

İN VİTRO TANI AMAÇLI KULLANIM İÇİNDİR. YALNIZCA DIŞA AKTARMA İÇİNDİR.

Kullanım Amacı

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, *in vitro* tanı testleri geliştirmek için insan hücrelerinden ve dokusundan türetilen genomik DNA'dan numune kütüphaneleri hazırlamak için kullanılan bir reaktif ve sarf malzemeleri setidir. Spesifik genomik ilgi bölgelerini hedefleyen kütüphanelerin hazırlanması için kullanıcı tarafından sağlanan prob panelleri gereklidir. Oluşturulan numune kütüphanelerinin Illumina sekanslama sistemlerinde kullanılması amaçlanmıştır. Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx, sekanslama çalışması kurulum, izleme ve analiz yazılımı içerir.

Prosedür İlkeleri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, insan hücreleri ve dokularından elde edilen genomik DNA'dan hedeflenen bölgeler için zenginleştirilmiş DNA sekanslama kütüphanelerinin manuel olarak hazırlanması için tasarlanmıştır.

Hedef zenginleştirme için kullanıcı tarafından sağlanan biyotinlenmiş oligonükleotid panelleri gereklidir. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, küçük paneller dahil olmak üzere bir dizi panel boyutuyla (< 20.000 prob) ve büyük paneller ile (> 200.000 prob) uyumludur. Oluşturulan zenginleştirilmiş kütüphaneler Illumina sekanslama sistemlerinde sekanslama yapmak için tasarlanmıştır.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti prosedürü aşağıdaki adımlardan oluşur:

- **Genomik DNA Tagmentasyonu**-DNA girişini tagmentlemek için Enrichment BLT Small (eBLTS) kullanır. Tagmentasyon sırasında gDNA parçalanır ve tek bir adımda adaptörlerle etiketlenir. Tagmentasyon reaksiyonunda eBLTS'i doymuş duruma getirmek için minimum 50 ng'lık bir DNA girişi gereklidir. Doygun duruma geldiğinde, eBLTS tutarlı parça boyutu dağılımına sahip normalleştirilmiş kütüphaneler oluşturmak için belirli sayıda DNA molekülünü parçalara ayırır.
- **Tagmentasyon Sonrası Temizleme**-Çoğaltmada kullanmak üzere eBLTS üzerindeki adaptör etiketli DNA'yı temizler.
- **Tagmentasyon Uygulanmış DNA'yı Çoğaltma**-Sınırlı döngülü bir PCR programı kullanarak tagmentlenmiş DNA'yı çoğaltır. DNA parçalarının uçlarına benzersiz çift (UD) dizinleri eklenir ve bu da DNA kütüphanelerinin çift benzersiz barkodlanmasını ve sekanslama sırasında küme oluşturulmasını sağlar.
- **Kütüphaneleri Temizleme**-Saflaştırmak ve çoğaltılmış DNA kütüphanelerinin boyutunu seçmek için boncuk saflaştırma prosedürü kullanır.
- **Kütüphaneleri Havuzlama**-DNA kütüphanelerini benzersiz dizinlerle 12 kütüphaneye kadar tek bir havuzda birleştirir. Kütüphaneleri hacme veya kütleyle göre havuzlayabilirsiniz.

- **Probları Hibridize Etme**–Çift sarmallı DNA kütüphanelerinin denşirilmiş olduğu ve biyotinlenmiş DNA problemlerinin panelinin hedeflenen genomik bölgelere hibridize edildiği bir hibridizasyon reaksiyonundan oluşur.
 - Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, birden fazla panelle uyumludur. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, bir zenginleştirme paneli içermez. Prob panelleri kullanıcı tarafından sağlanır ve gerekli spesifikasyonları karşılamalıdır. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti reaktifleri, gerekli spesifikasyonları karşılayan hem Illumina hem de üçüncü taraf zenginleştirme DNA oligonükleotid panelleriyle uyumludur. Üçüncü taraf panellere ait gerekli teknik özellikler hakkında bilgi için bkz. [Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri, sayfa 10](#)
- **Hibridize Problemleri Kaydetme**–Hedeflenen ilgilenilen bölgelere hibridize edilen biyotinlenmiş problemleri kaydetmek için Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) kullanır.
- **Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Çoğaltma**–Zenginleştirilmiş kütüphaneleri çoğaltmak için PCR kullanır.
- **Çoğaltılmış Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Temizleme**–Sekanslamaya hazır zenginleştirilmiş kütüphaneleri saflaştırmak için bir boncuk saflaştırma prosedürü kullanır.
- **Sekanslama**–Zenginleştirilmiş kütüphanelerin sekanslaması MiSeqDx™, NextSeq 550Dx™ veya NovaSeq 6000Dx™ sekanslama sistemlerinde gerçekleştirilir. MiSeqDx için entegre DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Modülü, temel aramalardan sekanslama çalışması kurulumu, çalışma izleme ve FASTQ oluşturma için kullanılır. NextSeq 550Dx with DRAGEN Server ve NovaSeq 6000Dx için DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulaması, çeşitli mevcut iş akışlarıyla birlikte çalışma kurulumu ve ikincil analiz için kullanılır.

Prosedür Kısıtlamaları

- *In Vitro* tanı amaçlı kullanım içindir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, insan hücreleri ve dokusundan türetilen genomik DNA ile uyumludur.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, 50–1000 ng çift sarmallı gDNA girişleriyle uyumludur. Bu eşiklerin dışındaki girdilerle performans garanti edilmez.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, DNA ekstraksiyonu için reaktifleri içermez. [Performans Özellikleri, sayfa 57](#)'de sunulan interferans testi de dahil olmak üzere analitik test sonuçları, tam kan ve temsili DNA ekstraksiyon kitleriyle temsili numune tipleri olarak FFPE ile elde edilmiştir. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti reaktifleriyle kullanılmak üzere geliştirilen tüm tanı testlerinde tercih edilen DNA ekstraksiyon kitiyle performansın tüm yönleri için tam validasyon gereklidir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, $\Delta Cq > 5$ olan düşük kaliteli FFPE numuneleri için önerilmez. $\Delta Cq > 5$ olan numunelerin kullanılması kütüphane hazırlığının başarısız olma olasılığını artırabilir ve test performansını azaltabilir.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti reaktifleri, aşağıdaki tabloda belirtilen numune girdisi, zenginleştirme reaksiyonları ve çokluk için yapılandırılmış ve test edilmiştir.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti	Numune Girdisi	Zenginleştirme Reaksiyonları	Zenginleştirme Çokluğu
16 numune kiti	Düşük kalite (FFPE)	16 reaksiyon	1'li
96 numune kiti	Yüksek kalite (ör. tam kan)	8 reaksiyon	12'li

- FFPE giriş işlemesi test edilmiştir ve yalnızca 16 numune kitinin kullanıldığı 1'li zenginleştirme reaksiyonları için önerilir.
- 96 numune kiti için standart olmayan çokluklar (2'li ile 11'li) mümkündür, ancak aşağıdaki sınırlamaları vardır:
 - Numunelerin 2'li ile 11'li zenginleştirme reaksiyonları içinde işlenmesi, kitin verimini azaltır.
 - Optimum sonuçlar garanti edilmez. Standart dışı çokluklar için uygun zenginleştirme verimi elde etmek ek optimizasyon gerektirebilir.
 - Düşük çokluklu (2'li ile 8'li) havuzlama stratejileri için başarılı sekanslama ve veri analizi için renk dengesini optimize etmek üzere çeşitli sekanslara sahip dizin adaptörlerinin seçilmesi gerekir. MiSeqDx ve NextSeq 550Dx üzerindeki DNA GenerateFASTQ Dx modülü, çalıştırma kurulumu sırasında renk dengeli dizin kombinasyonları için seçenekler sunar. Havuzlama stratejileri hakkında daha fazla bilgi için bkz. [Havuzlama Yöntemleri, sayfa 33](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, sadece MiSeqDx, NextSeq 550Dx ve NovaSeq 6000Dx üzerinde sekanslanan zenginleştirilmiş kütüphaneler iletmekle sınırlıdır. Diğer sekanslama sistemlerinin kullanımı, performansın tüm yönleri için tam validasyon gerektirir.
- Zenginleştirme panelleri bu ürünün bir parçası olarak dahil edilmemiştir. [Performans Özellikleri, sayfa 57](#)'de sağlanan analitik test sonuçları, temsili zenginleştirme panelleriyle elde edilmiştir ve yalnızca bilgilendirme amacıyla sağlanmıştır. Analitik performans özellikleri, testin genel kapasitesini örneklendirmeye yarar ve herhangi bir spesifik test iddiasıyla ilgili kapasite veya uygunluk belirlemez. Bu reaktiflerle kullanılmak üzere geliştirilen tüm tanı testleri, performansın tüm yönleri için tam validasyon gerektirir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, hem Illumina hem de üçüncü taraf zenginleştirme panelleriyle uyumludur. Ancak, panel gerekliliklerini karşılamayan üçüncü taraf zenginleştirme panellerinin performansı garanti edilmez. Panel gereklilikleri hakkında bilgi için [Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri, sayfa 10](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, 2 saatlik hibridizasyon süresi kullanır. Daha uzun bir hibridizasyon süresi kullanmak performans metriklerini etkileyebilir.
- MiSeqDx için DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager modülleri sadece FASTQ dosyalarını iletir. Bu modülleri kullanıyorsanız ikincil analiz doğrulaması yapmanız gerekir.

- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulaması, NextSeq 550Dx with DRAGEN Server üzerinde ve NovaSeq 6000Dx üzerinde mevcuttur. Uygulama FASTQ üretimi, germ hattı varyant tespiti için FASTQ ve VCF üretimi ve somatik varyant tespiti için FASTQ ve VCF üretimi dahil olmak üzere birden fazla ikincil analiz iş akışını destekler. VCF oluşturma için uygulamayı kullanıyorsanız, ikincil analiz validasyonu yapmanız gerekmez. Uygulamanın sınırlamaları aşağıdakileri içerir:
 - >18 bp uzunluk insersiyonları ve > 21 bp uzunluk delesyonları doğrulanmamıştır.
 - Çoklu nükleotid varyantları (MNV) ve büyük insersiyon/delesyonlar dahil olmak üzere büyük varyantlar, çıktı VCF dosyasında ayrı ayrı daha küçük varyantlar olarak raporlanabilir.
 - Küçük MNV'ler çıktı VCF dosyasında ayrı varyantlar olarak rapor edilir.
 - Delesyonlar VCF dosyasında, VCF biçimine göre önceki bazın koordinatında raporlanır. Dolayısıyla, bağımsız bir baz aramayı homozigot referans olarak raporlamadan önce bitişik varyantları değerlendirin.
 - Germ hattına özgü kısıtlamalar:
 - DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Germ Hattı FASTQ ve VCF oluşturma analiz iş akışı, germ hattı varyant arama (ör. homozigot, heterozigot, yabani tip) için kalitatif sonuçlar sağlamak üzere tasarlanmıştır.
 - Kopya sayısı varyasyonu, bir varyantın homozigot veya heterozigot olarak tanımlanmasını etkileyebilir.
 - Sistem, kopya sayısı varyasyonu varlığında bile tek bir lokusta ikiden fazla varyant bildirmeyecektir.
 - Somatiğe özgü kısıtlamalar:
 - DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının Somatik FASTQ ve VCF oluşturma analiz iş akışı, somatik varyant çağırma (yani bir somatik varyantın varlığı) için kalitatif sonuçlar sağlamak üzere tasarlanmıştır.
 - Somatik FASTQ ve VCF oluşturma analizi iş akışı germ hattı ve somatik varyantları ayırt edemez. İş akışı, geniş bir varyant frekansı yelpazesinde varyantları saptamak için tasarlanmıştır ancak varyant frekansı somatik varyantları germ hattı varyantlarından ayırmak için kullanılamaz.
 - Numunedeki normal doku, varyantların saptanmasını etkiler. Raporlanan saptama sınırı, hem tümör dokusundan hem de normal dokudan ekstrakte edilen toplam DNA'ya nispeten varyant frekansına bağlıdır.
 - Aynı lokusta birden fazla varyant alel adlandırılırsa, alellerin hiçbirisi geçer varyantlar olarak rapor edilmeyecektir. Bunun yerine, tüm alel seti rapor edilecek ancak multiallelik etiket ile filtrelenecektir.

Ürün Bileşenleri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti aşağıdaki bileşenlerden oluşur.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, katalog no. 20051354 (16 numune) veya no. 20051352 (96 numune)

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, katalog no. 20051355 (16 numune) veya No. 20051353 (96 numune)
- MiSeqDx için Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Modülü, katalog no. 20063022
- NovaSeq 6000Dx için DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulaması, katalog no. 20074609
- NextSeq 550Dx için DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulaması, katalog no. 20074730

Temin Edilen Reaktifler

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx'nin tamamlanması için Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A veya Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B gerekir. 16 numune veya 96 numune kiti kullanarak aşağıdaki sayıda kütüphane hazırlığı ve zenginleştirme reaksiyonu gerçekleştirebilirsiniz.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti	Numune Girdisi	Zenginleştirme Reaksiyonları	Zenginleştirme Çokluğu
16 numune kiti	Düşük kalite (FFPE)	16 reaksiyon	1'li
96 numune kiti	Yüksek kalite (ör. tam kan)	8 reaksiyon	12'li

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

Illumina Prep Dx Tagmentasyon Reaktifleri 1, 15 °C ila 30 °C'de saklayın.

Aşağıdaki reaktifler oda sıcaklığında gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen saklama sıcaklığında depolayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı		Kapak Rengi	Dolum Hacmi	Aktif Bileşenler
	16 Numune (No. 20050020)	96 Numune (No. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Kırmızı	350 µl	Suda deterjan çözeltisi.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Yeşil	41 ml	Deterjan ve tuz içeren tamponlanmış sulu çözelti.
Cleanup Beads (CB)	1	N/A* (Geçerli Değil)	Kırmızı	10 ml	Tamponlanmış sulu çözeltide katı halde paramanyetik boncuklar.

* 96 numune için Cleanup Beads, Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Numune (No. 20050030) dahil edilmiştir.

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 Numune), 15 °C ila 30 °C'de saklayın

96 numune kiti için Cleanup Beads, Illumina Prep Dx Cleanup Beads'e (katalog no. 20050030) dahil edilmiştir. Aşağıdaki reaktif oda sıcaklığında gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen saklama sıcaklığında depolayın. 16 numune kiti için Cleanup Beads, Illumina Prep Dx Tagmentasyon Reaktifleri 1'e (katalog no. 20050020) dahil edilmiştir.

Reaktif Adı	Miktar	Kapak Rengi	Dolum Hacmi	Aktif Bileşenler
Temizleme Boncukları (CB)	4	Kırmızı	10 ml	Tamponlanmış sulu çözeltide katı halde paramanyetik boncuklar.

Illumina DNA Prep Dx Tagmentasyon Reaktifleri 2, 2 °C ila 8 °C'de saklayın.

