jei pastebite, nusukite žemyn.
8. Uždėkite ant MIDI plokštelės magnetinį stovą ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (5 min.).
9. Nedrumsdami granulių, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
10. Nuplaukite granules taip, kaip nurodyta toliau.
- a. Ant magnetinio stovo uždėję plokštelę, įpilkite 200 µl šviežio 80 % EtOH nemaišydami.
 - b. Inkubuokite 30 sek.
 - c. Nedrumsdami granulių, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
11. **Antrą** kartą plaukite granules.
12. 5 min. džiovinkite orą ant magnetinio stovo.
13. Kol džiovinate oru, likusiam EtOH kiekiui pašalinti ir išmesti naudokite 20 µl pipetę.
14. Nuimkite nuo magnetinio stovo.
15. Į granules įpilkite 17 µl RSB.
16. Užsandarinkite plokštelę ir 2 min. purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
17. Inkubuokite 2 min. kambario temperatūroje.
18. Patikrinkite, ar nėra oro burbuliukų. Jei pastebite, nusukite žemyn.

19. Uždėkite ant MIDI plokštelės magnetinį stovą ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 min.).
20. 15 µl supernatanto perpilkite į naują 96 šulinėlių PGR plokštelę.

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, sandariai uždarykite plokštelę ir ne daugiau kaip 30 dienų ją saugokite temperatūroje nuo -25 °C iki -15 °C.

Iš anksto prisodrintų bibliotekų telkinys

Šis žingsnis sujungia DNR bibliotekas su unikaliais indeksais į vieną fondą, kurį sudaro iki 12 bibliotekų.

Telkimo metodai

Galima sutelkti pagal tūrį arba pagal masę. Naudokite šią lentelę, kad nustatytumėte tinkamą savo įvesties metodą.

2 lentelė Rekomenduojami telkimo metodai

Mėginio įvestis	Telkimo metodas
10–49 ng gDNR	Masė
50–1 000 ng gDNR	Tūris
Iš FFPE išskirta gDNR	Masė
gDNR, išskirta iš kraujo	Tūris

- Vieno plekso sodrinimui nereikia sutelkti iš anksto prisodrintų bibliotekų. Tačiau gali prireikti pridėti RSB.
- Po iš anksto prisodrintos bibliotekos kiekybinio įvertinimo visus mėginių įvesties tipus galima sujungti pagal masę, kad būtų pasiektas optimalus indekso balansas.
- Galutinė iš anksto prisodrintų bibliotekų, sukurtų atskiruose eksperimentiniuose preparatuose, išeiga gali skirtis. Todėl, telkiant pagal masę, rekomenduojama pasiekti optimalų indekso balansą.
- Vieno plekso sodrinimą naudokite toliau nurodytose situacijose.
 - 10–49 ng gDNR
 - 50–1 000 ng gDNR išskirta iš FFPE
 - Mažo nedidelio alelio dažnio aptikimas somatinio varianto priskyrimui.

Telkinys pagal masę

Toliau nurodytose situacijose kiekybiškai įvertinkite savo bibliotekas, kad kiekviena biblioteka galėtų prisodrinti DNR masę, nurodytą [Iš anksto prisodrintų vienodos koncentracijos bibliotekų telkinys 35 psl.](#)

- 10–49 ng gDNR mėginio įvestis
- 50–1 000 ng gDNR išskirta iš FFPE mėginio įvesties
- Mažo nedidelio alelio dažnio aptikimas somatinio varianto priskyrimui

- gDNR, išskirta iš kraujo optimaliam indekso balansui užtikrinti

Iš anksto prisodrintos bibliotekos

1. Išstirkite 1 µl iš anksto prisodrintų bibliotekų, naudodami pageidaujamą fluorescencijos pagrindo kiekybinio įvertinimo metodą, kuriame naudojami dsDNR interkaluojantys dažai.
 - 50–1 000 ng aukštos kokybės gDNR, tikėtis ≥ 500 ng iš anksto prisodrintos bibliotekos išeigos.
 - 50–1 000 ng gDNR, išgautos iš FFPE, tikėtis 500–6000 ng iš anksto prisodrintos bibliotekos išeigos, priklausomai nuo pradinio mėginio kokybės.

PASTABA Jei taikomi kiekybinio įvertinimo metodai su skirtingu šališkumu, įvertinkite šios darbo eigos kiekybinio įvertinimo metodą. Koncentracijos rezultatai gali skirtis priklausomai nuo naudojamo metodo.

Iš anksto prisodrintų vienodos koncentracijos bibliotekų telkinys

Naudokite toliau pateiktą lentelę, kad nustatytumėte DNR masę kiekvienai bibliotekai, reikalingą prisodrinimui, atsižvelgiant į mėginio tipą ir sodrinimo kompleksiskumą. Naudojant mažesnes nei rekomenduojama iš anksto prisodrintos bibliotekos išeigas, optimali sodrinimo išeiga ir tyrimo našumas nėra garantuojami.

Bendra DNR masė sodrinimo reakcijoje neturi viršyti 6 000 ng.

Mėginio įvestis	Sodrinimo kompleksiskumas	DNR masė bibliotekoje (ng)	Bendra DNR bibliotekos masė (ng)
Aukštos kokybės gDNR	12	250–500	3 000–6 000
Iš FFPE išskirta gDNR	1	200	200

1. Įrašykite bibliotekų, kurias planuojate sutelkti šiame etape, indeksus.
2. Remiantis kiekvienos bibliotekos koncentracija, apskaičiuokite tūrį, kuris turi būti pridėtas prie sodrinimo reakcijos, kad būtų pasiekta reikiama DNR masė.
 - Aukštos kokybės gDNR Apskaičiuokite bibliotekos tūrį, reikalingą 250–500 ng įvedimui.
 - Iš FFPE išskirta gDNR: Apskaičiuokite bibliotekos tūrį, reikalingą 200 ng įvedimui.
3. Į tą patį PGR plokštelės šulinėlį įtraukite apskaičiuotą kiekvienos bibliotekos tūrį.
4. Jei naudojate aukštos kokybės gDNR, atlikite vieną iš šių veiksmų, atsižvelgdami į bendrą sujungtų iš anksto prisodrintų bibliotekų tūrį:
 - Jei iš anksto prisodrintos bibliotekos tūris = 30 µl, pereikite prie [Hibridizuoti zondus 37 psl.](#)
 - Jei iš anksto prisodrintos bibliotekos tūris < 30 µl, įpilkite RSB, kad bendras tūris pasiektų 30 µl.

- Jei iš anksto prisodrintos bibliotekos tūris > 30 µl, sujungtą mėginį koncentruokite granulių metodu arba vakuuminiu koncentratoriumi. Į koncentruotą sujungtą mėginį įpilkite RSB, kad būtų pasiektas bendras 30 µl tūris.
5. Jei naudojate iš FFPE išgautą gDNR, atlikite vieną iš toliau nurodytų veiksmų, atsižvelgdami į bendrą sujungtą iš anksto prisodrintų bibliotekų tūrį.
- Jei iš anksto prisodrintos bibliotekos tūris = 7,5 µl, pereikite prie [Hibridizuoti zondus 37 psl.](#)
 - Jei iš anksto prisodrintos bibliotekos tūris < 7,5 µl, įpilkite RSB, kad bendras tūris siektų 7,5 µl.

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, sandariai uždarykite plokštelę ir ne daugiau kaip 30 dienų ją saugokite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje.

Telkinys pagal tūrį

Kai įvestis yra 50–1 000 ng gDNR, atskirų bibliotekų, sukurtų tame pačiame eksperimente, kiekio nustatymas ir normalizavimas nereikalingas.

Kad pasiektumėte optimalų našumą, jungkite tik iš anksto prisodrintų bibliotekų mėginius, paruoštus to paties naudotojo, reagento partijos ir indekso adapterio plokštelės.

1. Įrašykite bibliotekų, kurias planuojate sutelkti šiame etape, indeksus.
2. Sujunkite šias iš anksto prisodrintas bibliotekas ir RSB tūrius, kad prisodrintumėte skilimą, į tą patį naujos PGR plokštelės šulinėlį.

Gautas tūris yra 30 µl.

Sodrinimo kompleksifikumas*	Kiekvienos iš anksto sodrintos bibliotekos tūris (µl)	RSB tūris (µl)
1 pleksas	14	16
2 pleksai	14	2
3 pleksai	10	0
4 pleksai	7,5	0
5 pleksai	6	0
6 pleksai	5	0
7 pleksai	4,2	0,6
8 pleksai	3,7	0,4
9 pleksai	3,3	0,3
10 pleksų	3	0
11 pleksų	2,7	0,3
12 pleksų	2,5	0

* Informacija apie nestandartines nukrypimus (nuo 2 iki 11 pleksų) pateikiama [Procedūros apribojimai 2 psl.](#)

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, sandariai uždarykite plokštelę ir ne daugiau kaip 30 dienų ją saugokite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje.

[Pasirinktina] Kvalifikuotos iš anksto prisodrintos bibliotekos

Jei telkiama pagal tūrį, iš anksto prisodrintoms bibliotekoms kiekybiškai įvertinti naudokite fluorometrinį metodą, kuriame naudojami dsDNR interkaluojantys dažai. Norėdami gauti iš anksto prisodrintų bibliotekų kvalifikaciją, naudokite DNR fragmentų analizatorių su atitinkamu fragmentų analizės rinkiniu.

Bibliotekų klasifikacijai iš viso naudokite 1 µl. Iš anksto prisodrintos bibliotekos yra pakankamai koncentruotos, kad būtų galima atlikti mažus praskiedimus kiekybiniam įvertinimui arba fragmentų analizei.

Hibridizuoti zondus

Šiuo veiksmų tikslinės DNR sritys siejamos su fiksavimo zondais.

„Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys reagentai yra suderinami ir su „Illumina“, ir su trečiųjų šalių sodrinimo DNR oligonukleotidų plokštelėmis. Informacijos apie būtinas trečiųjų šalių skydelių specifikacijas žr. [Prisodrinimo zondo plokštelės reikalavimai 11 psl.](#)

Eksploatacinės medžiagos

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB 2 buferis + IDT NXT blokatoriai) (mėlynas dangtelis)
- Sodrinimo zondo skydelis
- 96 šulinėlių PGR plokštelė
- Klijų sandariklis
- Pasiruošimas vėlesnei procedūrai:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (geltonos spalvos dangtelis)

Apie reagentus

- Saugojimo metu išsiskiria NHB2 nuosėdų.
- Sodrinimo zondo skydelis – tai „Illumina“ pardavėjo pasirinktas sodrinimo oligonukleotidų skydelis.

Paruošimas

1. Paruoškite šias eksploatacines medžiagas:

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
EHB2	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu. Jei pastebima kristalų ir drumstumo, išmaišykite sūkuriniu maišytuvu arba pipete lašinkite aukštyn ir žemyn, kad sumaišytumėte, kol tirpalas taps skaidrus.
Sodrinimo zondo skydelis	-25 °C – -15 °C („Illumina“)	Tiek „Illumina“, tiek trečiųjų šalių skydelius pašildykite iki kambario temperatūros. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.
NHB2 (mėlynas dangtelis)	-25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Kambario temperatūroje, mikromėginio inkubatorių įkaitinkite iki tos pačios temperatūros, kaip ir zondą, kurį naudojate 5 min. Sūkuriniu maišytuvu išmaišykite didžiausiu greičiu 3 kartus po 10 sek., kad resuspenduotumėte. Trumpai centrifuguokite. Pipete lašinkite aukštyn ir žemyn nuo mėgintuvėlio dugno. Jei pastebima kristalų ir drumstumo, išmaišykite sūkuriniu maišytuvu arba pipete lašinkite aukštyn ir žemyn, kad sumaišytumėte, kol tirpalas taps skaidrus. Naudokite šiltą, kad nesusidarytų nuosėdų.
SMB3*	2–8 °C	Jei pereisite prie kitos procedūros iš karto po 90 min. laikymo HYB programoje, prieš paleisdami HYB programą pašildykite iki kambario temperatūros bent 2 val.
EEW* (geltonos spalvos mėgintuvėlis)	-25 °C iki -15 °C	Jei pereisite prie kitos procedūros iš karto po 90 min. laikymo HYB programoje, prieš paleisdami HYB programą pašildykite iki kambario temperatūros bent 2 val. Kambario temperatūroje mikromėginio inkubatoriuje įkaitinkite iki atitinkamos hibridizacijos ir 30 min. iki programos HYB pabaigos užfiksuokite temperatūrą.

* Jei sustojate prieš kitą procedūrą, atidėkite šio reagento paruošimą, kol pasieksite šią procedūrą.

2. Termociklieriu įrašykite šią HYB programą, naudodami atitinkamą ciklų skaičių, nurodytą 3 lentelė.
- Pasirinkite iš anksto pašildyto dangčio parinktį ir nustatykite 100 °C.
 - Nustatykite reakcijos tūrį
 - [Aukštos kokybės gDNR] 100 µl
 - [Iš FFPE išskirta gDNR] 25 µl
 - 98 °C 5 min.
 - X ciklai po 1 min., pradedant nuo 98 °C pirmojo ciklo metu, po to sumažinant 2 °C vienam ciklui
 - Laikykite 90 min. tinkamoje temperatūroje:
 - [Iš FFPE išskirta gDNR] 58 °C
 - [80 merų zondo skydeliai] 58 °C
 - [Somatinio varianto priskyrimas] 58 °C
 - [Visi kiti] 62 °C

Bendras veikimo laikas yra ~115 min.

3 lentelė Ciklo numeris vienam mėginiui arba grupei

Mėginio ir plokštelės tipas	Ciklų skaičius (X)
gDNR, išskirta iš FFPE (nepriklausomai nuo plokštelės tipo)	20
80 merų zondo skydeliai (nepriklausomai nuo mėginio tipo)	20
Somatinio varianto priskyrimas	20
Visi kiti mėginiai ir plokštelės	18

Procedūra

1. [Aukštos kokybės gDNR] *Toliau nurodyta tvarka* pridėkite toliau nurodytus reagentus į kiekvieną sutelktą biblioteką, esančią PGR plokštelėje.
Nekurkite pagrindinio mišinio. NHB2 ir EHB2 pagrindinio mišinio kūrimas neigiamai veikia sodrinimo efektyvumą.
 - NHB2 (mėlynas dangtelis) (50 µl)
 - Sodrinimo zondo skydelis (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. [Aukštos kokybės gDNR] Pipete, nustatyta ties 90 µl, pipetuokite kiekvieną šulinėlį 10 kartų, kad sumaišytumėte.
3. [gDNR, išgauta iš FFPE] Į PGR plokštelės kiekvieną sujungtą biblioteką *nurodyta tvarka* pridėkite toliau nurodytus reagentus.
Nekurkite pagrindinio mišinio. NHB2 ir EHB2 pagrindinio mišinio kūrimas neigiamai veikia sodrinimo efektyvumą.

- NHB2 (mėlynas dangtelis) (12,5 µl)
 - Sodrinimo zondo skydelis (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[Iš FFPE išgauta gDNR]** Pipete, nustatyta ties 20 µl, pipetuokite kiekvieną šulinėlį 10 kartų, kad sumaišytumėte.
 5. Užsandarinkite plokštelę ir 10 sek. centrifuguokite 280 × g.
 6. Padėkite bibliotekų plokštelę ant iš anksto užprogramuoto termociklerio ir vykdykite denatūravimo programą.
 7. Nedelsdami pereikite prie kitos procedūros, kai baigsis HYB temperatūros sulaikymo programos laikas.



DĖMESIO!

Jei hibridizacijos reakcijos temperatūra nukrenta žemiau kambario temperatūros, atsiranda nuosėdos.

Užfiksuoti hibridizuotus zondus

Šiame etape naudojami Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) zondai, hibridizuoti į tikslinius dominančius regionus.

Eksploatacinės medžiagos

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (geltonos spalvos dangtelis)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- Mikrocentrifugos mėgintuvėlis, 1,5 ml
- 96 šulinėlių MIDI plokštelė
- 96 šulinėlių PGR plokštelė
- Klijų sandariklis
- MIDI plokštelės magnetinis stovas
- Pasiruošimas vėlesnei procedūrai:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Apie reagentus

- EEW

- Prieš pašildydami mikromėginių inkubatorių, įsitikinkite, kad kambario temperatūroje EEW jis buvo atšildytas mažiausiai 2 val.
- Prieš baigdami HYB programą, įsitikinkite, kad mikromėginių inkubatoriuje 30 min. EEW buvo kaitinama.
- Kai nenaudojate EEW, palikite mikromėginio inkubatoriuje. EEW turi likti šildomas per visą protokolą.
- Pasiekus kambario temperatūrą gali būti drumstas.
- Gali atrodyti geltonai.
- SMB3
 - SMB3 prieš naudojimą turi būti kambario temperatūroje.

Paruošimas

1. Paruoškite šias eksploatacines medžiagas:

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
SMB3	2–8 °C	Palikite 2 val., kol pašils iki kambario temperatūros. Apverskite, tada išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, kol bus visiškai resuspenduota.
EEW (geltonos spalvos mėgintuvėlis)	-25 °C iki -15 °C	Po 2 val. inkubacijos kambario temperatūroje mikromėginio inkubatoriuje įkaitinkite iki atitinkamos hibridizacijos ir 30 min. iki programos HYB pabaigos užfiksuokite temperatūrą.
EE1	-25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje, tada išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.
HP3	-25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje, tada išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.
ET2	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.
EPM	-25 °C iki -15 °C	Atšildykite ant ledo vieną valandą. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. Padėkite ant ledo.
PPC	-25 °C – -15 °C	Atšildykite ant ledo vieną valandą. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. Padėkite ant ledo.