Aşağıdaki reaktifler soğutulmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen saklama sıcaklığında depolayın. Boncukların her zaman tampona batmış durumda olması için eBLTS stok tüpünü dik olarak saklayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı		Kapak Rengi	Dolum Hacmi		Aktif Bileşenler
	16 Numune (No. 20050021)	96 Numune (No. 20050026)		16 Numune	96 Numune	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Sarı	200 µl	290 µl	Gliserol, EDTA, ditiyotritol, tuz ve deterjan içeren tamponlu sulu çözeltide transpozomlarla bağlantılı Streptavidin Manyetik Boncukları.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Şeffaf	1,8 ml	1,8 ml	Tamponlanmış sulu çözelti.

Illumina Prep Dx Tagmentasyon Reaktifleri 3, -25 °C ila -15 °C'de saklayın.

Aşağıdaki reaktifler dondurulmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen saklama sıcaklığında depolayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı		Kapak Rengi	Dolum Hacmi		Aktif Bileşenler
	16 Numune (No. 20050022)	96 Numune (No. 20050027)		16 Numune	96 Numune	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Şeffaf	290 µl	290 µl	Magnezyum tuzu ve dimetilformamid içeren tamponlu sulu çözelti.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Şeffaf	200 µl	610 µl	Tamponlanmış sulu çözeltide DNA polimeraz ve dNTP'ler.

Illumina DNA Prep Dx Zenginleştirme Reaktifleri 1 (16 numune), 2 °C ila 8 °C'de saklayın.

16 numune kiti için aşağıdaki reaktifler, Illumina DNA Prep Dx Zenginleştirme Reaktifleri 1'e (katalog no. 20050023) dahil edilmiştir. 96 numune kiti için reaktifler, Illumina Prep Dx Zenginleştirme Reaktifleri 1'e (katalog no. 20050028) dahil edilmiştir.

Aşağıdaki reaktifler soğutulmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen saklama sıcaklığında depolayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı	Kapak Rengi	Dolum Hacmi	Aktif Bileşenler
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Şeffaf	1,2 ml	Formamid, deterjan ve tuz içeren tamponlu sulu çözelti içinde Streptavidin Manyetik Boncukları.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Şeffaf	1,8 ml	Tamponlanmış sulu çözelti.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Şeffaf	200 µl	Deterjan ve tuz içeren tamponlanmış sulu çözelti.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Şeffaf	200 µl	Tamponlanmış sulu çözelti.

Illumina Prep Dx Zenginleştirme Reaktifleri 1 (96 numune), 2 °C ila 8 °C'de saklayın.

96 numune kiti için aşağıdaki reaktifler, Illumina Prep Dx Zenginleştirme Reaktifleri 1'e (katalog no. 20050028) dahil edilmiştir. 16 numune kiti için reaktifler, IlluminaDNA Prep Dx Zenginleştirme Reaktifleri 1'e (katalog no. 20050023) dahil edilmiştir.

Aşağıdaki reaktifler soğutulmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen saklama sıcaklığında depolayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı	Kapak Rengi	Dolum Hacmi	Aktif Bileşenler
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Şeffaf	1,2 ml	Formamid, deterjan ve tuz içeren tamponlu sulu çözelti içinde Streptavidin Manyetik Boncukları.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Şeffaf	1,8 ml	Tamponlanmış sulu çözelti.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Şeffaf	200 µl	Deterjan ve tuz içeren tamponlanmış sulu çözelti.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Şeffaf	200 µl	Tamponlanmış sulu çözelti.

Illumina DNA Prep Dx Zenginleştirme Reaktifleri 2, -25 °C ila -15 °C'de saklayın.

Aşağıdaki reaktifler dondurulmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen saklama sıcaklığında depolayın.

Reaktif Adı	Tüp Miktarı		Kapak Rengi	Dolum Hacmi	Aktif Bileşenler
	16 Numune (No. 20050024)	96 Numune (No. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Şeffaf	580 µl	Suda deterjan çözeltisi.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Amber	4,1 ml	Tuz ve deterjan içeren tamponlanmış sulu çözelti.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Şeffaf	320 µl	PCR primerleri (oligonükleotidler) karışımı.
2 N NaOH (HP3)	1	1	Şeffaf	200 µl	2 N sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi.
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Mavi	480 µl	Cot-1 DNA, kalabalık ajanı ve formamid içeren tamponlu sulu çözelti
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Şeffaf	200 µl	Tamponlanmış sulu çözeltide DNA polimeraz ve dNTP'ler.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, -25 °C ila -15 °C'de saklayın

Aşağıdaki reaktifler dondurulmuş olarak gönderilir. Uygun şekilde performans elde etmek için reaktifleri derhal belirtilen saklama sıcaklığında depolayın. Dizin adaptör sekansları için bkz. [Ek: Illumina UD Dizinleri Adaptör Sekansları, sayfa 62.](#)

Bileşen	Miktar
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Dizin), no. 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 Dizin), no. 20050039	1

Temin Edilmeyen Reaktifler

Gerekli Reaktifler, Temin Edilmeyen

- DNA ekstraksiyonu ve saflaştırma reaktifleri
- DNA miktar tayini reaktifleri
- Etanol (moleküler biyoloji için 200 proof)

- Nükleaz içermeyen su
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 1 N NaOH çözeltisi, moleküler biyoloji sınıfı
- NextSeq 550Dx sequencing system kullanıyorsanız:
 - 200 mM Tris, pH 7,0 (1 M Tris-HCL, pH 7,0'dan seyreltilebilir)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 döngü), (katalog no. 20028871)
- MiSeqDx sekanslama sistemi kullanılıyorsa:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalog no. 20037124)
- NovaSeq 6000Dx sekanslama sistemi kullanıyorsanız:
 - 400 mM Tris, pH 8,0 (1 M Tris-HCL, pH 8,0'dan seyreltilebilir)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reaktif Kiti (300 döngü) (katalog no. 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reaktif Kiti (300 döngü) (katalog no. 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Tampon Kartuşu (katalog no. 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Tampon Kartuşu (katalog no. 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Kütüphane Tüpü (katalog no. 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Kütüphane Tüpü, 24 Paket (katalog no. 20062291)

Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti reaktifleri, hem Illumina hem de üçüncü taraf zenginleştirme DNA oligonükleotid panelleriyle uyumludur. Üçüncü taraf biyotinlenmiş DNA problemleri (sabit veya özel paneller) kullanıyorsanız, gerekli spesifikasyonları karşıladıklarından emin olun.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, aşağıdaki üçüncü taraf panel spesifikasyonları kullanılarak optimize edilmiş ve doğrulanmıştır. Spesifikasyonları karşılamayan üçüncü taraf paneller kullanılırken benzer performans garanti edilmez.

- 80 bp veya 120 bp prob uzunluğu
- 500 ile 675.000 prob arasında
- Tek veya çift sarmallı DNA
- 1'iden 12'liye kadar çokluklarda zenginleştirme için ≥ 3 pmol toplam prob girişi

Depolama ve Taşıma

- Oda sıcaklığı 15 °C ila 30 °C olarak tanımlanmıştır.
- Reaktifler belirtilen şekilde saklandıklarında kit etiketlerinde belirtilen son kullanım tarihine kadar stabildir. Saklama sıcaklıkları için bkz. [Temin Edilen Reaktifler, sayfa 5](#).

- Dondurulmuş reaktifler, belirtilen son kullanma tarihinden önce oluşan maksimum dört dondurma-çözdürme döngüsü boyunca stabildir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti prosedürü, aşağıdaki güvenli durma noktalarını içerir:
 - [Tagmentasyon Uygulanmış DNA'yı Çoğaltma, sayfa 28](#) işleminden sonra, çoğaltılmış kütüphaneler -25 °C ila -15 °C'de saklandığında 30 güne kadar stabildir.
 - [Kütüphaneleri Temizleme, sayfa 30](#) işleminden sonra, temizlenmiş çoğaltılmış kütüphaneler -25 °C ila -15 °C'de saklandığında 30 güne kadar stabildir.
 - [Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Havuzlama, sayfa 32](#) işleminden sonra, havuzlanmış kütüphaneler -25 °C ila -15 °C'de saklandığında 30 güne kadar stabildir.
 - [Zenginleştirilmiş Kütüphaneyi Çoğaltma, sayfa 43](#) işleminden sonra, zenginleştirilmiş, çoğaltılmış kütüphaneler plakası termal döngüleyicide 24 saate kadar kalabilir. Alternatif olarak plaka 2 °C ila 8 °C'de 48 saat kadar saklanabilir.
 - Temizlenen son zenginleştirilmiş kütüphaneler, -25 °C ila -15 °C'de saklandığında 7 güne kadar stabildir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti ambalajı veya içerikleri hasar görmüşse veya bozulmuşsa lütfen Illumina Müşteri Hizmetleri ile iletişim kurun.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) görünür çökeltiler veya kristaller oluşturabilir. Çökelti gözlenirse 37 °C'de 10 dakika ısıtın ve ardından çökeltiler çözünene kadar vorteksleyin.
- Hybridization Oligos (HYB) ve Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW), numune tipi ve prob paneli uyarınca geçerli olan hibridizasyon bekletme sıcaklığına kadar önceden ısıtılmalıdır. HYB ve EEW ile çalışma hakkında daha fazla bilgi için bkz. [Prosedür Notları, sayfa 16](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) ve HYB Tamponu+IDT NXT Blokerlerinde (NHB2) kristalleşme ve bulanıklık oluşabilir. Kristaller ve bulanıklık gözlenirse vorteksleyin veya çözelti berraklaşana kadar karıştırmak için yukarı ve aşağı pipetleyin. Pipetlemeden önce NHB2'yi önceden ısıttığınızdan emin olun.
- Cleanup Beads (CB) ile çalışırken aşağıdaki iyi uygulamalara başvurun.
 - Boncukları asla dondurmayın.
 - Kullanmadan hemen önce boncukları, yeniden süspanse olana kadar ve renk homojen görününceye kadar vorteksleyin.
- Enrichment BLT Small (eBLTS) ile çalışırken aşağıdaki iyi uygulamalara başvurun.
 - Boncukların her zaman tampona batmış durumda olması için eBLTS tüpünü dik olarak saklayın.
 - Boncuklar yeniden süspanse olana kadar eBLTS'yi iyice vorteksleyin. Boncukların yeniden dibe çökmesini önlemek için pipetlemeden önce santrifüj yapılması önerilmez.
 - Boncuklar 96 kuyucuklu bir plakanın kenarına veya üstüne yapışırsa 3 saniye boyunca 280 × g'de santrifüjleyin ve ardından yeniden süspanse etmek için pipetleyin.
- Dizin adaptör plakalarını kullanırken aşağıdaki iyi uygulamalara başvurun:
 - Dizin adaptör plakasına numune eklemeyin.
 - Dizin plakasının her bir kuyucuğu sadece tek kullanımlıktır.

Gerekli Ekipmanlar ve Materyaller, Temin Edilmeyen

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti'e ilaveten protokole başlamadan önce gereken ekipman ve malzemelere sahip olduğunuzdan emin olun.

Ekipman

Protokole başlamadan önce gereken ekipmana sahip olduğunuzdan emin olun.

Protokol, listelenen spesifikasyonlara sahip öğeler kullanılarak optimize edilmiş ve valide edilmiştir. Ekipmanı spesifikasyonların dışında kullanırken benzer performans garanti edilmez.

Bazı öğeler yalnızca belirli iş akışları için gereklidir. Bu öğeler ayrı tablolarda belirtilmiştir.

- Aşağıdaki teknik özelliklere sahip termal döngüleyici:
 - Isıtmalı kapak
 - 10 °C ila 98 °C'lik minimum sıcaklık kontrol aralığı
 - Minimum $\pm 0,25$ °C sıcaklık doğruluğu
 - Maksimum 100 μ l'lik reaksiyon hacmi
 - Tam etekli 96 kuyucuklu PCR plakaları ile uyumlu
- Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip mikronumune inkübatörü:
 - +5,0 °C ila 99,0 °C ortam sıcaklık aralığı
 - 96 kuyucuklu MIDI plakalarla uyumlu
- 96 kuyucuklu MIDI plakalarla uyumlu mikronumune inkübatör parçaları
- 200–3000 rpm karıştırma hızı aralığına sahip yüksek hızlı mikrolaka çalkalayıcı
- 96 kuyucuklu PCR plakalarıyla uyumlu manyetik stant
- 96 kuyucuklu MIDI plakalarla uyumlu manyetik stant
- Miktar tayini yönteminizle uyumlu florometre
- DNA fragman analizörü
- Hassas pipetler:
 - 10 μ l tek kanallı ve çok kanallı pipetler
 - 20 μ l tek kanallı ve çok kanallı pipetler
 - 200 μ l tek kanallı ve çok kanallı pipetler
 - 1000 μ l tek kanallı pipetler
 - Hassas pipetler doğru reaktif ve numune iletimi sağlar. Tek kanallı veya çok kanallı pipetler, düzenli olarak kalibre edildiklerinde ve belirtilen hacmin %5'i dahilinde doğru olduklarında kullanılabilir.

- Mikroplaka santrifüj
- Mikrosantrifüj
- Aşağıdaki Illumina sekanslama sistemlerinden biri:
 - MiseqDx Cihazı, katalog no. DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx Cihazı, katalog no. 20005715, NextSeq 550Dx için isteğe bağlı Illumina DRAGEN Server ile, katalog no. 20086130
 - NovaSeq 6000Dx Cihazı, Katalog No 20068232
- [İsteğe bağlı] Vakum konsantratörü
- [FFPE] Gerçek zamanlı PCR tespit sistemi

Malzemeler

Protokole başlamadan önce gereken malzemelere sahip olduğunuzdan emin olun.

Bazı öğeler yalnızca belirli iş akışları için gereklidir. Bu öğeler ayrı tablolarda belirtilmiştir.

Protokol, listelenen öğeler kullanılarak optimize ve valide edilmiştir. Alternatif malzemeler kullanıldığında benzer performans garanti edilmez.

- Filtrelenmiş pipet uçları
- Konik santrifüj tüpleri, 15 ml veya 50 ml
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri
- RNase/DNase içermeyen çok kanallı reaktif hazneleri, tek kullanımlık
- RNase/DNase içermeyen 8 tüplü şeritler ve kapaklar
- Serolojik Pipetler
- 96 kuyucuklu polipropilen derin kuyucuklu saklama plakası, 0,8 ml (MIDI plakası)
- Hard-Shell 96 kuyucuklu tam etekli PCR plakaları
- [FFPE] qPCR cihazıyla uyumlu qPCR plakaları
- Aşağıdaki spesifikasyonlara sahip 96 kuyucuklu plakalar için yapışkan contalar:
 - Soyulabilir, optik olarak şeffaf polyster
 - Etekli PCR plakaları için uygun
 - -40 °C ila 110 °C arasında birden fazla sıcaklık değişimine dayanıklı güçlü yapışkan
 - DNase/RNase içermeyen
- Tercih edilen kantifikasyon yöntemiyle uyumlu plastik sarf malzemeleri
- Seçilen kantifikasyon sistemiyle uyumlu florometrik dsDNA kantifikasyon kiti:
 - Önceden zenginleştirilmiş çoğaltılmış kütüphanelerin miktarını tayin etmek için geniş aralıkta bir ölçüm kiti kullanılabilir.