2. Vieną mikromėginio inkubatorių pašildykite MIDI šilumos bloko įdėklą, kad inkubuotumėte mėginio plokštelę iki vienos iš toliau nurodytų temperatūrų. EEW pašildyti galima naudoti pasirenkamą antrąjį mikromėginio inkubatorių. EEW padėkite ant MIDI kaitinimo bloko įdėklo.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 merų vienai zondo grupei] 58 °C
 - [Somatinio varianto priskyrimas] 58 °C
 - [Visi kiti] 62 °C

Procedūra

Užfiksuoti

1. SMB3 pridėkite prie atitinkamo naujos MIDI plokštelės šulinėlio, kaip nurodyta toliau.
 - **[Aukštos kokybės gDNR]** Pridėkite 250 µl SMB3.
 - **[gDNR, išskirta iš FFPE]** Įpilkite 62,5 µl SMB3.
2. Naudodami pipetės rinkinį iki 100 µl aukštos kokybės gDNR arba 25 µl FFPE, kiekvieną sutelktą biblioteką iš 96 šulinėlių PGR plokštelės perkelti į atitinkamą naujos MIDI plokštelės šulinėlį.
3. Užsandarinkite plokštelę ir 4 min. purtykite 1 200 aps./min. greičiu.
4. Jei pasitaiko pūslų, trumpai centrifuguokite plokštelę.
5. Sutelktų bibliotekų plokštelę uždėkite ant mikromėginių inkubatoriaus MIDI kaitinimo bloko įdėklo, po EEW mėgintuvėlių; uždarykite dangtelį ir 15 min. inkubuokite tinkamoje temperatūroje:
 - **[FFPE]** 58 °C
 - **[80 merų zondo skydelis]** 58 °C
 - **[Somatinis varianto priskyrimas]** 58 °C
 - **[Visi kiti]** 62 °C
6. Išimkite susietų bibliotekų plokštelę ir 30 sek. centrifuguokite 280 × g.
7. Nedelsdami uždėkite ant PGR plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 min.).
8. **[Aukštos kokybės gDNR]** Pipete, nustatyta ties 200 µl, pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą iš kiekvieno šulinėlio, nesumaišydami granulių sankaupos.
9. **[Iš FFPE išgauta gDNR]** Pipete, nustatyta ties 90 µl, pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą iš kiekvieno šulinėlio, nesumaišydami granulių sankaupos.
10. Pašalinkite ir išmeskite visą likusį supernatantą.

Plovimas

1. Nuimkite nuo magnetinio stovo.
2. **[Aukštos kokybės gDNR]** Greitai išimkite EEW iš mikromėginių inkubatoriaus ir pridėkite 200 µl į kiekvieną šulinėlį.
3. **[gDNR, išgauta iš FFPE]** Greitai išimkite EEW iš mikromėginių inkubatoriaus ir į kiekvieną šulinėlį įpilkite 50 µl.
4. Nepanaudotą EEW grąžinkite į mikromėginių inkubatorių ir toliau šildykite.
5. Užsandarinkite plokštelę ir 4 min. purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
6. Mėginių plokštelę uždėkite ant MIDI kaitinimo bloko įdėklo ant mikromėginių inkubatoriaus po EEW mėgintuvėlių, uždarykite dangtelį ir 5 min. inkubuokite atitinkamoje temperatūroje:
 - **[FFPE]** 58 °C

- [80 merų zondo skydeliai] 58 °C
 - [Somatinis varianto priskyrimas] 58 °C
 - [Visos kitos plokštelės] 62 °C
7. Nedelsdami uždėkite ant PGR plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 min.).
 8. Naudodami pipetę, nustatytą ties 200 µl aukštos kokybės gDNR atveju arba ties 50 µl FFPE atveju, pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą iš kiekvieno šulinėlio.
 9. 1–8 veiksmus pakartokite du kartus, jei buvo trys plovimai.

Perkėlimo plovimas

1. Nuimkite nuo magnetinio stovo.
2. **[Aukštos kokybės gDNR]** Greitai išimkite EEW iš mikromėginių inkubatoriaus ir pridėkite 200 µl į kiekvieną šulinėlį.
3. **[gDNR, išgauta iš FFPE]** Greitai išimkite EEW iš mikromėginių inkubatoriaus ir pridėkite 50 µl į kiekvieną šulinėlį.
4. Užsandarinkite plokštelę ir 4 min. purtykite 1 800 aps./min. greičiu. Jei yra pusrų, sumažinkite greitį iki 1 600 aps./min.
5. Resuspenduotą granulių tirpalą perkelti į naują MIDI plokštelę.
Dalis mėginio gali likti šulinėliuose.



DĖMESIO!

Reagento perkėlimas sumažina liekamųjų reagentų, galinčių slopinti galutinės PGR, perkėlimą.

6. Susietų bibliotekų plokštelę uždėkite ant MIDI kaitinimo bloko įdėklo ant mikromėginių inkubatoriaus po mėgintuvėliu, uždarykite dangtelį ir 5 min. inkubuokite atitinkamoje temperatūroje:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 merų zondo skydeliai] 58 °C
 - [Somatinis varianto priskyrimas] 58 °C
 - [Visi kiti] 62 °C
7. Nedelsdami uždėkite ant MIDI plokštės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 min.).
8. Naudodami pipetę, nustatytą ties 200 µl aukštos kokybės gDNR atveju arba ties 50 µl FFPE atveju, pašalinkite ir išmeskite visą supernatantą iš kiekvieno šulinėlio.
9. Centrifuguokite plokštelę 280 × g 30 sek.
10. Padėkite ant MIDI plokštės magnetinio stovo 10 sek.
11. Likusiam skysčiui iš kiekvieno šulinėlio pašalinti ir išmesti naudokite 20 µl pipetę.
12. Nedelsdami eikite į [Eliutas 44 psl.](#), kad išvengtumėte per didelio granulių džiovimo ir bibliotekos išeigos praradimo.

Eliutas

1. Norėdamiparuošti eliuavimo pagrindinį mišinį, sumaišykite toliau nurodytus tūrius. Kiekvieną tūrį padauginkite iš apdorotų bibliotekų skaičiaus.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)J tūrį įtrauktas papildomas reagento perteklius.
2. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
3. Iš magnetinio stovo išimkite MIDI plokštelę.
4. Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 23 µl eliuavimo pagrindinio mišinio.
5. Užsandarinkite plokštelę ir 2 min. purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
6. Inkubuokite plokštelę kambario temperatūroje 2 min.
7. Centrifuguokite 280 × g jėga 30 sek.
8. Uždėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 min.).
9. 21 µl supernatanto perpilkite iš MIDI plokštelės į atitinkamą naujos 96 šulinėlių PGR plokštelės šulinėlį.
10. Išmeskite MIDI plokštelę.
11. Į kiekvieną šulinėlį, kuriame yra 21 µl supernatantoET2, įpilkite 4 µl.
12. Pipetę nustatykite į 20 µl ir lėtai lašinkite pipete kiekvieną šulinėlį 10 kartų, kad sumaišytumėte.
13. Užsandarinkite plokštelę ir 10 sek. centrifuguokite 280 × g.
14. Inkubuokite plokštelę kambario temperatūroje 1 min.

Sustiprinti prisodrintą biblioteką

Šiame etape naudojama PGR programa prisodrintai bibliotekai sustiprinti.

Eksploatacinės medžiagos

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Klijų sandariklis

Paruošimas

1. Paruoškite šias eksploatacines medžiagas:

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
EPM	-25 °C iki -15 °C	Atšildykite 4 °C temperatūroje arba ant ledo vieną val. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. Padėkite ant ledo.
PPC	-25 °C--15 °C	Atšildykite 4 °C temperatūroje ant ledo vieną val. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. Padėkite ant ledo.

2. Šiluminiame cikleryje įrašykite šią AMP programą naudodami atitinkamą PGR ciklą skaičių, kuris nurodytas toliau pateiktoje lentelėje.

- Pasirinkite iš anksto pašildyto dangčio parinktį ir nustatykite 100 °C.
- Nustatykite 50 µl reakcijos tūrio vertę
- 98 °C 45 sek.
- (X) ciklai:
 - 98 °C 30 sek.
 - 60 °C 30 sek.
 - 72 °C 30 sek.
- 72 °C 5 min.
- Laikykite 10 °C temperatūroje.

Bendras veikimo laikas yra ~35 min.

Mėginio ir plokštelės tipas	(X) Ciklai
FFPE	14
„Illumina“ Egzomų plokštelė (CEX) aukštos kokybės gDNR	10
„Illumina“ FFPE egzomų plokštelė (CEX)	12
Visi kiti mėginiai ir plokštelės	12 ¹²³⁴

¹ Galima reguliuoti iki 15 ciklų mažoms trečiųjų šalių plokštėms, vėliau jas optimizuojant. Naudojant FFPE, ciklų skaičių galima reguliuoti iki 17.

² Galima reguliuoti iki 17 ciklų trečiųjų šalių plokštėms, kuriose yra tik 500 zondų. Naudojant FFPE, ciklų skaičių galima reguliuoti iki 19.

³ Galima koreguoti iki 14 FFPE mėginių ciklų.