- Zenginleştirilmiş kütüphanelerin miktarını tayin etmek için kantifikasyon kitinin aralığı kullanılan prob paneline bağlıdır.
- Seçilen kalifikasyon sistemiyle kütüphane kalifikasyonu için parça analiz kiti:
 - Önceden zenginleştirilmiş çoğaltılmış kütüphanelerin kalifikasyonu için geniş kapsamlı bir kit kullanılabilir.
 - Zenginleştirilmiş kütüphanelerin kalifikasyonu için kalifikasyon kitinin aralığı kullanılan prob paneline bağlıdır.
- **[İsteğe bağlı]** İnsan hücreleri ve dokusundan DNA ekstraksiyonu için kit. Valide edilmiş herhangi bir ekstraksiyon yöntemini kullanılabılırsınız.

Numune Toplanması, Nakliyesi ve Depolaması



DİKKAT

Tüm numuneleri potansiyel olarak bulaşıcı maddelermiş gibi taşıyın.

- Bu test, insan hücreleri ve dokusundan türetilen genomik DNA ile uyumludur.
- Piyasada bulunan saflaştırılmış gDNA için numunelerin doğru koşullar altında taşındığından ve üreticinin talimatına göre saklandığından emin olun. gDNA'nın saklanması ve dondurulması-çözdürülmesi döngüleri için iyi uygulamaları izleyin.
- Tam kan girdisi için tercih edilen DNA ekstraksiyon yöntemi için geçerli olan kan toplama, taşıma ve saklama gerekliliklerini izleyin. Valide edilmiş herhangi bir ekstraksiyon yöntemi kullanılabilir. Tam kanın taşınması, etiyolojik maddelerin taşınmasına yönelik ülke, federal, eyalet ve yerel olmak üzere tüm düzenlemelere uygun olmalıdır.
- FFPE dokusundan DNA ekstraksiyonu için valide edilmiş herhangi bir ekstraksiyon yöntemi kullanılabilir. Aşağıdaki uygulamaları belirlemek üzere tercih edilen ekstraksiyon yöntemi için geçerli talimat ve önerileri izleyin:
 - Ekstrakte edilen DNA'nın en iyi kalitede olmasını sağlamak için dokular için formalin fiksasyonu ve parafine gömme yöntemi.
 - FFPE numunelerinin saklanması.
 - FFPE kesitlerinin sayısı ve kalınlığı gibi başlangıç materyali gereklilikleri. Çoğu saflaştırma yöntemi, yeni kesilmiş kesitlerin kullanılmasını önerir.

Uyarılar ve Tedbirler

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti reaktifleri potansiyel olarak tehlikeli kimyasallar içerir. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması hâlinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. Maruziyet riskine karşı göz koruması, eldivenler ve laboratuvar önlüğü dâhil olmak üzere koruyucu donanım giyin. Kullanılan reaktifleri

kimyasal atık olarak ele alın ve geçerli bölgesel, ulusal ve yerel kanun ve düzenlemeler uyarınca atın. Ek çevre, sağlık ve güvenlik bilgileri için, support.illumina.com/sds.html adresindeki Güvenlik Veri Sayfalarına (SDS) bakın.

- Bu ürünle ilgili olarak ortaya çıkan tüm ciddi olayları derhal Illumina'ya ve kullanıcının ve hastanın bulunduğu üye devletlerin Yetkili Makamlarına raporlayın.
- Tüm kan numunelerine İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV), İnsan Hepatit B Virüsü (HBV) ve diğer kanla bulaşan patojenleri bulaştıracak biliniyormuş gibi muamele edin (evrensel tedbirler).
- Rutin laboratuvar tedbirlerini uygulayın. Ağızınızla pipetlemeyin. Belirlenmiş çalışma alanlarında yemek yemeyin, içecek tüketmeyin veya sigara içmeyin. Numuneleri ve kit reaktiflerini kullanırken tek kullanımlık eldiven takın ve laboratuvar önlüğü giyin. Numuneleri ve kit reaktiflerini elledikten sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- Numune veya reaktif bozunmasını önlemek için temizlikten kaynaklanan tüm sodyum hipoklorit buharlarının protokole başlamadan önce tamamen dağıldığından emin olun.
- Numunelerin diğer PCR ürünleri/amplikonları ile kontamine olması hatalı ve güvenilmez sonuçlara neden olabilir. Kontaminasyonu önlemek için aşağıdaki iyi uygulamalara başvurun:
 - Uygun laboratuvar uygulamalarını ve laboratuvar hijyeni ilkelerini hayata geçirin.
 - Belirlenmiş pre-amplifikasyon ve post-amplifikasyon alanlarında iş akışı adımlarını uygulayın.
 - Kütüphaneleri temizlemeden önce kullanılmış reaktifleri bir pre-amplifikasyon alanında saklayın.
 - Pre-amplifikasyon reaktiflerini amplifikasyon sonrası reaktiflerinden ayırın.
 - Pre-amplifikasyon ve post-amplifikasyon alanlarında pipet, pipet uçları, vorteks cihazı ve santrifüj gibi özel ekipmanların bulunduğundan emin olun.
- Çapraz kontaminasyonu önleyin. Numuneler ve dağıtım reaktifleri arasında yeni pipet uçları kullanın. Filtrelenmiş uçların kullanımı, amplikon taşıma ve numuneden numuneye çapraz kontaminasyon riskini azaltır.
 - Numuneleri veya reaktif ana karışımlarını eklerken veya aktarırken, her numune arasında uçları değiştirin.
 - Çok kanallı pipetle dizin adaptörleri eklerken her satır veya her sütun arasında uçları değiştirin. Tek kanallı pipet kullanılıyorsa her numune arasında uçları değiştirin.
 - Kullanılmamış dizin adaptör plakalarını çalışma alanından çıkarın.
- Etanol yıkama adımları için aşağıdaki iyi uygulamalara başvurun:
 - Her zaman taze %80 etanol hazırlayın. Etanol havadan su emebilir ve bu da sonuçları etkileyebilir.
 - Yıkama adımları sırasında kuyucukların dibindeki tüm etanolün atıldığından emin olun. Etanol kalıntısı sonuçları etkileyebilir.
 - Tam buharlaşma sağlamak için manyetik stant adımları için belirtilen kurutma süresine uyun. Etanol kalıntısı, sonraki reaksiyonların performansını etkileyebilir.
- Ana karışımları her zaman kullanımdan önce hazırlayın ve asla kombine çalışma solüsyonlarını saklamayın.
- Kullanım talimatlarında belirtilen prosedürlere uyulmadığında Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti'nin performansı garanti edilmez.

- Kit bileşenlerini kit kutusu etiketinde belirtilen son kullanma tarihlerinden sonra kullanmayın.
- Farklı Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kitlerindeki kit bileşenlerini birbiriyle değiştirmeyin. Kitler, kit etiketinde tanımlanır.

Prosedür Notları

DNA Girdi Önerileri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti protokolü, 50–1000 ng'lik yüksek kaliteli, çift sarmallı genomik DNA (gDNA) girdileriyle uyumludur.

İlk gDNA örneğinin > 1 mM EDTA içermediğinden ve fenol ve etanol gibi organik kontaminantlar ihtiva etmediğinden emin olun. Bu maddeler tagmentasyon reaksiyonuna müdahale edebilir ve test başarısızlığına neden olabilir.

gDNA Girdisi ≥ 50 ng

50–1000 ng arasındaki gDNA girdileri için başlangıç gDNA numunesinin miktar tayini ve normalleştirilmesi gerekli değildir.

gDNA Girdisi < 50 ng

10–50ng'lik DNA girdileri aşağıdaki ayarlamalarla kullanılabilir:

- 10–49 ng gDNA girdisi kullanılıyorsa tagmentasyondan sonra gerekli PCR döngülerinin miktarını tayin etmek için başlangıç gDNA numunesinin miktarının ölçülmesi önerilir. Çift sarmallı gDNA girdisinin miktarını tayin etmek için florometrik tabanlı bir yöntem kullanın. NanoDrop veya diğer UV absorbans yöntemleri gibi total nükleik asidi ölçen yöntemlerden kaçının.
- Bu protokol, 10–49 ng gDNA'dan elde edilen önceden zenginleştirilmiş nihai kütüphane verimlerini normalleştirmez ve bu nedenle, zenginleştirme öncesinde ve sonrasında kütüphanelerin miktar tayini ve normalleştirilmesi gerekir.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, karakterize edilmiş ve 50–1000 ng DNA girdileri için doğrulanmıştır. < 50 ng gDNA girdileri için eşdeğer ürün performansı garanti edilemez.

Kan Girdi Önerileri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, periferik tam kandan ekstrakte edilen gDNA ile uyumludur. Valide edilmiş herhangi bir ekstraksiyon yöntemi kullanılabilir. Tam kandan gDNA ekstrakte edilirken, girdi DNA'sının başlangıçta miktar tayini gerekli değildir ve Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, normalleştirilmiş önceden zenginleştirilmiş kütüphane verimleri üretir.

Aşağıdaki faktörler tam kan numunelerinden elde edilen DNA miktarını ve dolayısıyla kütüphanenin normalleşmesini olumsuz etkileyebilir:

- Kan numunesinin yaşı
- Saklama koşulları
- Akyuvar sayımlarını etkileyen altta yatan tıbbi durumlar

FFPE Doku Numunesi Girdi Önerileri

Başarılı kütüphane hazırlığı için uygun girdiyi belirlemek üzere aşağıdaki FFPE DNA kalite kriterlerini kullanın:

- ΔCq değeri ≤ 5 olan FFPE numuneleri için önerilen DNA girdisi 50–1000 ng'dır.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, $\Delta Cq > 5$ olan düşük kaliteli FFPE numuneleri için önerilmez. $\Delta Cq > 5$ olan numunelerin kullanılması mümkündür, ancak kütüphane hazırlığının başarısız olma olasılığını artırabilir veya test performansını azaltabilir.

FFPE Ekstraksiyonu

Yüksek geri kazanım verimleri üreten, numune tüketimini en aza indiren ve numune bütünlüğünü koruyan bir nükleik asit izolasyon yöntemi kullanın. FFPE numunelerinden DNA ekstraksiyonu için valide edilmiş herhangi bir yöntemi kullanabilirsiniz. FFPE dokusundan ekstrakte edilen gDNA için girdi DNA'sının ilk kantifikasyonu gereklidir ve Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, normalleştirilmiş önceden zenginleştirilmiş kütüphane verimleri üretmez.

FFPE DNA Kalifikasyonu

FFPE dokusundan ekstrakte edilen gDNA, kullanımdan önce kalifiye edilecektir. Optimum performans için FFPE numunelerinden ekstrakte edilen DNA'nın kalifikasyonu için valide edilmiş bir ekstraksiyon yöntemi kullanarak DNA örneği kalitesini değerlendirin. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti protokolü, ΔCq değeri ≤ 5 olan FFPE DNA numuneleriyle uyumludur. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, $\Delta Cq > 5$ olan düşük kaliteli FFPE numuneleri için önerilmez. $\Delta Cq > 5$ olan numunelerin kullanılması mümkündür, ancak kütüphane hazırlığının başarısız olma olasılığını artırabilir veya test performansını azaltabilir.

[İsteğe bağlı] FFPE Referans Numuneleri

Protokolü gerçekleştirirken pozitif kontrol olarak Horizon HD799 (DNA) gibi karakterize edilmiş referans materyalleri kullanın. Hücre hattından türetilen ksenogreftlerden elde edilen kalifiye edilmiş FFPE materyalleri de referans numuneleri olarak kullanılabilir. Kullanımdan önce referans materyallerin miktarını tayin etmek için florometrik tabanlı bir yöntem kullanın.

NOT Bir pozitif kontrol referans numunesinin veya şablonsuz kontrolün çalıştırılması reaktifleri tüketir ve işlenebilir bilinmeyen numunelerin toplam sayısını azaltır.

Numune Girdi Önerileri

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti için numune girdi önerileri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 1 Numune Girdi Önerileri

Numune Girdi Türü	Numune Girdi Miktarı	Girdi DNA'sının Kantifikasyonu Gerekli	Gerekli DNA Girdi Kalitesi	Normalleştirilmiş Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphane Verimi
gDNA	10–49 ng	Evet	260/280 oranı 1,8–2,0	Hayır
gDNA	50–1000 ng	Hayır	260/280 oranı 1,8–2,0	Evet
kandan gDNA	50–1000 ng	Hayır	260/280 oranı 1,8–2,0	Evet
FFPE'den gDNA	50–1000 ng	Evet	ΔCq değeri ≤ 5	Hayır

eBLTS PCR programı için önerilen PCR döngüleri, numune girdi konsantrasyonuna ve kalitesine göre ayarlanır. Daha fazla bilgi için bkz. [Tagmentasyon Uygulanmış DNA'yı Çoğaltma, sayfa 28](#).

İpuçları ve Teknikler

Çapraz Kontaminasyonun Önlenmesi

- Numuneleri eklerken veya aktarırken, *her numune* arasında uçları değiştirin.
- Çok kanallı pipetle dizin adaptörleri eklerken *her satır* veya *her sütun* arasında uçları değiştirin. Tek kanallı pipet kullanılıyorsa her numune arasında uçları değiştirin.

Plakanın Sızdırmazlığının Sağlanması

- Protokolde yer alan aşağıdaki adımlardan önce plakayı kapatmak için kauçuk bir rulo kullanarak 96 kuyucuklu plakayı her zaman yeni bir yapışkan contayla kapatın:
 - Çalkalama adımları
 - İnkübasyon adımları. Plakanın düzgün şekilde kapatılmaması inkübasyon sırasında buharlaşmaya neden olabilir.
 - Santrifüj adımları
 - Hibritleştirme adımları
- Çapraz kontaminasyon ve buharlaşma riskini azaltmak için kenarların ve kuyucukların tamamen kapatılmış olduğundan emin olun.
 - Plaka kuyucuklarının contasında veya yanlarında herhangi bir sıvı veya yoğuşma gözlenirse, contayı çıkarmadan önce gerektiği şekilde santrifüjleme yapın.
- Kapağı yavaşça çıkarmadan önce plakayı düz bir yüzeye yerleştirin.

Enrichment BLT Small'ı (eBLTS) İşleme

- Boncukların her zaman tampona batmış durumda olması için eBLTS stok tüpünü dik olarak buzdolabında saklayın.
- Kullanımdan hemen önce, boncuklar tekrar süspanse olana kadar eBLTS stok tüpünü iyice vorteksleyin. Boncukların yeniden dibe çökmesini önlemek için pipetlemeden önce santrifüj yapılması önerilmez.
- Boncuklar 96 kuyucuklu bir plakanın kenarına veya üstüne yapışır 3 saniye boyunca 280 x g'de santrifüjleyin ve ardından yeniden süspanse etmek için pipetleyin.
- eBLTS'i yıkarken:
 - Plakaya uygun manyetik stant kullanın.
 - Talimatlarda çıkarılması belirtilene kadar plakayı manyetik stant üzerinde tutun.
 - Boncuklar pipet uçlarına aspire edilirse, manyetik stanttaki plakaya geri dağıtın ve sıvı berraklaşana kadar bekleyin (2 dakika).

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti İş Akışı

Aşağıdaki şema Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti iş akışını göstermektedir. Güvenli durdurma noktaları adımlar arasında işaretlenmiştir. Zaman tahminleri, 12'li zenginleştirmede 12 numunenin işlenmesine dayalıdır.



Kullanım Talimatı

Bu bölümde Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti protokolü açıklanmaktadır.

- Ürünlerin ve deney parametrelerinin uyumluluğunu sağlamak için numuneden analize kadar planlanan tam sekanslama iş akışını gözden geçirin.
- Devam etmeden önce kit içeriğini teyit edin ve gerekli bileşenlere, ekipmana ve malzemelere sahip olduğunuzdan emin olun.
 - Üçüncü taraf biyotinenmiş prob lar belirli gereklilikleri karşılamalıdır. Üçüncü taraf problemlerinizin gereklilikleri karşıladığından emin olmak için [Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri, sayfa 10](#) bölümüne bakın.
- Belirtilen hacimleri ve inkübasyon parametrelerini kullanarak protokolü gösterilen sırayla izleyin.
- Protokolde güvenli durma noktası belirtilmedikçe, derhal bir sonraki adıma devam edin.
- Ana karışım oluşturulurken fazlalık, sağlanan hacimlere dahil edilir.
- Plaka tipiniz için uygun manyetik standı kullandığınızdan emin olun.

Havuzlamanın Hazırlanması

Bu adım, zenginleştirilmiş kütüphanelerin başarılı bir şekilde sekanslanmasını sağlamak için gereklidir. Kütüphanelerin havuzlanması, zenginleştirmeden önce ve sekanslamadan önce gerçekleştirilebilir.

Zenginleştirme öncesinde–Ayrı ayrı dizinlenmiş çoğaltılmış kütüphaneler, seçilen prob paneliyle zenginleştirme için havuzlanır. Bu, zenginleştirilmiş kütüphanelerden oluşan çok katmanlı bir havuz oluşturur. FFPE numune girdisi için işleme test edilmiştir ve yalnızca 1’li zenginleştirme reaksiyonları için önerilir. Yüksek kaliteli gDNA için 12’li test edilmiştir, ancak 2’li ila 11’li mümkündür.

Sekanslamadan önce–1’li zenginleştirilmiş kütüphaneler ve/veya çoklu zenginleştirilmiş kütüphaneler, sekanslamadan önce havuzlanır. Sekanslanabilecek zenginleştirilmiş kütüphanelerin sayısı, sekanslama sisteminizdeki her bir numune için hedef okuma derinliğine bağlıdır.

Benzersiz Çift Dizinleme

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti, benzersiz çift dizinler kullanır.

- Çift dizinli kütüphaneler, benzersiz şekilde etiketlenmiş kütüphaneler oluşturmak için Dizin 1 (i7) ve Dizin 2 (i5) sekansları ekler.
- UD dizinleri, i7 ve i5 Dizin Okuması için farklı, ilgisiz dizin sekanslarına sahiptir. Dizinler 10 baz uzunluğundadır.

Havuzlanmış kütüphaneler için farklı sekanslara sahip dizin adaptörleri seçmek, başarılı sekanslama ve veri analizi için renk dengesini optimize eder. ≥ 10 ’lu çokluk havuzları kendiliğinden renk dengelidir, böylece herhangi bir dizin adaptörü kombinasyonunu kullanabilirsiniz. Sekanslama çalışmanız sırasında DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Modülü, renk dengeli dizin kombinasyonları için seçenekler sağlar ve seçilen dizin kombinasyonlarında yeterli çeşitlilik yoksa sizi bilgilendirir.

Illumina UD dizin adaptör sekansları ve plaka yerleşimleri hakkında bilgi için bkz. [Ek: Illumina UD Dizinleri Adaptör Sekansları, sayfa 62](#)

Desteklenen Zenginleştirme Çoklukları

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti reaktifler, 1'li ve 12'li zenginleştirme çokluğu şeklinde yapılandırılır ve test edilir. Diğer zenginleştirme çoklukları mümkün olsa da, bazı çokluklar ilave zenginleştirme öncesi kütüphane hazırlığı ve zenginleştirme prob paneli reaktifleri gerektirir.

Standart olmayan zenginleştirme çokluğu için uygun zenginleştirme verimi elde etmek ek optimizasyon gerektirebilir. Optimum sonuçlar garanti edilmez.

- **Zenginleştirme çokluğu**–Zenginleştirme probu panelleriyle hibridizasyon için bir zenginleştirme reaksiyonunda havuzlanan önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin (1–12) sayısı. Örneğin, önceden zenginleştirilmiş 12 kütüphaneyi bir araya getirmek 12'li zenginleştirme havuzu oluşturur.
- **Zenginleştirme reaksiyonu**–Reaksiyon başına havuzlanmış önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin sayısından bağımsız olarak benzersiz zenginleştirme reaksiyonu preparatlarının sayısı. Örneğin tek bir zenginleştirme reaksiyonu, 1'li ya da 12'li zenginleştirme havuzu hazırlayabilir.

Zenginleştirme sonrası kütüphanelerin toplam sayısını hesaplamak için reaksiyon başına zenginleştirme çokluğunu zenginleştirme reaksiyonlarının sayısı ile çarpın. Örneğin, 12'li bir zenginleştirme havuzunun tek bir zenginleştirme reaksiyonu, zenginleştirme sonrası 12 kütüphaneden oluşan bir havuz üretir.

Önceden zenginleştirilmiş kütüphaneleri havuzlarken Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti reaktifleri, aşağıdaki zenginleştirme reaksiyonlarını ve çokluğu destekler.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti Reaktifleri	Zenginleştirme Reaksiyonları	Zenginleştirme Çokluğu
16 numune kiti	16 reaksiyon	1'li
96 numune kiti	8 reaksiyon	12'li

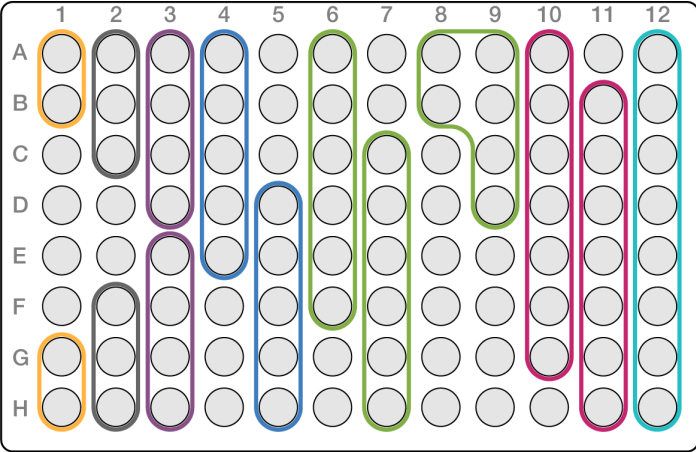
İkili ila Sekizli Çoklu Havuzlama Stratejileri

Aşağıdaki tabloda, 2–8'li bir havuzda birleştirilebilen dizin adaptörleri (kuyucuklar) gösterilmektedir, renk kodlu şekil ise her kombinasyonu göstermektedir.

Kolonun üstünden veya altından herhangi bir çokluğu ≥ 2 olarak havuzlayın. Bir sıra boyunca havuzlamayın.

Çokluk	Kombinasyonlar	Şekildeki Renk
2	Bir sütundaki ilk iki veya son iki kuyucuk: - A ve B - G ve H C–F satırları kullanılmaz.	Turuncu
3	Bir sütundaki ilk üç veya son üç kuyucuk: - A–C - F–H D ve E satırları kullanılmaz.	Gri

Çokluk	Kombinasyonlar	Şekildeki Renk
4	Bir sütundaki ilk dört veya son dört kuyucuk: - A–D - E–H	Mor
5	Bir sütundaki ilk beş veya son beş kuyucuk: - A–E - D–H	Mavi
6	[Opsiyon 1] Bir sütundaki ilk altı veya son altı kuyucuk: - A–F - C–H [Opsiyon 2] Bir sütundaki ilk iki kuyucuk (A ve B) veya son iki kuyucuk (G ve H) ve bitişik sütundaki herhangi dört kuyucuk.	Yeşil
7	Bir sütundaki ilk yedi veya son yedi kuyucuk: - A–G - B–H	Pembe
8	Tüm sütun.	Camgöbeği

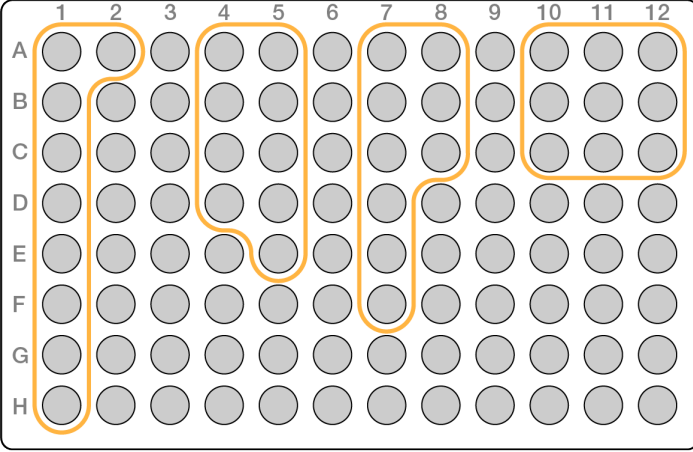


Dokuzlu Havuzlama Stratejileri

Bir sekanslama çalıştırmasında renk dengesini optimize eden herhangi bir kuyucuktan dizin adaptörleri kullanın, örneğin:

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

Aşağıdaki şekilde dört örnek de gösterilmektedir.



Genomik DNA Tagmentasyonu

Bu adımda adaptör sekanslarıyla DNA'yı parçalayan ve etiketleyen bir proses olan DNA'nın tagmentasyonu için Enrichment BLT Small (eBLTS) kullanılır.

Sarf Malzemeleri

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (sarı kapak)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nükleaz içermeyen su
- 96 kuyucuklu PCR plakası
- Yapıştırıcı conta
- 1,7 ml mikrosantrifüj tüpleri
- 8 tüplü şerit
- Pipet uçları
 - 200 µl çok kanallı pipetler



UYARI

Bu reaktif seti potansiyel olarak tehlikeli kimyasallar içerir. Solunması, yutulması, ciltle ve gözle teması hâlinde kişisel yaralanmaya neden olabilir. Maruziyet riskine karşı göz koruması, eldivenler ve laboratuvar önlüğü dâhil olmak üzere koruyucu donanım giyin. Kullanılan reaktifleri kimyasal atık olarak ele alın ve geçerli bölgesel, ulusal ve yerel kanun ve düzenlemeler uyarınca atın. Ek çevre, sağlık ve güvenlik bilgileri için, support.illumina.com/sds.html adresindeki Güvenlik Veri Sayfalarına (SDS) bakın.

Reaktifler Hakkında

- eBLTS, 2 °C ila 8 °C arasındaki sıcaklıklarda saklanmalıdır. 2 °C'nin altında saklanan eBLTS'leri kullanmayın.

- eBLTS'leri santrifülemeyin.

Hazırlık

- Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Öge	Depolama	Talimatlar
eBLTS (sarı kapak)	2 °C ila 8 °C	Oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için kullanmadan hemen önce vorteksleyin. Pipetlemeden önce santrifülemeyin.
TB1	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için vorteksleyin.

- DNA'yı vorteksleyin veya pipetleyin ve ardından kısa süre santrifüleyin.
- Termal döngüleyiciye aşağıdaki TAG programını kaydedin:
 - Önceden ısıtılmış kapak seçeneğini seçin ve 100 °C'ye ayarlayın.
 - Reaksiyon hacmini 50 µl olarak ayarlayın.
 - 5 dakika boyunca 55 °C
 - 10 °C'de tutun.

Prosedür

- Toplam girdi miktarı 50–1000 ng olacak şekilde 96 kuyucuklu PCR plakasının her bir kuyucuğuna 2–30 µl DNA ekleyin.
DNA hacmi < 30 µl ise toplam hacmi 30 µl'ye getirmek için DNA numunelerine nükleaz içermeyen su ekleyin.
- Boncuklar tamamen yeniden süspanse olana kadar eBLTS'yi iyice vorteksleyin.
- Tagmentasyon Ana Karışımını hazırlamak için aşağıdaki hacimleri bir tüpte birleştirin. Her bir hacmi işlenen numune sayısı ile çarpın.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Reaktif fazlalığı hacimlere dahil edilir.
- Karıştırmak için Tagmentasyon Ana Karışımını iyice pipetleyin.
- Tagmentasyon Ana Karışımı hacmini eşit olarak 8 tüplük bir şeride bölün.
- 200 µl çok kanallı pipet kullanarak 20 µl Tagmentasyon Ana Karışımını numune içeren PCR plakasının her bir kuyucuğuna aktarın. Her numune sütunu veya satırı için yeni uçlar kullanın.
- Tagmentasyon Ana Karışımı dağıtıldıktan sonra 8 tüplük şeridi atın.
- 40 µl'ye ayarlanmış 200 µl çok kanallı pipet kullanarak karıştırmak için her bir numuneyi 10 kez pipetleyin. Her numune sütunu için yeni uçlar kullanın.
Alternatif olarak, PCR plakasını kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika boyunca plaka çalkalayıcı kullanın.

- Plakayı kapatın ve önceden programlanmış termal döngüleyiciye yerleştirin ve TAG programını çalıştırın.
- TAG programı 10 °C tutma sıcaklığına ulaşana kadar bekleyin ve ardından plakayı hemen çıkarın.
- 96 kuyucuklu PCR plakasını 2 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletin ve ardından bir sonraki adıma geçin.

Tagmentasyon Sonrası Temizleme

Bu adım PCR amplifikasyonundan önce eBLTS üzerindeki adaptör etiketli DNA'yı yıkar.

Sarf Malzemeleri

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96 kuyucuklu PCR plakası manyetik standı
- Yapıştırıcı conta
- 8 tüplü şerit
- Pipet uçları
 - 20 µl çok kanallı pipetler
 - 200 µl çok kanallı pipetler
- Daha sonraki prosedür için hazırlanın:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Dizin adaptörü plakası

Reaktifler Hakkında

- Plakanız için uygun manyetik standı kullandığınızdan emin olun. PCR plakası için MIDI plaka manyetik standı kullanmak TWB2'nin boncuklara yapışmasını önleyebilir.
- Yanlış hacim aspirasyonu ve eksik karıştırmayı önlemek üzere köpürmeyi en aza indirmek için TWB2'yi yavaşça pipetleyin.

Hazırlık

- Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Öge	Depolama	Talimatlar
EPM	-25 °C ila -15 °C	Buz üzerinde 1 saat çözündürün. Karıştırmak için ters çevirin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
ST2	15 °C ila 30 °C	Çökelti gözlenirse, 37 °C'de 10 dakika ısıtın ve ardından çökeltiye çözünene kadar vorteksleyin. Oda sıcaklığında kullanın.
TWB2	15 °C ila 30 °C	Oda sıcaklığında kullanın.