⁴ Padidinus PGR ciklų skaičių, FFPE mėginiams gali būti taikomas didesnis dublikatų dažnis ir mažesni fragmentų dydžiai.

Procedūra

1. Į PPC kiekvieną šulinėlį įpilkite 5 µl.
2. Į EPM kiekvieną šulinėlį įpilkite 20 µl.
3. Užsandarinkite plokštelę ir 1 min. purtykite 1 200 aps./min. greičiu.
4. Bibliotekų plokštelę 10 sek. centrifuguokite 280 x g greičiu.
5. Bibliotekų plokštelę padėkite ant iš anksto užprogramuoto termociklerio ir paleiskite AMP programą.

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei sustojate, laikykite 2–8 °C temperatūroje iki dviejų dienų. Arba palikite ant termociklerio iki 24 valandų.

Pagerintos prisodrintos bibliotekos valymas

Šis veiksmas atliekamas prisodrintai bibliotekai Cleanup Beads išvalyti ir nepageidaujamiems produktams pašalinti.

Eksploatacinės medžiagos

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Šviežiai paruoštas 80 % etanolis (EtOH)
- Klijų sandarikliai
- 96 šulinėlių MIDI plokštelė
- 96 šulinėlių PGR plokštelė
- MIDI plokštelės magnetinis stovas

Apie reagentus

- Cleanup Beads
 - Prieš kiekvieną naudojimą išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.
 - Dažnai maišykite sūkuriniu maišytuvu, kol granulės tolygiai pasiskirstys.
 - Dėl tirpalo klampumo siurbkite ir dozuokite lėtai.

Paruošimas

1. Paruoškite šias eksploatacines medžiagas:

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
CB	Kambario temperatūra	Sukite ir apverskite, kad sumaišytumėte, kol skysčio spalva taps vienalytė.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
RSB	2 °C iki 8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu.

2. Paruoškite šviežią 80 % EtOH iš absoliutaus etanolio.

Procedūra

1. PGR plokštelę 10 sek. centrifuguokite 280 x g greičiu.
2. 10 sek. maišykite CB 3 kartus, tada apverskite.
3. Į kiekvieną naujos **MIDI** plokštelės šulinėlį pridėkite 40,5 µl CB.
4. 45 µl iš kiekvieno PGR plokštelės šulinėlio perpilkite į atitinkamą MIDI plokštelės šulinėlį.
5. Užsandarinkite plokštelę ir 1 min. purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
6. Inkubuokite MIDI plokštelę kambario temperatūroje 5 min.
7. Centrifuguokite 280 x g jėga 10 sek.
8. Uždėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (5 min.).
9. Pipetės rinkiniu iki 95 µl pašalinkite ir iš kiekvieno šulinėlio išmeskite visus supernatantus.
10. Plaukite du kartus taip, kaip nurodyta toliau.
 - a. Ant magnetinio stovo uždėję plokštelę, įpilkite 200 µl šviežio 80 % EtOH nemaišydami.
 - b. Inkubuokite 30 sek.
 - c. Nedrumsdami granulių, pašalinkite ir išmeskite supernatantą.
11. 5 min. džiovinkite orą ant magnetinio stovo.
12. Kol džiovinate oru, 20 µl pipete pašalinkite ir išmeskite EtOH likučius iš kiekvieno šulinėlio.
13. Nuimkite nuo magnetinio stovo ir RSBį kiekvieną šulinėlį įpilkite 32 µl.
14. Užsandarinkite plokštelę ir 1 min. purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
15. Inkubuokite plokštelę kambario temperatūroje 5 min.
16. Centrifuguokite 280 x g jėga 10 sek.
17. Uždėkite ant MIDI plokštelės magnetinio stovo ir palaukite, kol skystis taps skaidrus (2 min.).
18. 30 µl supernatanto perpilkite iš 96 šulinėlių MIDI plokštelės į atitinkamą naujos PGR plokštelės šulinėlį.
19. Išmeskite MIDI plokštelę.

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jei norite sustoti, sandariai uždarykite plokštelę ir ne daugiau kaip 7 dienas ją saugokite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje.

Patikrinkite prisodrintas bibliotekas

Norėdami kiekybiškai įvertinti dvigrandę gDNR įvestį, naudokite fluorescencijos metodą, kuriame naudojami interkaliojami dažai. Venkite būdų, kuriais matuojama bendra nukleorūgštis, pvz., „NanoDrop“ ar kitų UV sugeriamumo būdų.

1. Vykdykite 1 µl prisodrintas bibliotekas naudodami kiekybinio įvertinimo metodą.

PASTABA Bendras zondo moliškumas proporcingai veikia bibliotekos išeigą po sodrinimo.

Tikėtis vidutinio 125–235 bp dydžio intarpo ir bibliotekos fragmentų, kurių dydis svyruoja nuo ~200 bp iki ~1000 bp, paskirstymo.

Bibliotekas praskieskite iki pradinės koncentracijos

Atlikus šį veiksmą bibliotekos atskiedžiamos iki pradinės sekvenavimo sistemos koncentracijos ir tai pirmasis serijinio skiedimo veiksmas. Praskiedus iki pradinės koncentracijos, bibliotekos yra pasirengusios denatūruoti ir atskiesti iki galutinės apkrovos koncentracijos.

Kad būtų galima nustatyti seką, nepriklausomai nuo naudojamo sodrinimo zondo skydelio, „Illumina“ rekomenduojama nustatyti abiejų sekų seriją su 151 ciklu vienam nuskaitymui (2 × 151) ir 10 ciklų vienam indekso nuskaitymui. Jei norite mažiau persidengiančių nuskaitymų ar mažesnę grynąją aprėptį, galite sekvenuoti iki 2 × 126 arba 2 × 101.

1. Apskaičiuokite bibliotekos ar sujungtų bibliotekų molarumo vertę naudodami šią formulę.
 - Bibliotekoms, kurioms taikomas DNR fragmentų analizatorius, naudokite vidutinį bibliotekos dydį.
 - Visiems kitiems kvalifikacijos metodams naudokite 350 bp kaip vidutinį bibliotekos dydį.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{vidutinis bibliotekos dydis (bp)}} = \text{Moliarumas (nM)}$$

Pavyzdžiui, jei jūsų bibliotekos koncentracija yra 20 ng/μl, o vidutinis dydis yra 350 bp, gaunama molarumo vertė yra 86,58 nM.

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

2. Naudodami molarumo vertę, apskaičiuokite bibliotekos apimtis RSB ir biblioteką, reikalingą norint atskiesti bibliotekas iki pradinės jūsų sistemos koncentracijos.

Sekvenavimo sistemos	Minimalus reikalaujamas bibliotekos tūris (μl)	Pradinė koncentracija (nM)	Galutinė įkėlimo koncentracija (pM)
„NextSeq 550Dx“	10	2	1,2
„MiSeqDx“	5	4	11
„NovaSeq 6000Dx“	150 (S2) arba 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM yra pradinė koncentracija, kai galutinė apkrovos koncentracija yra 350 pM. Jei reikia, pakoreguokite galutinę apkrovos koncentraciją naudodami toliau pateiktą lentelę.

Galutinė įkėlimo koncentracija (pM)	Bibliotekos koncentracija (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25

Galutinė įkėlimo koncentracija (pM)	Bibliotekos koncentracija (nM)
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Atskieskite bibliotekas RSB:

- **Bibliotekos, kiekybiškai įvertintos kaip daugialypis bibliotekų telkinys** – Atskieskite telkinį iki pradinės jūsų sistemos koncentracijos.
- **Bibliotekos, kiekybiškai įvertintos individualiai** – Atskieskite telkinį iki pradinės jūsų sistemos koncentracijos. Į mėgintuvėlį įpilkite po 10 µl kiekvienos atskiestos bibliotekos, kad būtų sukurtas daugialypis bibliotekos telkinys.

4. Laikykitės denatūracijos ir sistemos atskiedimo instrukcijų, kad atskiestumėte iki galutinės koncentracijos.

- Sistemos „NextSeq 550Dx“ žr. „[NextSeq 550Dx“ sekvenavimo paruošimas 50 psl.](#)
- Apie „MiSeqDx“ sistemą žr. „[MiSeqDx“ sekvenavimo paruošimas 52 psl.](#)
- Apie „NovaSeq 6000Dx“ sistemą žr. „[NovaSeq 6000Dx“ sekvenavimo paruošimas 53 psl.](#)

Galutinės įkrovos koncentracijos yra pradinis taškas ir bendrosios gairės. Optimizuokite savo darbo eigą ir kiekybinio įvertinimo metodo koncentracijas vėlesniems sekų serijoms arba srauto ląstelių titravimui.

„NextSeq 550Dx“ sekvenavimo paruošimas

Norėdami sekvenuoti „NextSeq 550Dx“ sekvenavimo sistemą, vadovaukitės toliau pateiktomis bibliotekų denatūravimo ir skiedimo instrukcijomis.