Öge	Depolama	Talimatlar
Dizin adaptörü plakası	-25 °C ila -15 °C	30 dakika oda sıcaklığında çözündürün.

Prosedür

- Her tagmentasyon reaksiyonuna 10 µl ST2 ekleyin. Çok kanallı bir pipet kullanıyorsanız, ST2'yi 8 tüplük bir şeride pipetleyin ve ardından uygun hacimleri PCR plakasına aktarın. Her numune sütunu veya satırı için yeni uçlar kullanın.
- 50 µl'ye ayarlanmış 200 µl pipet kullanarak, boncukları tekrar süspanse etmek için her bir kuyucuğu 10 kez yavaşça pipetleyin.
Alternatif olarak plakayı kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika çalkalayın. Gerektiğinde işlemi tekrarlayın.
- Plakayı kapatın ve ardından 10 saniye boyunca 280 × g'de santrifüjleyin.
- 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
- PCR plakası manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar (3 dakika) bekleyin.
- [≤ 48 numune] Üç kez aşağıdaki gibi yıkayın.
 - 60 µl'ye ayarlanmış 200 µl çok kanallı pipet kullanarak boncuk peletini bozmadan süpernatantı çıkarın ve atın.
 - Manyetik stanttan çıkarın.
 - Hemen sonrasında yavaşça 100 µl TWB2'yi doğrudan boncuklara ekleyin.
 - Boncuklar tamamen yeniden süspanse olana kadar yavaşça pipetleyin. Alternatif olarak plakayı kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika çalkalayın.
 - Sıçrama olursa 10 saniye boyunca 280 × g'de santrifüjleyin.
 - PCR plakası manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar (3 dakika) bekleyin.
Üçüncü yıkamayı yaparken aşırı kurumayı önlemek için plakayı manyetik standın üzerinde ve TWB2'yi kuyucuklarda bırakın. PCR Master Mix'i hazırladıktan sonra süpernatantı alın ve atın.
 - 100 µl'ye ayarlanmış 200 µl çok kanallı pipet kullanarak süpernatantı alın ve atın.
 - Toplam üç yıkama için b–g arasındaki adımları iki kez tekrarlayın.
- [> 48 numune] Üç kez aşağıdaki gibi yıkayın.
 - Aşırı kurumayı önlemek için tüm sütunlar işlenene kadar 1. sütundan 2. sütuna kadar b ve c adımlarını artışlarla gerçekleştirin.
 - 60 µl'ye ayarlanmış 200 µl çok kanallı pipet kullanarak süpernatantı alın ve atın.
 - Manyetik stanttan çıkarın.
 - Hemen ardından yavaşça 100 µl TWB2'yi doğrudan boncuklara dağıtın.
 - Boncuklar tamamen yeniden süspanse olana kadar yavaşça pipetleyin. Alternatif olarak plakayı kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika çalkalayın.
 - Sıçrama olursa 10 saniye boyunca 280 × g'de santrifüjleyin.

- g. PCR plakası manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar (3 dakika) bekleyin. Üçüncü yıkamayı yaparken aşırı kurumayı önlemek için plakayı manyetik standın üzerinde ve TWB2'yi kuyucuklarda bırakın. PCR Master Mix'i hazırladıktan sonra süpernatantı alın ve atın.
 - h. 100 µl'ye ayarlanmış 200 µl çok kanallı pipet kullanarak süpernatantı alın ve atın.
 - i. Manyetik standtan çıkarın ve yavaşça doğrudan boncuklara 100 µl TWB2 ekleyin.
 - j. Tüm sütunlar işlenene kadar adım h ve i'yi 1. veya 2. sütunda artışlarla tekrarlayın.
 - k. Toplam üç yıkama için e-h arasındaki adımları iki kez tekrarlayın.
8. *Tagmentasyon Uygulanmış DNA'yı Çoğaltma* bölümündeki *Prosedür* kısmının 4. adımına kadar manyetik standta tutun.
- Boncukların aşırı kurumasını önlemek için TWB2 kuyucuklarda kalır.

Tagmentasyon Uygulanmış DNA'yı Çoğaltma

Bu adım sınırlı döngülü bir PCR programı kullanarak tagmentasyon uygulanmış DNA'yı çoğaltır. PCR adımı, sekanslama küme oluşturma için gerekli Dizin 1 (i7) adaptörleri, Dizin 2 (i5) adaptörleri ve sekansları ekler.

Sarf Malzemeleri

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Dizin adaptörü plakası
- 96 kuyucuklu PCR plakası
- Nükleaz içermeyen su
- Yapıştırıcı conta
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri
- Pipet uçları
 - 20 µl çok kanallı pipetler
 - 200 µl çok kanallı pipetler

Reaktifler Hakkında

- Dizin adaptör plakaları
 - Bir kuyucuk > 10 µl dizin adaptörleri içerebilir.
 - Dizin adaptör plakasına numune eklemeyin.
 - Dizin plakasının her bir kuyucuğu sadece tek kullanımlıktır.

Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Öge	Depolama	Talimatlar
EPM	-25 °C ila -15 °C	4 °C'de veya buz üzerinde 1 saat çözündürün. Karıştırmak için ters çevirin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
Dizin adaptörü plakası	-25 °C ila -15 °C	30 dakika oda sıcaklığında çözündürün.

2. Aşağıdaki eBLTS PCR programını, aşağıdaki tabloda belirtilen uygun sayıda PCR döngüsünü kullanarak bir termal döngüleyiciye kaydedin.

- Önceden ısıtılmış kapak seçeneğini seçin ve 100 °C'ye ayarlayın.
- Reaksiyon hacmini 50 µl olarak ayarlayın.
- 3 dakika boyunca 72 °C
- 3 dakika boyunca 98 °C
- X döngü:
 - 20 saniye boyunca 98 °C
 - 30 saniye boyunca 60 °C
 - 1 dakika boyunca 72 °C
- 3 dakika boyunca 72 °C
- 10 °C'de tutun.

Toplam çalıştırma süresi 9 döngü için ~38 dakika ve 12 döngü için ~46 dakikadır.

Numune Girdi Türü	PCR Döngüsü Sayısı (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1000 ng gDNA	9
FFPE'den ekstrakte edilen 50–1000 ng gDNA	12
Kandan ekstrakte edilen gDNA	9

Prosedür

1. PCR Master Mix'i hazırlamak için aşağıdakileri birleştirin. Her bir hacmi işlenen numune sayısı ile çarpın.
 - EPM (23 µl)
 - Nükleaz içermeyen su (23 µl)
 Reaktif fazlalığı hacimlere dahil edilir.
2. Karıştırmak için PCR Master Mix'i 10 kez pipetleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
3. Plaka manyetik stant üzerindeyken çıkarmak ve TWB2'i atmak için 200 µl çok kanallı pipet kullanın. Kuyucuk duvarlarında kalan köpük kütüphaneyi olumsuz etkilemez.
4. Manyetik stanttan çıkarın.
5. Derhal her kuyucuktaki boncuklara doğrudan 40 µl PCR Master Mix ekleyin.

6. Boncuklar tamamen yeniden süspansiyon edilene kadar hemen pipetle karıştırın. Alternatif olarak plakayı kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika çalkalayın.
7. Numune plakasını kapatın ve 10 saniye süreyle 280 x g'de santrifüjleyin.
8. Dizin adaptör plakasını 1000 x g'de 1 dakika santrifüjleyin.
9. Dizin adaptör plakasını hazırlayın.
 - [< 96 numune] Dizin adaptör plakasındaki folyo mührünü, her kuyucuk için yeni bir pipet ucuyla yalnızca işlenen numune sayısı kadar delin.
 - [96 numune] Yeni bir yarı etekli PCR plakasını dizin adaptör plakasının üzerine hizalayın ve folyo mührü delmek için aşağı bastırın. Folyo mührü delmek için kullanılan PCR plakasını atın.
10. Yeni bir pipet ucu kullanarak her kuyucuğa 10 µl önceden eşleştirilmiş dizin adaptörleri ekleyin.
11. 40 µl'ye ayarlanmış bir pipet kullanarak karıştırmak için 10 kez pipetleyin. Alternatif olarak plakayı kapatın ve 1600 rpm'de 1 dakika çalkalayın.
12. Plakayı kapatın ve ardından 10 saniye boyunca 280 x g'de santrifüjleyin.
13. Termal döngüleyiciye yerleştirin ve eBLTS PCR programını çalıştırın.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Duracaksanız -25 °C ila -15 °C'de 30 güne kadar saklayın.

Kütüphaneleri Temizleme

Bu adımda, çoğaltılmış kütüphaneleri saflaştırmak için çift taraflı boncuk saflaştırma prosedürü kullanılır.

Sarf Malzemeleri

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Yeni hazırlanmış %80 etanol (EtOH)
- 96 kuyucuklu 0,8 ml Polipropilen Derin Kuyucuklu Saklama Plakası (MIDI plakası)
- 96 kuyucuklu PCR plakası
- MIDI plaka manyetik standı
- PCR plakası manyetik standı
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri
- Nükleaz içermeyen su

Reaktifler Hakkında

- Cleanup Beads
 - Her kullanımdan önce vorteksleyin.
 - Boncukların eşit şekilde dağıldığından emin olmak için sık sık vorteksleyin.

- Çözeltilerin viskozitesi nedeniyle yavaşça aspire edin ve dağıtın.

Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Öge	Depolama	Talimatlar
CB	Oda sıcaklığı	Vorteksleyin ve sıvının rengi homojen olana kadar karıştırmak için ters çevirin.
RSB	2 °C ila 8 °C	30 dakika oda sıcaklığında buzunu çözünüz. Karıştırmak için vorteksleyin.

Prosedür

1. 96 kuyucuklu PCR plakasını 1800 rpm'de 1 dakika çalkalayın ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
2. PCR plakası manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar (1 dakika) bekleyin.
3. CB'yi 10 saniye 3 kez vorteksleyin ve daha sonra yeniden süspanse etmek için birkaç kez ters çevirin.
4. Yüksek kaliteli gDNA için aşağıdaki işlemleri yapın.
 - a. Yeni bir MIDI plakasının her kuyucuğuna 77 µl nükleaz içermeyen su ekleyin.
 - b. MIDI plakasının her bir kuyucuğuna 88 µl CB ekleyin.
 - c. PCR plakasının her kuyucuğundan MIDI plakasının karşılık gelen kuyucuğuna 45 µl süpernatantı aktarın.
 - d. PCR plakasını atın.
 - e. Karıştırmak için her bir kuyucuğu 10 kez pipetleyin. Alternatif olarak plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 1 dakika çalkalayın.
 - f. Plakayı kapatın ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edin.
 - g. Hava kabarcığı olup olmadığını kontrol edin. Varsa aşağı yönde döndürün.
 - h. MIDI plakası manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar bekleyin (5 dakika).
 - i. İnkübasyon sırasında CB'yi iyice vorteksleyin ve ardından *yeni* bir MIDI plakasının her bir kuyucuğuna 20 µl ekleyin.
 - j. İlk MIDI plakasının her kuyucuğundan 200 µl süpernatantı yeni MIDI plakasının ilgili kuyucuğuna (20 µl içeren CB) aktarın.
 - k. İlk MIDI plakasını atın.
 - l. Yeni MIDI plakasının her kuyucuğunu 10 kez pipetleyerek karıştırın. Alternatif olarak plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 1 dakika çalkalayın.
5. Ekstrakte edilmiş FFPE için aşağıdaki işlemleri yapın.
 - a. Yeni MIDI plakasının her bir kuyucuğuna 81 µl CB ekleyin.
 - b. PCR plakasının her kuyucuğundan MIDI plakasının karşılık gelen kuyucuğuna 45 µl süpernatantı aktarın.
 - c. PCR plakasını atın.
 - d. Karıştırmak için her bir kuyucuğu 10 kez pipetleyin. Alternatif olarak plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 1 dakika çalkalayın.

6. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
7. Hava kabarcığı olup olmadığını kontrol edin. Varsa aşağı yönde döndürün.
8. MIDI plakası manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar bekleyin (5 dakika).
9. Boncukları bozmadan süpernatantı çıkarın ve atın.
10. Boncukları aşağıdaki gibi yıkayın.
 - a. Plaka manyetik stant üzerindeyken karıştırmadan 200 µl taze %80 EtOH ekleyin.
 - b. 30 saniye inkübe edin.
 - c. Boncukları bozmadan süpernatantı çıkarın ve atın.
11. Boncukları **ikinci** kez yıkayın.
12. Manyetik stant üzerinde 5 dakika havayla kurumaya bırakın.
13. Havayla kurumaya bırakılmışken 20 µl pipet kullanarak artık EtOH'u alın ve atın.
14. Manyetik stanttan çıkarın.
15. Boncuklara 17 µl RSB ekleyin.
16. Plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 2 dakika çalkalayın.
17. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin.
18. Hava kabarcığı olup olmadığını kontrol edin. Varsa aşağı yönde döndürün.
19. Plakayı, MIDI plakası manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar bekleyin (2 dakika).
20. 15 µl süpernatantı yeni bir 96 kuyucuklu PCR plakasına aktarın.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Duracaksanız -plakayı kapatın ve -25 °C ila 15 °C'de 30 güne kadar saklayın.

Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Havuzlama

Bu adım, DNA kütüphanelerini benzersiz dizinlerle 12 kütüphaneye kadar tek bir havuzda birleştirir.

Havuzlama Yöntemleri

Hacim veya kütleye göre havuzlama yapabilirsiniz. Girdiniz için uygun yöntemi belirlemek için aşağıdaki tabloyu kullanın.

Tablo 2 Önerilen Havuzlama Yöntemleri

Numune Girdisi	Havuzlama Yöntemi
10–49 ng gDNA	Kütle
50–1000 ng gDNA	Hacim
FFPE'den ekstrakte edilen gDNA	Kütle
Kandan ekstrakte edilen gDNA	Hacim

- Birli zenginleştirme, önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin havuzlanmasını gerektirmez. Ancak, RSB eklemek gerekebilir.
- Önceden zenginleştirilmiş kütüphane kantifikasyonundan sonra, optimum dizin dengesini elde etmek için tüm numune girdi türleri kütleye göre havuzlanabilir.
- Ayrı deneysel preparatlarda üretilen önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin nihai verimi değişebilir. Bu nedenle, optimum dizin dengesini elde etmek için kütleye göre havuzlama önerilir.
- Aşağıdaki durumlar için 1'li zenginleştirme kullanın.
 - 10–49 ng gDNA
 - FFPE'den ekstrakte edilen 50–1000 ng gDNA
 - Somatik varyant çağırma için düşük minör alel frekans tespiti.

Kütleye Göre Havuzlama

Aşağıdaki durumlar için sayfa 1'de [Eşit Konsantrasyonda Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Havuzlama](#), sayfa 34 kısmında belirtilen zenginleştirme için kütüphane başına bir DNA kütlesi kullanmak üzere kütüphanelerinizin miktarını tayin edin.

- 10–49 ng gDNA numune girdisi
- FFPE numune girdisinden ekstrakte edilen 50–1000 ng gDNA
- Somatik varyant çağırma için düşük minör alel frekans tespiti
- Optimum dizin dengesi için kandan ekstrakte edilen gDNA

Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphanelerin Kantifikasyonu

1. dsDNA interkalasyon boyasını kullanan tercih ettiğiniz floresan tabanlı kantifikasyon yönteminizi kullanarak önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin 1 µl'sini çalıştırın.
 - 50–1000 ng yüksek kaliteli gDNA için, ≥ 500 ng önceden zenginleştirilmiş kütüphane verimi bekleyin.
 - FFPE'den ekstrakte edilen 50–1000 ng gDNA için ilk numunenin kalitesine bağlı olarak 500–6000 ng önceden zenginleştirilmiş kütüphane verimi bekleyebilirsiniz.

NOT Farklı yanlılıkları olan kantifikasyon yöntemleri için bu iş akışına yönelik kantifikasyon yöntemi kalifiye edin. Konsantrasyon sonuçları, kullanılan yönteme bağlı olarak farklılık gösterebilir.

Eşit Konsantrasyonda Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Havuzlama

Numune türüne ve zenginleştirme çokluğuna göre zenginleştirme için gereken kütüphane başına DNA kütlesini belirlemek için aşağıdaki tabloyu kullanın. Önerilenden daha düşük önceden zenginleştirilmiş kütüphane verimleri kullanıldığında optimum zenginleştirme verimleri ve test performansı garanti edilmez.

Zenginleştirme reaksiyonundaki toplam DNA kütlesi 6000 ng'yi aşmamalıdır.

Numune Girdisi	Zenginleştirme Çokluğu	Kütüphane Başına DNA Kütlesi (ng)	Toplam DNA Kütüphanesi Kütlesi (ng)
Yüksek kaliteli gDNA	12	250–500	3000–6000
FFPE'den ekstrakte edilen gDNA	1	200	200

1. Bu adımda havuzlamayı planladığınız kütüphaneler için dizinleri kaydedin.
2. Her kütüphanenin konsantrasyonuna dayanarak gerekli DNA kütlesini elde etmek için zenginleştirme reaksiyonuna eklenmesi gereken hacmi hesaplayın.
 - Yüksek kaliteli gDNA: 250–500 ng girdi için gereken kütüphane hacmini hesaplayın.
 - FFPE'den ekstrakte edilen gDNA: 200 ng girdi için gereken kütüphane hacmini hesaplayın.
3. Her kütüphane için hesaplanan hacmi PCR plakasının aynı kuyucuğuna ekleyin.
4. Yüksek kaliteli gDNA kullanıyorsanız, havuzlanmış önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin toplam hacmine dayanarak aşağıdakilerden birini gerçekleştirin:
 - Önceden zenginleştirilmiş kütüphane hacmi = 30 µl ise [Probları Hibridize Etme, sayfa 36](#) bölümüne geçin.
 - Önceden zenginleştirilmiş kütüphane hacmi < 30 µl ise 30 µl toplam hacme ulaşmak için RSB ekleyin.
 - Önceden zenginleştirilmiş kütüphane hacmi > 30 µl ise havuzlanan numuneyi konsantre etmek için boncuk tabanlı bir yöntem veya vakum konsantratörü kullanın. 30 µl toplam hacme ulaşmak için konsantre havuzlanmış örneğe RSB ekleyin.
5. FFPE'den ekstrakte edilen gDNA kullanılıyorsa havuzlanmış önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin toplam hacmine dayalı olarak aşağıdakilerden birini gerçekleştirin.

- Önceden zenginleştirilmiş kütüphane hacmi = 7,5 µl ise sayfa 1'deki [Probları Hibridize Etme, sayfa 36](#)
- Önceden zenginleştirilmiş kütüphane hacmi < 7,5 µl ise, 7,5 µl toplam hacme ulaşmak için RSB ekleyin.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Duracaksanız plakayı kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de 30 güne kadar saklayın.

Hacme Göre Havuzlama

Girdi 50–1000 ng gDNA olduğunda, aynı deneyde oluşturulan ayrı ayrı kütüphanelerin miktarının tayini ve normalleştirilmesi gerekli değildir.

Optimum performans elde etmek için yalnızca aynı kullanıcı, reaktif lotu ve dizin adaptör plakası tarafından hazırlanan önceden zenginleştirilmiş kütüphane numunelerini havuzlayın.

1. Bu adımda havuzlamayı planladığınız kütüphaneler için dizinleri kaydedin.
2. Zenginleştirme çokluğunuz için aşağıdaki önceden zenginleştirilmiş kütüphane ve RSB hacimlerini yeni bir PCR plakasının aynı kuyucuğunda birleştirin.
Elde edilen hacim 30 µl'dir.

Zenginleştirme Çokluğu *	Her Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphane Hacmi (µl)	RSB Hacmi (µl)
1'li	14	16
2'li	14	2
3'lü	10	0
4'lü	7,5	0
5'li	6	0
6'lı	5	0
7'li	4,2	0,6
8'li	3,7	0,4
9'lu	3,3	0,3
10'li	3	0
11'li	2,7	0,3
12'li	2,5	0

*Standart olmayan çokluklar (2'li ile 11'li) hakkında bilgi için bkz. [Prosedür Kısıtlamaları, sayfa 2](#).

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Duracaksanız plakayı kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de 30 güne kadar saklayın.

[İsteğe bağlı] Önceden Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Kalifiye Etme

Hacime göre havuzlanıyorsa, önceden zenginleştirilmiş kütüphanelerin miktarını tayin etmek için dsDNA interkalasyon boyası kullanan florometrik tabanlı bir yöntem kullanın. Önceden zenginleştirilmiş kütüphaneleri kalifiye etmek için uygun parça analiz kitiyle birlikte bir DNA parça analizörü kullanın.

Kütüphane kalifikasyonu için toplamda 1 µl kullanın. Önceden zenginleştirilmiş kütüphaneler, miktar tayini veya parça analizi için küçük seyreltilere izin verecek kadar konsantre edilir.

Probları Hibridize Etme

Bu adım DNA'nın hedeflenen bölgelerini kayıt problemlarına bağlar.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti reaktifleri, hem Illumina hem de üçüncü taraf zenginleştirme DNA oligonükleotid panelleriyle uyumludur. Üçüncü taraf panellerine ait gerekli teknik özellikler hakkında bilgi için bkz. [Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri, sayfa 10](#).

Sarf Malzemeleri

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (mavi kapak)
- Zenginleştirme probu paneli
- 96 kuyucuklu PCR plakası
- Yapıştırıcı conta
- Daha sonraki prosedür için hazırlanın:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (amber kapaklı)

Reaktifler Hakkında

- NHB2 saklama sırasında çökelir ve ayrılır.
- Zenginleştirme prob paneli, Illumina satıcısından seçilen zenginleştirme oligonükleotid panelini ifade eder.

Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Öge	Depolama	Talimatlar
EHB2	2 °C ila 8 °C	Oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için vorteksleyin. Kristaller ve bulanıklık gözlenirse tekrar vorteksleyin veya çözelti berraklaşana kadar karıştırmak için yukarı ve aşağı pipetleyin.
Zenginleştirme Probu Paneli	-25 °C ila -15 °C (Illumina)	Hem Illumina hem de üçüncü taraf paneller için oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için vorteksleyin.
NHB2 (mavi kapak)	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözdüren. Oda sıcaklığında, kullandığınız proba aynı sıcaklıkta 5 dakika süresince mikronumune inkübatöründe ön ısıtma yapın. Yeniden süspanse etmek için 10 saniye boyunca maksimum hızda 3 kez vorteksleyin. Kısa süre santrifüjleyin. Tüpün altından yukarı ve aşağı pipetleyin. Kristaller ve bulanıklık gözlenirse tekrar vorteksleyin veya çözelti berraklaşana kadar karıştırmak için yukarı ve aşağı pipetleyin. Yeniden çökelti oluşmasını önlemek için sıcakken kullanın.
SMB3*	2 °C ila 8 °C	HYB programındaki 90 dakikalık bekletmeden hemen sonra bir sonraki prosedüre geçiyorsanız HYB programına başlamadan en az 2 saat önce oda sıcaklığına getirin.
EEW* (amber tüp)	-25 °C ila -15 °C	HYB programındaki 90 dakikalık bekletmeden hemen sonra bir sonraki prosedüre geçiyorsanız HYB programına başlamadan en az 2 saat önce oda sıcaklığına getirin. Oda sıcaklığında, mikronumune inkübatöründe uygun hibridizasyonda ön ısıtma uygulayın ve HYB programı sona ermeden önce sıcaklığı 30 dakika kaydedin.

*Bir sonraki prosedürden önce duracaksanız bu prosedüre ulaşana kadar söz konusu reaktifin hazırlanmasını erteleyin.

2. Aşağıdaki HYB programını [Tablo 3](#)'de listelenen uygun döngü sayısını kullanarak termal döngüleyiciye kaydedin.
- Önceden ısıtılmış kapak seçeneğini seçin ve 100 °C'ye ayarlayın.
 - Reaksiyon hacmini ayarlayın.
 - **[Yüksek kaliteli gDNA]** 100 µl
 - **[FFPE'den ekstrakte edilen gDNA]** 25 µl
 - 5 dakika boyunca 98 °C
 - Her biri 1 dakikalık X döngü, ilk döngü için 98 °C'den başlar, ardından döngü başına 2 °C azalır.
 - Uygun sıcaklıkta 90 dakika tutun:
 - **[FFPE'den ekstrakte edilen gDNA]** 58 °C
 - **[80 mer prob panelleri]** 58 °C
 - **[Somatik varyant çağırma]** 58 °C
 - **[Tüm diğerleri]** 62 °C
- Toplam çalışma süresi ~115 dakikadır.

Tablo 3 Numune veya Panel Başına Döngü Sayısı

Numune ve Panel Türü	Döngü Sayısı (X)
FFPE'den ekstrakte edilen gDNA (panel türünden bağımsız olarak)	20
80 mer prob paneli (numune tipinden bağımsız olarak)	20
Somatik varyant çağırma	20
Diğer tüm numuneler ve paneller	18

Prosedür

1. **[Yüksek kaliteli gDNA]** Aşağıdaki reaktifleri, PCR plakasında havuzlanan her bir kütüphaneye *listelenen sırayla* ekleyin.
Ana karışım oluşturmayın. NHB2 ve EHB2'nin ana karışımını oluşturmak, zenginleştirme performansını olumsuz etkiler.
 - NHB2 (mavi kapak) (50 µl)
 - Zenginleştirme probu paneli (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. **[Yüksek kaliteli gDNA]** 90 µl'ye ayarlanmış bir pipet kullanarak karıştırmak için her bir kuyucuğu 10 kez pipetleyin..
3. **[FFPE'den ekstrakte edilen gDNA]** Aşağıdaki reaktifleri, *PCR plakasında* havuzlanan her bir kütüphaneye *listelenen sırayla* ekleyin.
Ana karışım oluşturmayın. NHB2 ve EHB2'nin ana karışımını oluşturmak, zenginleştirme performansını olumsuz etkiler.

- NHB2 (mavi kapak) (12,5 µl)
 - Zenginleştirme probu paneli (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[FFPE'den ekstrakte edilen gDNA]** 20 µl'ye ayarlanmış bir pipet kullanarak karıştırmak için her bir kuyucuğu 10 kez pipetleyin.
 5. Plakayı kapatın ve 10 saniye süreyle 280 × g'de santrifüjleyin.
 6. Numune plakasını önceden programlanmış termal döngüleyiciye yerleştirin ve HYB programını çalıştırın.
 7. HYB programı sıcaklık tutma süresi sona erdiğinde hemen bir sonraki prosedüre geçin.

**DİKKAT**

Hibridizasyon reaksiyonunun sıcaklığı oda sıcaklığının altına düşerse çökeltme meydana gelir.

Hibridize Problemleri Kaydetme

Bu adım, hedeflenen ilgili bölgelerde hibridize edilmiş problemleri yakalamak için Streptavidin Magnetic Beads'i (SMB3) kullanır.

Sarf Malzemeleri

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (amber kapaklı)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2 N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü
- 96 kuyucuklu MIDI plakası
- 96 kuyucuklu PCR plakası
- Yapıştırıcı conta
- MIDI plaka manyetik standı
- Daha sonraki prosedür için hazırlanın:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Reaktifler Hakkında

- EEW
 - Mikronumune inkübatöründe ön ısıtma işleminden önce EEW'nun en az 2 saat oda sıcaklığında çözündürüldüğünden emin olun.

- HYB programı sona ermeden önce EEW'nun mikronumune inkübatöründe 30 dakika ısıtıldığından emin olun.
- Kullanılmadığında EEW'yu mikronumune inkübatöründe bırakın. EEW, protokol boyunca ısıtılmış olarak kalmalıdır.
- Oda sıcaklığına ulaştıktan sonra bulanık olabilir.
- Sarı görünebilir.
- SMB3
 - SMB3, kullanımdan önce oda sıcaklığında olmalıdır.

Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Öge	Depolama	Talimatlar
SMB3	2 °C ila 8 °C	Oda sıcaklığına gelmesi için 2 saat bekletin. Ters çevirin ve ardından tamamen yeniden süspanse olana kadar vorteksleyin.
EEW (amber tüp)	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyondan sonra mikronumune inkübatöründe uygun hibridizasyonda ön ısıtma uygulayın ve HYB programı sona ermeden önce sıcaklığı 30 dakika kaydedin.
EE1	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözündürün ve ardından vorteksleyin.
HP3	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözündürün ve ardından vorteksleyin.
ET2	2 °C ila 8 °C	Oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için vorteksleyin.
EPM	-25 °C ila -15 °C	Bir saat buz üzerinde çözündürün. Karıştırmak için vorteksleyin, ardından kısa süre santrifüjleyin. Buzun üzerine koyun.
PPC	-25 °C ila -15 °C	Bir saat buz üzerinde çözündürün. Karıştırmak için vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin. Buzun üzerine koyun.