Ekspluatacinės medžiagos

- HT1 (hibridizacijos buferinis tirpalas)
- 1N NaOH
- 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

Paruošimas

Paruoškite *naują* 0,2N NaOH skiedinį denatūruotoms bibliotekoms sekai nustatyti. Kad nedidelės lašinimo pipete klaidos nepaveiktų galutinės NaOH koncentracijos, tam yra paruoštas papildomas tūris.

**DĖMESIO!**

Šviežiai atskiestas 0,2N NaOH yra būtinas denatūracijos procesui. Netinkamas denatūravimas gali sumažinti išeigą.

1. Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
HT1	-25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Laikykite 2 °C–8 °C temperatūroje arba ant ledo, kol būsite pasirengę atskiesti denatūruotas bibliotekas.

2. Sumaišykite šiuos tūrius mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje, kad paruoštumėte naują NaOH skiedinį:
 - Laboratorinis vanduo (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)
 Rezultatas yra 1 ml 0,2N NaOH.
3. Mėgintuvėlį keletą kartų apverskite, kad susimaišytų.
4. Sumaišykite šiuos tūrius mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje, kad paruoštumėte 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.
 - Laboratorinis vanduo (800 µl)
 - 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)
 Rezultatas yra 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

PASTABA Laikykite mėgintuvėlį uždengtą. Šviežią skiedinį suvartokite per **12 val.**

Denatūruotos biblioteka

1. Sumaišykite šiuos bibliotekos tūrius ir šviežiai atskiestą 0,2N NaOH mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje.
 - 10 µl biblioteka
 - 10 µl 0,2N NaOH
2. Trumpai išmaišykite ir 1 min. centrifuguokite 280 x g.
3. Inkubuokite 5 min. kambario temperatūroje.
4. Įpilkite 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Denatūruotų bibliotekų skiedimas iki 20 pM

1. Į denatūruotų bibliotekų mėgintuvėlį įpilkite 970 µl iš anksto paruošto HT1.
Gaunama 20 pM denatūruota biblioteka.
2. Trumpai išmaišykite ir 1 min. centrifuguokite 280 x g.
3. 20 pM bibliotekas padėkite ant ledo, kol būsite pasiruošę pereiti prie galutinio skiedimo.

Bibliotekų praskiedimas iki įkėlimo koncentracijos.

1. Pridėkite toliau nurodytus tūrius, kad atskiestumėte denatūruotą 20 pM bibliotekos tirpalą iki 1,2 pM.
 - Denatūruotas bibliotekos tirpalas (78 µl)
 - Įpilkite iš anksto atvėsinto HT1 (1 222 µl)
 Bendras tūris yra 1,3 ml esant 1,2 pM.
2. Apverskite, kad sumaišytumėte, tada įjunkite centrifugą.
3. Pereikite prie sekvenavimo. Instrukcijas žr. „NextSeq 550Dx” instrumentų informaciniame vadove (dokumento Nr. 1000000009513) ir „DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on NextSeq 550Dx” programos naudotojo vadove (dokumento Nr. 200025238).

„MiSeqDx” sekvenavimo paruošimas

Norėdami sekvenuoti „MiSeqDx” sekvenavimo sistemą, naudokite toliau pateiktas instrukcijas bibliotekoms denatūruoti ir atskiesti.

Eksploatacinės medžiagos

- HT1 (hibridizacijos buferinis tirpalas)
- 1N NaOH

Paruošimas

Paruoškite *naują* 0,2N NaOH skiedinį denatūruotoms bibliotekoms sekai nustatyti. Kad nedidelės lašinimo pipete klaidos nepaveiktų galutinės NaOH koncentracijos, tam yra paruoštas papildomas tūris.



DĖMESIO!

Šviežiai atskiestas 0,2N NaOH yra būtinas denatūracijos procesui. Netinkamas denatūravimas gali sumažinti išeigą.

1. Paruoškite toliau nurodytas eksploatacines medžiagas.

Elementas	Laikymas	Instrukcijos
HT1	-25 °C iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Laikykite 2 °C–8 °C temperatūroje arba ant ledo, kol būsite pasirengę atskiesti denatūruotas bibliotekas.

2. Sumaišykite šiuos tūrius mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje, kad paruoštumėte naują NaOH skiedinį:
 - Laboratorinis vanduo (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)
 Rezultatas yra 1 ml 0,2N NaOH.

PASTABA Laikykite mėgintuvėlį uždengtą. Šviežią skiedinį suvartokite per **12 val.**

Denatūruojama 4 nM biblioteka

- Sumaišykite šiuos tūrius mikrocentrifugos mėgintuvėlyje:
 - 4 nM biblioteka (5 µl)
 - 0,2N NaOH (5 µl)
- Trumpai išmaišykite ir 1 min. centrifuguokite 280 x g.
- Inkubuokite 5 min. kambario temperatūroje.
- Į mėgintuvėlį, kuriame yra denatūruota biblioteka, įpilkite 990 µl iš anksto paruošto HT1. Rezultatas yra 1 ml 20 pM denatūruota biblioteka.

Denatūruojamos bibliotekos skiedimas iki 20 pM

- Atskieskite iki norimos koncentracijos toliau nurodytais tūriais.

Koncentracija	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM biblioteka	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Iš anksto atvėsinta HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- Apverskite, kad sumaišytumėte, tada įjunkite centrifugą.
- Pereikite prie sekvenavimo. Instrukcijas žr. „MiSeqDx“ prietaiso informacinis vadovas, skirtas 4 v. MOS sistemai (dokumento Nr. 200010452) ir „MiSeqDx“ vietinio vykdymo vadovo DNR generuoti FASTQ Dx darbo eigos vadovą (dokumento Nr. 200015661).

„NovaSeq 6000Dx“ sekvenavimo paruošimas

Norėdami sekvenuoti „NovaSeq 6000Dx“ sekvenavimo sistemoje, vadovaukitės toliau pateiktomis bibliotekų denatūravimo ir skiedimo instrukcijomis.

Eksploatacinės medžiagos

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

Paruošimas

Paruoškite *naują* 0,2N NaOH skiedinį denatūruotoms bibliotekoms sekai nustatyti. Kad nedidelės lašinimo pipete klaidos nepaveiktų galutinės NaOH koncentracijos, tam yra paruoštas papildomas tūris.



DĖMESIO!

Šviežiai atskiestas 0,2N NaOH yra būtinas denatūracijos procesui. Netinkamas denatūravimas gali sumažinti išeigą.

1. Sumaišykite šiuos tūrius mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje, kad atskiestumėte 1N NaOH iki 0,2N NaOH:

4 lentelė S2 režimas

Reagentas	Vienos pratekamosios kiuvertės tūris (μl)	Dviejų pratekamųjų kiuvečių tūris (μl)
Laboratorinis vanduo	40	80
1N NaOH atsargos	10	20

Dėl šių tūrių vienos pratekamosios kiuvertės susidaro 50 μl 0,2N NaOH, o dviejų pratekamųjų ląstelių – 100 μl 0,2N NaOH.

5 lentelė S4 režimas

Reagentas	Vienos pratekamosios kiuvertės tūris (μl)	Dviejų pratekamųjų kiuvečių tūris (μl)
Laboratorinis vanduo	80	160
1N NaOH atsargos	20	40

Dėl šių tūrių vienos pratekamosios kiuvertės susidaro 100 μl 0,2N NaOH, o dviejų pratekamųjų ląstelių – 200 μl 0,2N NaOH.

2. Kelis kartus apverskite, kad sumaišytumėte, arba kruopščiai išmaišykite.
3. Sumaišykite šiuos tūrius mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje, kad paruoštumėte 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.
 - Laboratorinis vanduo (600 μl);
 - 1M Tris-HCl, pH 8,0 (400 μl)

Rezultatas yra 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0

PASTABA Laikykite mėgintuvėlį uždengtą. Šviežią skiedinį suvartokite per **12 val.**

Sukurkite normalizuotų bibliotekų telkinį

Įkėlimo koncentracija atsižvelgiant į bibliotekos parengimo kiekybinio įvertinimo ir normalizavimo metodus.

Norėdami normalizuoti bibliotekas iki tinkamos koncentracijos ir tada kaupti, vadovaukitės toliau pateiktomis instrukcijomis. Bibliotekas, esančias sekoje toje pačioje pratekamojoje kiuvertėje, reikia sujungti į vieną normalizuotą telkinį.

PASTABA Maksimalus mėginių, kuriuos galima apdoroti vienoje juostoje naudojant „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ rinkinys skaičius yra 192. Ši riba atsiranda dėl bendro UD indeksų skaičiaus A ir B rinkiniuose.

Normalizuoti bibliotekas telkimui

- Reikiamą bibliotekos koncentraciją nustatykite pagal pageidaujamą galutinio įkėlimo koncentraciją.
 - Norint, kad galutinė įkrovos koncentracija būtų 350 pM, reikia sutelkti bibliotekos koncentraciją 1,75 nM.
 - Norėdami nustatyti susietos bibliotekos koncentraciją kitai galutinės įkrovos koncentracijai, žr. [Bibliotekas praskieskite iki pradinės koncentracijos 49 psl.](#)
- Normalizuokite bibliotekas iki pageidaujamos sujungtos bibliotekos koncentracijos, naudodami 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
Norėdami gauti pagalbos atskiedant bibliotekas iki tinkamos koncentracijos, žr. „Illumina“ interneto svetainėje esantį [telkimo skaičiuotuvą](#).