2. Numune plakasını aşağıdaki sıcaklıklardan birine inkübe etmek için bir mikronumune inkübatörünü MIDI ısı bloku ek parçasıyla önceden ısıtın. EEW'yu ön ısıtmak için isteğe bağlı ikinci bir mikronumune inkübatörü kullanılabilir. EEW'yu MIDI ısı bloku ek parçasının üzerine koyun.
 - [FFPE] 58 °C
 - [prob panelleri başına 80 mer] 58 °C
 - [Somatik varyant çağırma] 58 °C
 - [Tüm diğerleri] 62 °C

Prosedür

Kaydetme

1. Yeni MIDI plakasının ilgili kuyucuğuna SMB3'ü aşağıdaki gibi ekleyin.
 - **[Yüksek kaliteli gDNA]** 250 µl ekleyin SMB3.
 - **[FFPE'den ekstrakte edilen gDNA]** 62,5 µl SMB3 ekleyin.
2. Yüksek kaliteli gDNA için 100 µl'ye veya FFPE için 25 µl'ye ayarlanmış bir pipet seti kullanarak havuzlanmış her bir kütüphaneyi 96 kuyucuklu PCR plakasından yeni MIDI plakasının ilgili kuyucuğuna aktarın.
3. Plakayı kapatın ve 1200 rpm'de 4 dakika çalkalayın.
4. Sıçrama olursa, plakayı kısa süre santrifüjleyin.
5. Havuzlanmış kütüphane plakasını EEW tüpü altındaki mikronumune inkübatörü üzerindeki MIDI ısı bloku ara parçasına yerleştirin, kapağı kapatın ve ardından uygun sıcaklıkta 15 dakika inkübe edin:
 - **[FFPE]** 58 °C
 - **[80 mer prob paneli]** 58 °C
 - **[Somatik varyant çağırma]** 58 °C
 - **[Tüm diğerleri]** 62 °C
6. Havuzlanmış kütüphane plakasını çıkarın ve 30 saniye 280 × g'de santrifüjleyin.
7. Derhal bir MIDI plaka manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar bekleyin (2 dakika).
8. **[Yüksek kaliteli gDNA]** 200 µl'ye ayarlanmış bir pipet kullanarak boncuk peletini bozmadan her kuyucuktaki tüm süpernatantı alın ve atın.
9. **[FFPE'den ekstrakte edilen gDNA]** 90 µl'ye ayarlanmış bir pipet kullanarak boncuk peletini bozmadan her kuyucuktaki tüm süpernatantı alın ve atın.
10. Tüm kalan süpernatantı alın ve atın.

Yıkama

1. Manyetik standtan çıkarın.
2. **[Yüksek kaliteli gDNA]** EEW'ı mikronumune inkübatöründen hızlıca çıkarın ve her kuyucuğa 200 µl ekleyin.
3. **[FFPE'den ekstrakte edilen gDNA]** EEW'ı mikronumune inkübatöründen hızlıca çıkarın ve her kuyucuğa 50 µl ekleyin.
4. Kullanılmayan EEW'ları mikronumune inkübatörüne geri koyun ve ısıtın.
5. Kapatın ve 1800 rpm'de 4 dakika boyunca çalkalayın.
6. Numune plakasını EEW tüpü altındaki mikronumune inkübatörü üzerindeki MIDI ısı bloku ara parçasına yerleştirin, kapağı kapatın ve ardından uygun sıcaklıkta 5 dakika inkübe edin:
 - **[FFPE]** 58 °C
 - **[80 mer prob panelleri]** 58 °C
 - **[Somatik varyant çağırma]** 58 °C
 - **[Diğer tüm paneller]** 62 °C
7. Derhal bir MIDI plaka manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar bekleyin (2 dakika).

8. Yüksek kaliteli gDNA için 200 µl'ye veya FFPE için 50 µl'ye ayarlı bir pipet kullanarak her kuyucuktaki tüm süpernatantı alın ve atın.
9. Toplam üç yıkama için 1-8 arasındaki adımları iki kez tekrarlayın.

Transfer Yıkaması

1. Manyetik standtan çıkarın.
2. **[Yüksek kaliteli gDNA]** EEW'ı mikronumune inkübatöründen hızlıca çıkarın ve her kuyucuğa 200 µl ekleyin.
3. **[FFPE'den ekstrakte edilen gDNA]** EEW'ı mikronumune inkübatöründen hızlıca çıkarın ve her kuyucuğa 50 µl ekleyin.
4. Kapatın ve 1800 rpm'de 4 dakika boyunca çalkalayın. Sıçrama olursa hızı 1600 rpm'ye düşürün.
5. Yeniden süspansiyon edilmiş boncuklu çözeltiyi yeni bir MIDI plakasına aktarın.
Bazı numuneler kuyucuklarda kalabilir.



DİKKAT

Reaktifin aktarılması, aşağı akış PCR'yi engelleyebilecek kalıntı reaktiflerin taşınmasını en aza indirir.

6. Numune plakasını mikronumune inkübatörü üzerindeki MIDI ısı bloku ara parçasına yerleştirin, kapağı kapatın ve ardından uygun sıcaklıkta 5 dakika inkübe edin:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer prob panelleri] 58 °C
 - [Somatik varyant çağırma] 58 °C
 - [Tüm diğerleri] 62 °C
7. Derhal bir MIDI plaka manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar bekleyin (2 dakika).
8. Yüksek kaliteli gDNA için 200 µl veya FFPE için 50 µl'ye ayarlı bir pipet kullanarak, her kuyucuktaki tüm süpernatantı alın ve atın.
9. Plakayı 30 saniye süreyle 280 × g'de santrifüjleyin.
10. 10 saniye süreyle MIDI manyetik standda koyun.
11. 20 µl pipet kullanarak her kuyucuktaki artık sıvıyı alın ve atın.
12. Boncukların aşırı kurumasını ve kütüphane verim kaybını önlemek için derhal [Elüsyon, sayfa 42](#) kısmına geçin.

Elüsyon

1. Bir Elüsyon Ana Karışımı hazırlamak için aşağıdaki hacimleri birleştirin. Her bir hacmi, işlenmekte olan havuzlanmış kütüphanelerin sayısı ile çarpın.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)İlave reaktif fazlalığı hacime dahil edilir.
2. Vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin.
3. MIDI plakasını manyetik stanttan çıkarın.
4. Her kuyucuğa 23 µl Elüsyon Ana Karışımı ekleyin.
5. Plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 2 dakika boyunca çalkalayın.
6. 2 dakika boyunca plakayı oda sıcaklığında inkübe edin.
7. 280 x g ile 30 saniye boyunca santrifüjleyin.
8. MIDI plaka manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar bekleyin (2 dakika).
9. MIDI plakasından 21 µl süpernatantı yeni bir 96 kuyucuklu PCR plakasının ilgili kuyucuğuna aktarın.
10. MIDI plakasını atın.
11. 21 µl süpernatant içeren her bir kuyucuğa 4 µl ET2 ekleyin.
12. Pipeti 20 µl'ye ayarlayın ve karıştırmak için her bir kuyucuğu 10 kez yavaşça pipetleyin.
13. Plakayı kapatın ve sonra 10 saniye süreyle 280 x g'de santrifüjleyin.
14. 1 dakika boyunca plakayı oda sıcaklığında inkübe edin.

Zenginleştirilmiş Kütüphaneyi Çoğaltma

Bu adım, zenginleştirilmiş kütüphaneyi çoğaltmak için PCR kullanır.

Sarf Malzemeleri

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Yapıştırıcı conta

Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Öge	Depolama	Talimatlar
EPM	-25 °C ila -15 °C	4 °C'de veya buz üzerinde bir saat çözündürün. Karıştırmak için vorteksleyin, ardından kısa süre santrifüjleyin. Buzun üzerine koyun.
PPC	-25 °C ila -15 °C	4 °C'de veya buz üzerinde bir saat çözündürün. Karıştırmak için vorteksleyin ve ardından kısa süre santrifüjleyin. Buzun üzerine koyun.

2. Aşağıdaki AMP programını aşağıdaki tabloda listelenen uygun PCR döngü sayısını kullanarak termal döngüleyiciye kaydedin.

- Önceden ısıtılmış kapak seçeneğini seçin ve 100 °C'ye ayarlayın.
- Reaksiyon hacmini 50 µl olarak ayarlayın.
- 45 saniye boyunca 98 °C
- (X) döngü:
 - 30 saniye boyunca 98 °C
 - 30 saniye boyunca 60 °C
 - 30 saniye boyunca 72 °C
- 5 dakika boyunca 72 °C
- 10 °C'de tutun.

Toplam çalıştırma süresi ~35 dakikadır.

Numune ve Panel Türü	(X) Döngü
FPPE	14
Yüksek kaliteli gDNA için Illumina Ekzom Paneli (CEX)	10
FFPE için Illumina Ekzom Paneli (CEX)	12
Diğer tüm numuneler ve paneller	12 ¹²³⁴

¹ Küçük üçüncü taraf paneller için sonraki optimizasyon yoluyla 15 döngüye kadar ayarlanabilir. FFPE kullanılıyorsa döngü sayısı 17'ye kadar ayarlanabilir.

² Yalnızca 500 proba sahip üçüncü taraf paneller için 17 döngüye kadar ayarlanabilir. FFPE kullanılıyorsa döngü sayısı 19'a kadar ayarlanabilir.

³ FFPE numuneleri için 14 döngüye kadar ayarlanabilir.

⁴ PCR döngülerinin sayısının artırılması, FFPE numuneleri için daha yüksek bir mükerrer oran ve daha küçük parça boyutları ile sonuçlanabilir.

Prosedür

1. Her kuyucuğa 5 µl PPC ekleyin.
2. Her kuyucuğa 20 µl EPM ekleyin.
3. Plakayı kapatın ve 1200 rpm'de 1 dakika çalkalayın.
4. Plakayı 10 saniye süreyle 280 x g'de santrifüjleyin.
5. Önceden programlanmış termal döngüleyiciye yerleştirin ve AMP programını çalıştırın.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Duracaksanız 2 °C ila 8 °C'de iki güne kadar saklayın. Alternatif olarak, termal döngüleyicide 24 saate kadar bırakın.

Çoğaltılmış Zenginleştirilmiş Kütüphaneyi Temizleme

Bu adım, Cleanup Beads zenginleştirilmiş kütüphaneyi saflaştırmak ve istenmeyen ürünleri gidermek için kullanılır.

Sarf Malzemeleri

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Yeni hazırlanmış %80 etanol (EtOH)
- Yapıştırıcı contalar
- 96 kuyucuklu MIDI plakası
- 96 kuyucuklu PCR plakası
- MIDI plaka manyetik standı

Reaktifler Hakkında

- Cleanup Beads
 - Her kullanımdan önce vorteksleyin.
 - Boncukların eşit şekilde dağıldığından emin olmak için sık sık vorteksleyin.
 - Çözeltinin viskozitesi nedeniyle yavaşça aspire edin ve dağıtın.

Hazırlık

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Öge	Depolama	Talimatlar
CB	Oda sıcaklığı	Vorteksleyin ve sıvının rengi homojen olana kadar karıştırmak için ters çevirin.
RSB	2 °C ila 8 °C	Oda sıcaklığına getirin. Karıştırmak için vorteksleyin.

2. Mutlak etanolden taze %80 EtOH hazırlayın.

Prosedür

1. PCR plakasını 10 saniye süreyle 280 x g'de santrifüjleyin.
2. 10 saniye boyunca CB'yi 3 kez vorteksleyin ve ardından ters çevirin.
3. Yeni bir **MIDI** plakasının her bir kuyucuğuna 40,5 µl CB ekleyin.
4. PCR plakasının her kuyucuğundan MIDI plakasının karşılık gelen kuyucuğuna 45 µl aktarın.
5. Plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 1 dakika çalkalayın.
6. MIDI plakasını 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edin.
7. 280 x g'de 10 saniye boyunca santrifüjleyin.
8. MIDI plakasını manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar bekleyin (5 dakika).
9. 95 µl'ye ayarlanmış bir pipet kullanarak her kuyucuktaki tüm süpernatantı alın ve atın .
10. Aşağıdaki şekilde iki kez yıkayın.
 - a. Plaka manyetik stant üzerindeyken karıştırmadan 200 µl taze %80 EtOH ekleyin.
 - b. 30 saniye inkübe edin.
 - c. Boncukları bozmadan süpernatantı çıkarın ve atın.
11. Manyetik stant üzerinde 5 dakika havayla kurumaya bırakın.
12. Havayla kurumaya bırakılmışken 20 µl pipet kullanarak her kuyucuktaki artık EtOH'u alın ve atın.
13. Manyetik stanttan alın ve her kuyucuğa 32 µl RSB ekleyin.
14. Plakayı kapatın ve 1800 rpm'de 1 dakika çalkalayın.
15. 5 dakika boyunca plakayı oda sıcaklığında inkübe edin.
16. 280 x g'de 10 saniye boyunca santrifüjleyin.
17. MIDI plakasını manyetik standına yerleştirin ve sıvı berraklaşana kadar bekleyin (2 dakika).
18. 96 kuyucuklu MIDI plakasından 30 µl süpernatantı yeni bir PCR plakasının ilgili kuyucuğuna aktarın.
19. MIDI plakasını atın.

GÜVENLİ DURMA NOKTASI

Duracaksanız plakayı kapatın ve -25 °C ila -15 °C'de 7 güne kadar saklayın.

Zenginleştirilmiş Kütüphaneleri Kontrol Etme

Çift sarmallı gDNA girdisinin miktarını tayin etmek için interkalasyon boyası kullanan floresan tabanlı bir yöntem kullanın. NanoDrop veya diğer UV absorbans yöntemleri gibi total nükleik asidi ölçen yöntemlerden kaçının.

1. Miktar tayini yönteminizi kullanarak, zenginleştirilmiş kütüphanelerden 1 µl çalıştırın.

NOT Total prob molaritesi, zenginleştirme sonrası kütüphane verimini orantılı olarak etkiler.

125–235 bp ortalama insersiyon boyutu ve ~200 bp ila ~1000 bp arasında bir boyut aralığına sahip kütüphane parçası dağılımı bekleyebilirsiniz.

Kütüphaneleri Başlangıç Konsantrasyonuna Seyreltme

Bu adım, kütüphaneleri sekanslama sisteminizin başlangıç konsantrasyonuna seyreltir ve seri seyreltmedeki ilk adımdır. Başlangıç konsantrasyonuna seyreltikten sonra kütüphaneler denşirilmeye ve son yükleme konsantrasyonuna seyreltilmeye hazırdır.

Illumina, sekanslama için, kullandığınız zenginleştirme probu panelinden bağımsız olarak okuma başına 151 döngü (2 × 151) ve Dizin Okuması başına 10 döngü ile eşleştirilmiş bir sonlandırma çalıştırması ayarlamınızı önerir. Daha az çıkışan okuma veya daha az ham kapsama isterseniz 2 × 126 veya 2 × 101'e kadar sekanslama yapabilirsiniz.

1. Aşağıdaki formülü kullanarak kütüphanenin veya havuzlanmış kütüphanelerin molarite değerini hesaplayın.
 - Bir DNA fragman analizöründe kalifiye edilmiş kütüphaneler için kütüphane için elde edilen ortalama boyutu kullanın.
 - Diğer tüm kalifikasyon yöntemleri için ortalama kütüphane boyutu olarak 350 bp kullanın.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times ortalama kütüphane boyutu (bp)} = Molarite (nM)$$

Örneğin, kütüphane konsantrasyonunuz 20 ng/μl ve ortalama boyut 350 bp ise elde edilen molarite değeri 86,58 nM'dir.

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

2. Molarite değerini kullanarak kütüphaneleri sisteminizin başlangıç konsantrasyonuna seyreltmek için gereken RSB ve kütüphane hacimlerini hesaplayın.