Rekomenduojamos įkėlimo koncentracijos

Optimali DNR įkėlimo koncentracija priklauso nuo bibliotekos tipo ir įterpimo dydžio. Bibliotekoms, > 450 bp, gali prireikti didesnės apkrovos koncentracijos.

Sutelkti normalizuotas bibliotekas ir pridėti papildomą PhiX kontrolę

- Sujunkite atitinkamą kiekvienos normalizuotos bibliotekos tūrį į naują mikrocentrifugų mėgintuvėlį, kad būtų pasiektas vienas iš šių galutinių tūrių:

Režimas	Galutinis tūris (μl)
S2	150
S4	310

- [Pasirinktinai]** nedenatūruoto PhiX > 1 % priemaiša, kaip nurodyta toliau.
 - Praskieskite 10 nM PhiX iki 2,5 nM, naudodami 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
 - Į nedenatūruotos bibliotekos telkinio vamzdelį įpilkite atitinkamai 2,5 nM PhiX tūrio nedenatūruotos bibliotekos telkinio.

Režimas	Nedenatūruotas 2,5 nM PhiX (μl)	Nedenatūruotas bibliotekos telkinys (μl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Kai piking PhiX, 1 % yra rekomenduojama suma gerai subalansuotų bibliotekų. Nedidelės įvairovės bibliotekoms gali prireikti daugiau. Norėdami naudoti „PhiX“ valdiklį su nedidelės įvairovės bibliotekomis, kreipkitės į „Illumina“ techninės pagalbos tarnybą.

Denatūruotos bibliotekos telkinys ir pasirenkama PhiX kontrolė

1. Įpilkite 0,2N NaOH į nedenatūruotos bibliotekos telkinio ir pasirenkamojo PhiX mėgintuvėlį, kaip nurodyta toliau.

Pratekamoji kiuvetė	0,2N NaOH	Nedenatūruotas bibliotekų telkinys (μl)	Gaunamas tūris
S2	37	150	187 μl arba 187,9 μl su PhiX
S4	77	310	387 μl arba 388,9 μl su PhiX

2. Uždarykite dangteliu ir trumpai pamaišykite sūkuriniu maišytuvu.
3. Centrifuguokite 280 × g iki 1 min.
4. Norėdami denatūruoti inkubuokite 8 min. kambario temperatūroje.
5. Norėdami neutralizuoti, įpilkite 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.

Režimas	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (μl)	Gaunamas tūris
S2	38	225 μl arba 225,9 μl su PhiX
S4	78	465 μl arba 466,9 μl su PhiX

6. Uždarykite dangteliu ir trumpai pamaišykite sūkuriniu maišytuvu.
7. Centrifuguokite 280 × g iki 1 min.
8. Perkelkite visą denatūruotos bibliotekos arba denatūruotos bibliotekos ir PhiX tūrį į „NovaSeq 6000Dx“ bibliotekos vamzdelį.
9. Pereikite prie sekvenavimo. Instrukcijas žr. „NovaSeq 6000Dx“ prietaiso gaminio dokumentacijoje (dokumento Nr. 200010105) ir „DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“, skirta „NovaSeq 6000Dx“ (dokumento Nr. 200014776).

Trikčių šalinimas

Naudokitės šia lentele darbo eigos problemoms šalinti. Jei sekvenavimo serija arba bibliotekos paruošimas mėginiui nepavyksta du kartus, gali prireikti atlikti papildomą trikčių šalinimą. Kreipkitės į „Illumina“ techninės priežiūros skyrių.

Stebėjimas	Galima priežastis	Rekomenduojamas veiksmas
Sekvenavimas neatitinka serijos kokybės kontrolės specifikacijų	Naudotojo arba laboratorijos įrangos klaida tyrimo darbo eigoje	Patikslinkite prisodrintas bibliotekas, kad būtų užtikrintas tinkamas bibliotekos išeigos ir fragmentų dydžio pasiskirstymas. Pakartokite bibliotekos paruošimą atlikdami vieną iš šių veiksmų, priklausomai nuo to, kur įvyko įtariamas naudojimas ar įrangos klaida. Jei nežinoma arba įvyko kitų klaidų, kreipkitės į „Illumina“ techninės pagalbos tarnybą, kad pašalintumėte vykdymo klaidas. • Sudaryti pakartotines bibliotekos sekas. Žr. skyrių „NextSeq 550Dx“ sekvenavimo paruošimas 50 psl., „MiSeqDx“ sekvenavimo paruošimas 52 psl. arba „NovaSeq 6000Dx“ sekvenavimo paruošimas 53 psl. • Pakartotinai sodrinti bibliotekas. Žr. Hibridizuoti zondus 37 psl. • Bibliotekos parengimą pradėkite nuo darbo eigos pradžios. Žr. Naudojimo instrukcija 22 psl.
	Prietaiso problema	Kreipkitės į „Illumina“ techninės priežiūros skyrių.
FASTQ generavimo arba bendrosios sekvenavimo sistemos klaidos (pvz., tinklo klaidos, reagentų įdėjimo / išėmimo klaidos ir kt.)	Programinės įrangos arba instrumento problema	Informacijos apie analizę ieškokite modulyje, programos vadove arba žr. „NextSeq 550Dx Instrument“ informacinis vadovas (dokumento Nr. 1000000009513), „MiSeqDx“ prietaiso informacinis vadovas, skirtas 4 v. MOS sistemai (dokumento Nr. 200010452) arba NovaSeq 6000Dx prietaiso gaminio dokumentaciją (dokumento Nr. 200010105). Dėl papildomos pagalbos kreipkitės į „Illumina“ techninės pagalbos tarnybą.

Stebėjimas	Galima priežastis	Rekomenduojamas veiksmas
DNR biblioteka nesukuria pakankamos išeigos sekvenavimui įkelti	Nepatenkinti mėginio įvesties reikalavimai	Užtikrinkite tinkamą mėginio įvestį ir pakartokite bibliotekos paruošimą. Žr. Rekomendacija dėl mėginio įvesties 18 psl.
	Tyrimo darbo eigoje naudojimo arba įrangos klaida	Pakartokite bibliotekos paruošimą atlikdami vieną iš šių veiksmų, priklausomai nuo to, kur įvyko įtariamas naudojimas ar įrangos klaida. Jei nežinoma arba įvyko kitų klaidų, kreipkitės į „Illumina“ techninės pagalbos tarnybą, kad pašalintumėte vykdymo klaidas. • Sudaryti pakartotines bibliotekos sekas. Žr. skyrių „NextSeq 550Dx“ sekvenavimo paruošimas 50 psl., „MiSeqDx“ sekvenavimo paruošimas 52 psl. arba „NovaSeq 6000Dx“ sekvenavimo paruošimas 53 psl. • Pakartotinai sodrinti bibliotekas. Žr. Hibridizuoti zondus 37 psl. • Bibliotekos parengimą pradėkite nuo darbo eigos pradžios. Žr. Naudojimo instrukcija 22 psl.
	Nepatenkinti sodrinimo zondo skydelio reikalavimai	Užtikrinkite tinkamą sodrinimo zondo skydelį ir pakartokite bibliotekos paruošimą. Žr. Prisodrinimo zondo plokštelės reikalavimai 11 psl.

Veikimo charakteristikos

Našumas su viso egzomo plokštelėmis

Egzamino plokštelės veikimas buvo patikrintas naudojant mažiausią (50 ng) ir didžiausią (1 000 ng) rekomenduojamą Coriell ląstelių linijos gDNA NA12878 įvestį su žinomu tiesos rinkiniu gemlino variantui aptikti (Coriell Platinum genome). Reprezentatyvioms plokštelėms buvo naudojama 1 egzomo plokštelė (45 Mb) ir 2 egzomo plokštelė (36,8 Mb). 24 techniniai kartotiniai mėginiai buvo tiriami per „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimą naudojant 1 egzomo plokštelę (45 Mb) dviem 12 pleksų sodrinimo reakcijomis. 12 techninių pakartojimų buvo tiriami per „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimą naudojant 2 egzomo plokštelę (36,8 Mb) vienoje 12 pleksų sodrinimo reakcijoje. Prisodrintos bibliotekos buvo sekvenuotos „NextSeq 550Dx“ sekvenavimo sistemoje su DNR generavimas FASTQ Dx „Local Run Manager“ moduliu.

Toliau pateiktoje lentelėje rodomos su kiekviena plokštele tirtų techninių kartotinių mėginių antrinės sekos ir varianto priskyrimo našumo metrikos vidutinės vertės.

6 lentelė Tyrimo rezultatai su dviem visos egzomos plokštelėmis

Skydelis	Užpildytas unikalus skaitymo sodrinimas	Aprėpties vienodumas	Fragmento ilgio mediana	SNV jautrumas ¹	SNV tikslumas ²	Intarpo jautrumas ¹	Intarpo tikslumas ²
1 egzomo plokštelė (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
2 egzomų plokštelė (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹ Jautrumas = teigiami / (teisingai teigiami + klaidingai neigiami)² Tikslumas = teisingai teigiami / (teisingai teigiami + klaidingai teigiami)

Aptikimo riba

„Horizon HD799“ DNR atskaitos standartas buvo naudojamas aptikimo ribai patikrinti. HD799 susideda iš saikingai pažeistos formalinu apdorotos DNR, kurios žinomi aleliniai dažniai yra nuo 1 % iki 24,5 %. Buvo naudojama mažiausia rekomenduojama DNR įvestis (50 ng) ir įvertintas SNV, kurių alelių dažnis $\geq 5,0$ %, aptikimo dažnis (VAF). 16 techninių pakartojimų buvo tiriami atliekant „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimą, naudojant FFPE darbo eigą, prisodrintą 16 (1 plekso) sodrinimų pan-vėžio sodrinimo skydeliu (1,94 Mb) ir sekvenavus „NextSeq 550Dx“ prietaisu su DNR generavimas FASTQ Dx moduliu.

Visi mėginiai atitiko plokštelės specifinius mėginių veiksmingumo reikalavimus, kaip parodyta toliau pateiktoje lentelėje.

7 lentelė Mėginio našumas aptikimo ribai

Skydelis	SNV variantų aptikimo dažnis $\geq 5,0$ % VAF	Vidutinis Aprėpties vienodumas
Įvairių vėžio tipų sodrinimo grupė (1,94 Mb, 523 genai)	100 %	99 %

Trukdančiosios medžiagos

Potencialių trukdančiųjų medžiagų poveikis vertintas „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ analizuojant tyrimo veiksmingumą esant tokioms medžiagoms.

Trukdžiai „Whole Blood“

Acetaminofenas (eksogeninis junginys, vaistas), kreatininas ir trigliceridai (endogeniniai metabolitai) buvo ištirti įsiurbiant juos į viso žmogaus kraujo mėginius prieš DNR ekstrahavimą. Siekiant įvertinti kraujo paėmimo (trumpo paėmimo) trukdžius, EDTA taip pat buvo pridėta į visos sudėties kraujo mėginius. Be to, norint įvertinti mėginio paruošimo trukdžius, molekulinės klasės etanolis buvo įstumtas į DNR, išgautą iš viso kraujo.

Toliau pateiktoje lentelėje parodytos kiekvieno interferento tyrimo koncentracijos.

8 lentelė Potencialiai trukdančios medžiagos ir koncentracijos, ištirtos visos sudėties kraujyje

Tiriama medžiaga	Tyrimo koncentracija
Acetaminofenas	15,6 mg/dl* Tris kartus didesnė koncentracija, nei tikėtasi po terapinės vaisto dozės.
Kreatininas	15 mg/dl* Didžiausia stebėta koncentracija gyventojų populiacijoje.
Trigliceridai	1,5 g/dl* Didžiausia stebėta koncentracija gyventojų populiacijoje.
EDTA	6 mg/ml Tris kartus didesnė koncentracija nei tikėtasi kraujyje, paimtame į EDTA mėgintuvėlius.
Molekulinės klasės etanolis	15 % v/v Eliuate po DNR ekstrakcijos.

* Pagal CLSI EP37-ED1:2018

Vienai trukdančiai medžiagai atliekant „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimą buvo ištirti aštuoni techniniai pakartojimai, prisodrinti 1 (45 Mb) egzomo plokštele viename (12 pleksų) sodrinime, o po to sekvenuota „NextSeq 550Dx“ prietaisu su DNR generavimas FASTQ Dx moduliui.

Tirtų medžiagų atveju visi 12 mėginių atitiko mėginių veiksmingumo reikalavimus ir nebuvo pastebėta jokių trukdžių tyrimo veikimui.

Trukdžiai FFPE audiniuose

Du gaubtinės ir tiesiosios žarnos FFPE mėginiai buvo tiriami esant 0,1 mg hemoglobino 10 µm FFPE skyriuje ir jo nesant, kad būtų parodytas blogiausias 50 % FFPE audinių mėginio užteršimo aukšto hemoglobino lygio krauju scenarijus. Mėginiai buvo tiriami per „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimą, naudojant 1 (1,94 Mb) vėžio sodrinimo plokštelę kaip reprezentacinę plokštelę vieno plekso sodrinime. Prisodrintos bibliotekos tada buvo sekvenuotos „NextSeq 550Dx“ prietaisu su DNR generavimas FASTQ Dx moduliui. Visi mėginiai atitiko mėginio veiksmingumo reikalavimus ir buvo įrodyta, kad hemoglobinas netrukdo tyrimo veikimui.

Norint įvertinti mėginio paruošimo trukdžius, du egzogeniniai junginiai buvo įsodinti į DNR, išgautą iš šlapimo pūslės vėžio FFPE audinio mėginio. Ištirtos egzogeninės medžiagos yra ekstrahavimo tirpalai, dažniausiai naudojami DNR ekstrahavimo proceso metu, ir yra išvardytos su tirtais kiekiais šioje lentelėje.

Bandomųjų medžiagų tirpalai yra parduodami kolonėlėse esančiuose DNR izoliavimo rinkiniuose.

9 lentelė Galimai trukdančios egzogeninės medžiagos ir koncentracijos, ištirtos FFPE

Tiriama medžiaga	Tyrimo koncentracija (μl / 30 μl eluato)
Deparafinizacijos tirpalas	113 x 10 ⁻⁶
AW2 plovimo buferinis tirpalas	0,417

Vienai trukdančiai medžiagai atliekant „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimą buvo ištirti aštuoni techniniai pakartojimai, prisodrinti priešvėžiniu sodrinimo skydeliu (1,94 Mb) vienu sodrinimu, o po to sekvenuota „NextSeq 550Dx“ prietaisu su DNR generavimas FASTQ Dx moduliui.

Abiejų tirtų medžiagų atveju visi aštuoni mėginiai atitiko mėginių veiksmingumo reikalavimus ir nebuvo pastebėta jokių trukdžių tyrimo veikimui.

Kryžminė tarša

„Coriell Cell Line“ gDNR NA12878 (moterys, 10 mėginių), „Coriell Cell Line“ gDNR NA12877 (vyrai, 12 mėginių) ir jokių šablonų valdiklių (NTC, 2 mėginiai) per „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ tyrimą buvo ištirtos naudojant šachmatų lentos principu išdėstytą plokštelę. Visiems mėginiams buvo naudojama didžiausia (1 000 ng) gDNR įvesties rekomendacija kaip griežčiausia mėginio kryžminio užteršimo vertinimo sąlyga. Bandymus du kartus atliko du atskiri operatoriai. 1 egzomo plokštelė (45 Mb) buvo naudojama 12-os pleksų sodrinimo reakcijoms. Prisodrintos bibliotekos buvo sekvenuotos „NextSeq 550Dx“ su DNR generavimas FASTQ Dx. Vertinimas buvo atliktas įvertinus konkrečiai vyrų Y chromosomos aprėptį moterų mėginiuose, lyginant su visos moterų mėginių plokštelės foniniu lygiu ir NTC mėginių indekso pateikimu.

10 lentelė Kryžminio užteršimo rezultatai

Moterų mėginiai, kuriuose vyrų Y chromosomos aprėptis yra <3x pradinio įvertinimo triukšmo	Indekso atvaizdavimas NTC
100 %	< 0,0005 %

„DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ Programos efektyvumas

DRAGEN, skirtą „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ „NovaSeq 6000Dx“ programos veikimo charakteristikos pateikiamos „NovaSeq 6000Dx“ instrumentų pakuotės lapelyje (dokumento Nr. 200025276).

DRAGEN, skirtą „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ „NextSeq 550Dx“ pateikia tas pačias antrinės analizės darbo eigas kaip ir „NovaSeq 6000Dx“ programa, įskaitant šias tris darbo eigas: FASTQ generavimas, FASTQ ir VCF generavimas gemalo variantų aptikimui ir FASTQ bei VCF generavimas somatinių variantų aptikimui.

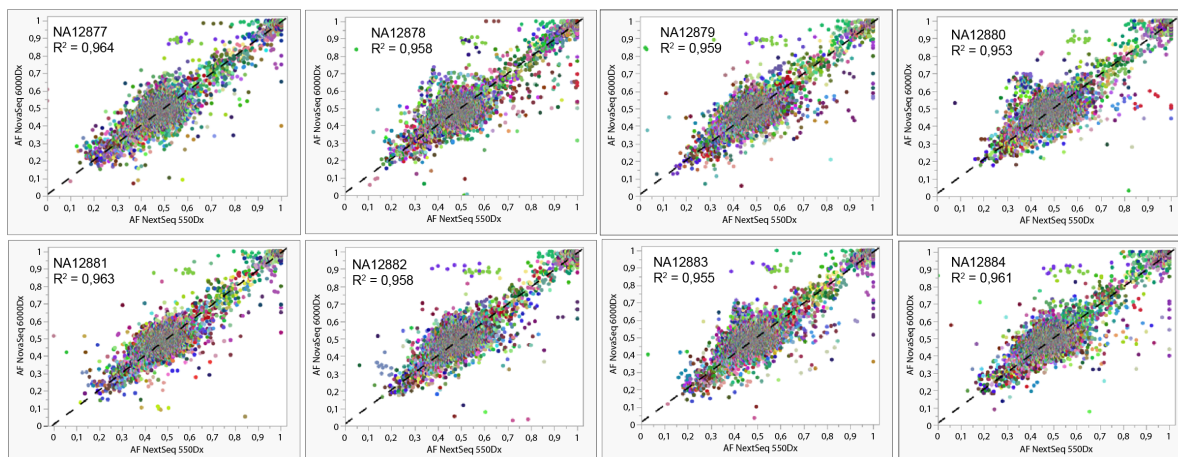
Palyginamos antrinės analizės rezultatai gauti iš to paties bibliotekos paruošimo, sekvenuoto abiejose platformose. „Coriell Cell Line“ gDNR mėginių svyravimo aptikimo dažnis (11 lentelė) ir dažnio sutaptis (žr. 1 pav) buvo įvertinti naudojant reprezentatyvų tyrimą, skirtą įvairiems genams, apimantiems 1 970 505 bazes (9 232 taikinius) visose 23 žmogaus chromosomose, patikrinti. Buvo ištirti aštuoni platininio genomo DNR mėginiai, septyni kartotinių mėginių po šešis (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) ir vienas (NA12881) kartotinių mėginių po penkis (žr. 1 pav). Bibliotekos buvo sujungtos po tris tyrimus su „NovaSeq 6000Dx“ ir „NextSeq 550Dx“ instrumentais, o varianto priskyrimas buvo atliktas naudojant FASTQ ir VCF generavimą „Gemline“ variantų aptikimo analizės darbo eigai „DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ programa.

Remiantis stipria „NovaSeq 6000Dx“ ir „NextSeq 550Dx“ instrumentų pritaikymo našumo koreliacija, „NovaSeq 6000Dx“ instrumentų pakuotės informaciniame lapelyje (dokumento Nr. 200025276) pateiktos su antrine analize susijusios veiksmingumo charakteristikos taip pat laikomos taikytinomis DRAGEN, skirtą „Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ programoje „NextSeq 550Dx“.

11 lentelė Programos veiksmingumas – SNV, intarpų ir iškritų variantų aptikimo sparta

Grupė	„NovaSeq“ 6 000Dx svyravimo aptikimo dažnis	„NovaSeq“ 550Dx svyravimo aptikimo dažnis
„Pan-genome“ skydelis (1,97 Mb, 9 232 tikslai, 23 val.)	99,9 %	99,9 %

1 pav. „NovaSeq 6000Dx“ ir „NextSeq 550Dx“ serijų, vykdomų naudojant „DRAGEN for IDPE Dx“ programos analizę, variantų dažnio palyginimas



Priedas: „Illumina“ UD indeksų adapterio sekos

Šie unikalūs dviejų (UD) indeksų adapteriai yra išdėstyti plokštelėje, kad būtų laikomasi rekomenduojamos poravimo strategijos. Indekso adapteriai yra 10 bazių ilgio, o ne tipišku aštuonių bazių.

1 rodyklė (i7) Adapteriai

CAAGCAAGAGAGGGCATACGAGAT[i7]GTCTCGTGGCTCGG

2 rodyklė (i5) Adapteriai

AATGATACGGGACCACCGATCTACAC [i5] TCGTGGGGGGGGGGGGGGGKGKGTKKGKGKGGKKGKGGKAKTAS

Toliau nurodyta seka naudojama 1 ir 2 nuskaitymo adapterio apkarpymui.

CTGTCTTACACATCT

A plokštelės / 1 rinkinio indekso adapteriai

Indekso pavadinimas	i7 adapterio pagrindai	i5 adapterio pagrindai
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA

Indekso pavadinimas	i7 adapterio pagrindai	i5 adapterio pagrindai
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAGAS
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG

Indekso pavadinimas	i7 adapterio pagrindai	i5 adapterio pagrindai
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGCCA
UDP0045	TAGATAAKAS	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAAKAGTGTTAS	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC

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

B plokštelės / 2 rinkinio indekso adapteriai

Indekso pavadinimas	i7 adapterio pagrindai	i5 adapterio pagrindai
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGKTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Indekso pavadinimas	i7 adapterio pagrindai	i5 adapterio pagrindai
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGC GTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCG	TATATTCGAGAS
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAGAS	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCG	TAGGAACCG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTA	TATAGATTCTG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA

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

Indekso pavadinimas	i7 adapterio pagrindai	i5 adapterio pagrindai
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTGAS	TTAGAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Keitimo istorija

Dokumentas	Data	Keitimo aprašymas
Dokumento Nr. 200038118 v01	2025 m. gruodžio mėn.	- Pašalinta nuoroda į „Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Module“, skirtą „NextSeq 550Dx“. - Paaiškinta valymo po žymėjimo procedūra. - Atnaujintas „MiSeqDx“ prietaiso informacinio vadovo, skirto 4 v. MOS sistemai, dokumento numeris.
Dokumento Nr. 200038118 v00	2023 m. liepos mėn.	Pirminis leidimas. Ankstesnis dokumentas 200019584, pakeistas šiuo. Šio naujo dokumento 200019584 v2 pakeitimai: - Pridėtas turinys, skirtas „NextSeq 550Dx“ prietaiso sekvenavimui palaikyti, naudojant „DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx“ programą skirtą „NextSeq 550Dx“. - Nepateiktų aiškintų reagentų sąrašas. - Į įspėjimus ir atsargumo priemones įtraukta pranešimų apie dažnumą informacija. - Paaiškintas sodrinimo bibliotekų lūkestis. - Pridėta instrukcija paruošti 400 mM Tris-HCl, pH 8,0. - Pašalinta sekvenavimo veiksmo tipografinė klaida. Anksčiau atlikti dokumento 200019584 pakeitimai: - Pridėtas turinys, skirtas sekvenavimui su „NovaSeq 6000Dx“ prietaisu palaikyti. - Pridėta sekvenavimo sistemos pavadinimų ir katalogų numerių. - Pašalinta unikali dvigubo indeksavimo informacija, skirta vieno indekso bibliotekoms.

Patentai ir prekės ženklai

Šis dokumentas ir jo turinys priklauso „Illumina, Inc.“ ir jos filialams („Illumina“), jis skirtas tik klientui naudoti pagal sutartį, kiek tai susiję su čia aprašyto (-ų) produkto (-ų) naudojimu, ir jokių kitų tikslų. Šio dokumento ir jo turinio negalima naudoti ar platinti jokių kitų tikslų ir (arba) kitaip negalima pateikti, atskleisti ar atkurti kokių nors būdu be išankstinio rašytinio „Illumina“ sutikimo. „Illumina“ šiuo dokumentu neperduoda jokios trečiosios šalies licencijos pagal jos patentą, prekės ženklą, autorių ar kitas teises.

Kvalifikuotas ir tinkamai išmokytas personalas turi griežtai ir aiškiai vadovautis šiame dokumente pateiktomis instrukcijomis, kad būtų užtikrintas tinkamas ir saugus šiame dokumente aprašyto (-ų) produkto (-ų) naudojimas. Prieš naudojant tokį (-ius) produktą (-us), visas šis dokumentas turi būti įdėmiai perskaitytas ir suprastas.

JEI NEBUS PERSKAITYTOS VISOS ČIA PATEIKTOS INSTRUKCIJOS IR JOMIS NEBUS VADOVAUJAMASI, GALIMAS PRODUKTO (-Ų) PAŽEIDIMAS, NAUDOTOJO BEI KITŲ ASMENŲ SUŽEIDIMAS IR ŽALA KITAI NUOSAVYBEI, BE TO, TAI PANAIKINA PRODUKTUI (-AMS) TAIKOMOS GARANTIJOS GALIOJIMĄ.

„ILLUMINA“ NEPRISIIMA JOKIOS ATSAKOMYBĖS, JEI ČIA APRAŠOMAS (-I) PRODUKTAS (-AI) (ĮSKAITANT DALIS IR PROGRAMINĘ ĮRANGĄ) NAUDOJAMAS (-I) NETINKAMAI.

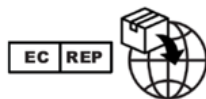
© 2025 „Illumina, Inc.“. Visos teisės saugomos.

Visi prekių ženklai priklauso „Illumina, Inc.“ arba jų atitinkamiems savininkams. Daugiau informacijos apie prekių ženklus žr. www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinė informacija



„Illumina“, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 JAV
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (ne Šiaurės Amerikoje)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

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

Gaminio ženklavimas

Visą informaciją apie gaminių pakuočių ir etikečių simbolius rasite simbolių paaiškinimo lentelėje, pateiktoje svetainės support.illumina.com skirtuke „Documentation“ (dokumentacija).