Sekanslama Sistemi	Minimum Gerekli Kütüphane Hacmi (μl)	Başlangıç konsantrasyonu (nM)	Son Yükleme Konsantrasyonu (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) veya 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM, 350 pM'lik son yükleme konsantrasyonu için başlangıç konsantrasyonudur. Gerekirse, aşağıdaki tabloyu kullanarak son yükleme konsantrasyonunu ayarlayın.

Son Yükleme Konsantrasyonu (pM)	Havuzlanmış Kütüphane Konsantrasyonu (nM)
100	0,50
150	0,75

Son Yükleme Konsantrasyonu (pM)	Havuzlanmış Kütüphane Konsantrasyonu (nM)
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Kütüphaneleri RSB kullanarak seyreltin:

- **Çoklu kütüphane havuzu olarak miktar tayini yapılan kütüphaneler**-Havuzu sisteminizin başlangıç konsantrasyonuna seyreltin.
- **Ayrı ayrı miktar tayini yapılan kütüphaneler**-Her bir kütüphaneyi sisteminizin başlangıç konsantrasyonuna seyreltin. Bir çoklu kütüphane havuzu oluşturmak için bir tüpe her seyreltilmiş kütüphaneden 10 µl ekleyin.

4. Sisteminizin son yükleme konsantrasyonuna seyreltilmesi için denşirme ve seyreltme talimatını izleyin.

- NextSeq 550Dx Sistemi için bkz. [NextSeq 550Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 49](#).
- MiSeqDx Sistemi için bkz. [MiSeqDx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 51](#).
- NovaSeq 6000Dx Sistemi için bkz. [NovaSeq 6000Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 52](#).

Son yükleme konsantrasyonları bir başlangıç noktası ve genel kılavuzdur. Sonraki sekanslama çalışmaları veya akış hücresi titrasyonu ile iş akışınız ve kantifikasyon yönteminiz için konsantrasyonları optimize edin.

NextSeq 550Dx Sekanslama Hazırlığı

NextSeq 550Dx sekanslama sisteminde sekanslama için kütüphanelerin denşirilmesi ve seyreltilmesi için aşağıdaki talimatı kullanın.

Sarf Malzemeleri

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

Hazırlık

Sekanslama için denşirilmiş kütüphanelere *taze* bir 0,2 N NaOH seyreltisi hazırlayın. Küçük pipetleme hatalarının nihai NaOH konsantrasyonunu etkilemesini önlemek için ekstra hacim hazırlanır.

**DİKKAT**

Yeni seyreltilmiş 0,2 N NaOH, denşirme prosesi için esastır. Uygun olmayan denşirme, verimi azaltabilir.

1. Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Öge	Depolama	Talimatlar
HT1	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözündürün. Denşirilmiş kütüphaneleri seyreltmeye hazır olana kadar 2 °C ila 8 °C'de saklayın.

2. Yeni bir NaOH seyreltisi hazırlamak için aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin:

- Laboratuvar sınıfı su (800 µl)
- 1 N NaOH (200 µl)

Sonuç 1 ml 0,2 N NaOH.

3. Karıştırmak için tüpü birkaç kez ters çevirin.

4. 200 mM Tris-HCl, pH 7,0 hazırlamak için aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin.

- Laboratuvar sınıfı su (800 µl)
- 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

Sonuç 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0'dır.

NOT Tüpün kapağını kapalı tutun. Taze seyreltiyi **12 saat** içinde kullanın.

Kütüphaneleri Denşirme

1. Aşağıdaki kütüphane hacimlerini ve taze seyreltilmiş 0,2 N NaOH'yu bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin.

- 10 µl kütüphane
- 10 µl 0,2 N NaOH

2. Kısa vorteksleyin ve ardından 1 dakika süreyle 280 x g düzeyinde santrifüjleyin.

3. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.

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

Denşirilmiş Kütüphaneleri 20 pM'ye Seyreltme

1. Denşirilmiş kütüphanelerin tüpüne 970 µl önceden soğutulmuş HT1 ekleyin.

Sonuç, 20 pM denşirilmiş kütüphanedir.

2. Kısa vorteksleyin ve ardından 1 dakika süreyle 280 x g düzeyinde santrifüjleyin.

3. Son seyreltmeye geçmeye hazır olana kadar 20 pM kütüphanelerini buz üzerine yerleştirin.

Kütüphaneleri Yükleme Konsantrasyonuna Seyreltme

- Denşirilmiş 20 pM kütüphane çözeltisini 1,2 pM'ye seyreltmek için aşağıdaki hacimleri ekleyin.
 - Denşirilmiş kütüphane çözeltisi (78 µl)
 - Önceden soğutulmuş HT1 (1222 µl)Toplam hacim 1,2 pM'de 1,3 ml'dir.
- Karıştırmak için ters çevirin ve ardından kısa santrifüj uygulayın.
- Sekanslamaya geçin. Talimatlar için bkz. *NextSeq 550Dx Cihazı Referans Kılavuzu (belge no. 1000000009513)* ve *NextSeq 550Dx üzerinde DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulama Kullanıcı Kılavuzu (belge no. 200025238)*.

MiSeqDx Sekanslama Hazırlığı

MiSeqDx sekanslama sisteminde sekanslama için kütüphaneleri denşirmek ve seyreltmek üzere aşağıdaki talimatı kullanın.

Sarf Malzemeleri

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1 N NaOH

Hazırlık

Sekanslama için denşirilmiş kütüphanelere *taze* bir 0,2 N NaOH seyreltisi hazırlayın. Küçük pipetleme hatalarının nihai NaOH konsantrasyonunu etkilemesini önlemek için ekstra hacim hazırlanır.



DİKKAT

Yeni seyreltilmiş 0,2 N NaOH , denşirme prosesi için esastır. Uygun olmayan denşirme, verimi azaltabilir.

- Aşağıdaki sarf malzemelerini hazırlayın:

Öge	Depolama	Talimatlar
HT1	-25 °C ila -15 °C	Oda sıcaklığında çözdürün. Denşirilmiş kütüphaneleri seyreltmeye hazır olana kadar 2 °C ila 8 °C'de saklayın.

- Yeni bir NaOH seyreltisi hazırlamak için aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin:

- Laboratuvar sınıfı su (800 µl)
- 1 N NaOH (200 µl)

Sonuç 1 ml 0,2 N NaOH.

NOT Tüpün kapağını kapalı tutun. Taze seyreltiyi **12 saat** içinde kullanın.

Bir 4 nM Kütüphanesini Denşirme

- Aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin.
 - 4 nM kütüphane (5 µl)
 - 0,2 N NaOH (5 µl)
- Kısa vorteksleyin ve ardından 1 dakika süreyle 280 x g düzeyinde santrifüjleyin.
- 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
- Denşirilmiş kütüphane içeren tüpe 990 µl önceden soğutulmuş HT1 ekleyin.
Sonuç 1 ml 20 pM denşirilmiş kütüphanedir.

Denşirilmiş 20 pM Kütüphanesini Seyreltme

- Aşağıdaki hacimleri kullanarak istenen konsantrasyona seyreltin.

Konsantrasyon	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM kütüphane	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Önceden soğutulan HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- Karıştırmak için ters çevirin ve ardından kısa santrifüj uygulayın.
- Sekanslamaya geçin. Talimatlar için bkz. *MOS v4 için MiSeqDx Cihazı Referans Kılavuzu (belge no 200010452)*. ve *MiSeqDx için Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx İş Akışı Kılavuzu (belge no. 200015661)*.

NovaSeq 6000Dx Sekanslama Hazırlığı

NovaSeq 6000Dx sekanslama sisteminde sekanslama için kütüphaneleri denşirmek ve seyreltmek üzere aşağıdaki talimatı kullanın.

Sarf Malzemeleri

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

Hazırlık

Sekanslama için denşirilmiş kütüphanelere *taze* bir 0,2 N NaOH seyreltisi hazırlayın. Küçük pipetleme hatalarının nihai NaOH konsantrasyonunu etkilemesini önlemek için ekstra hacim hazırlanır.

**DİKKAT**

Yeni seyreltilmiş 0,2 N NaOH , denşirme prosesi için esastır. Uygun olmayan denşirme, verimi azaltabilir.

- 1 N NaOH 'u 0,2 N NaOH'a seyreltmek için aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin:

Tablo 4 S2 Modu

Reaktif	Bir Akış Hücresi Hacmi (µl)	İki Akış Hücresi Hacmi (µl)
Laboratuvar sınıfı su	40	80
Stok 1 N NaOH	10	20

Bu hacimler, bir akış hücresi için 50 µl 0,2 N NaOH veya iki akış hücresi için 100 µl 0,2 N NaOH verir.

Tablo 5 S4 Modu

Reaktif	Bir Akış Hücresi Hacmi (µl)	İki Akış Hücresi Hacmi (µl)
Laboratuvar sınıfı su	80	160
Stok 1 N NaOH	20	40

Bu hacimler, bir akış hücresi için 100 µl 0,2 N NaOH veya iki akış hücresi için 200 µl 0,2 N NaOH verir.

- Karıştırmak için birkaç kez ters çevirin veya iyice vorteksleyin.
- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 hazırlamak için aşağıdaki hacimleri bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirin.

- Laboratuvar sınıfı su (600 µl)
- 1 M Tris-HCl, pH 8,0 (400 µl)

Sonuç 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0'dır.

NOT Tüpün kapağını kapalı tutun. Taze seyreltiyi **12 saat** içinde kullanın.

Normalleştirilmiş Kütüphane Havuzu Oluşturma

Yükleme konsantrasyonu kütüphane hazırlama, miktar tayini ve normalleşme yöntemlerine göre farklılık gösterebilir.

Kütüphaneleri uygun konsantrasyona normalleştirmek için aşağıdaki talimatı kullanın ve ardından havuzlayın. Aynı akış hücresinde sekanslanan kütüphaneler tek bir normalleştirilmiş havuzda birleştirilmelidir.

NOT Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kiti ile şerit başına çalışılabilecek maksimum numune sayısı 192'dir. Bu limit, A ve B Setindeki toplam UD Dizini sayısından kaynaklanır.

Havuzlama için Kütüphaneleri Normalleştirme

- İstenen nihai yükleme konsantrasyonuna göre gerekli havuzlanan kütüphane konsantrasyonunu belirleyin.
 - 350 pM'lik son yükleme konsantrasyonu için gerekli havuzlanmış kütüphane konsantrasyonu 1,75 nM'dir.
 - Farklı bir son yükleme konsantrasyonu için havuzlanmış kütüphane konsantrasyonunu belirlemek üzere [Kütüphaneleri Başlangıç Konsantrasyonuna Seyreltme, sayfa 48](#) kısmına bakın.
- Kütüphaneleri, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 kullanarak istenen havuzlanmış kütüphane konsantrasyonuna normalleştirin.
Kütüphanelerin uygun konsantrasyona seyreltilmesine ilişkin yardım için web sitesindeki [Havuzlama Hesaplayıcısına](#) Illumina bakın.

Önerilen Yükleme Konsantrasyonları

Optimum DNA yükleme konsantrasyonu, kütüphane türüne ve parça boyutuna bağlıdır. > 450 bp kütüphaneler için daha yüksek yükleme konsantrasyonları gerekebilir.

Normalleştirilmiş Kütüphaneleri Havuzlama ve İsteğe Bağlı PhiX Kontrolü Ekleme

- Normalleştirilmiş her kütüphanenin uygun hacmini yeni bir mikrosantrifüj tüpünde birleştirerek aşağıdaki son hacimlerden birini elde edin:

Mod	Son Hacim (µl)
S2	150
S4	310

- [İsteğe bağlı]** %1 oranında denşirilmemiş halde aşağıdaki şekilde PhiX> ekleyin.
 - 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 kullanarak 10 nM PhiX'i 2,5 nM'ye seyreltin.
 - Denşirilmemiş kütüphane havuzunun tüpüne uygun hacimde denşirilmemiş 2,5 nM PhiX ekleyin.

Mod	Denşirilmemiş 2,5 nM PhiX (µl)	Denşirilmemiş Kütüphane Havuzu (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

PhiX'e ekleme yaparken iyi dengelenmiş kütüphaneler için önerilen miktar %1'dir. Düşük çeşitlilikteki kütüphaneler daha fazlasını gerektirebilir. Bir PhiX kontrolünü düşük çeşitlilikteki kütüphanelerle kullanmak üzere rehberlik için Illumina Teknik Destek Birimi ile iletişime geçin.

Denşirilmiş Kütüphane Havuzu ve İsteğe Bağlı PhiX Kontrolü

- Denşirilmemiş kütüphane havuzu tüpüne ve isteğe bağlı PhiX'e aşağıdaki gibi 0,2 N NaOH ekleyin.

Akış Hücresi	0,2 N NaOH	Denşirilmemiş Kütüphane Havuzu (µl)	Ortaya Çıkan Hacim
S2	37	150	PhiX ile 187 µl veya 187,9 µl
S4	77	310	PhiX ile 387 µl veya 388,9 µl

- Kapağını kapatın ve kısa vorteksleyin.
- 280 × g'de 1 dakikaya kadar santrifüjleyin.
- Denşirmek için 8 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edin.
- Nötralize etmek için 400 mM Tris-HCl, pH 8,0'ı aşağıdaki gibi ekleyin.

Mod	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Ortaya Çıkan Hacim
S2	38	PhiX ile 225 µl veya 225,9 µl
S4	78	PhiX ile 465 µl veya 466,9 µl

- Kapağını kapatın ve kısa vorteksleyin.
- 280 × g'de 1 dakikaya kadar santrifüjleyin.
- Tüm denşirilmiş kütüphane veya denşirilmiş kütüphane ve PhiX hacmini NovaSeq 6000Dx kütüphane tüpüne aktarın.
- Sekanslamaya geçin. Talimatlar için *NovaSeq 6000Dx Cihaz Ürün Belgelerine* (belge no. 200010105) ve NovaSeq 6000Dx için *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx'e* (belge no. 200014776) bakın.

Sorun Giderme

İş akışındaki sorunları gidermek için aşağıdaki tabloyu kullanın. Bir numune için sekanslama çalıştırması veya kütüphane hazırlığı iki kez başarısız olursa ek sorun giderme gerekebilir. Illumina Teknik Destek Birimi ile iletişime geçin.

Gözlem	Olası Neden	Tavsiye Edilen İşlem
Sekanslama çalışması, Kalite Kontrol Spesifikasyonlarını karşılamamaktadır	Test iş akışında kullanıcı veya laboratuvar ekipmanı hatası	Uygun kütüphane verimi ve parçacık boyutu dağılımı sağlamak için zenginleştirilmiş kütüphane kalifikasyonu yapın. Şüphelenilen kullanım veya ekipman hatasının nerede meydana geldiğine bağlı olarak kütüphane hazırlama işlemini, aşağıdaki adımlardan birinden yararlanarak tekrarlayın. Bilinmiyorsa veya başka hatalar oluştuysa çalıştırmanızın sorunlarını gidermek için Illumina Teknik Destek Birimi ile iletişime geçin. - Kütüphaneleri yeniden sekanslayın. Bkz. NextSeq 550Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 49, MiSeqDx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 51 veya NovaSeq 6000Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 52. - Kütüphaneleri yeniden zenginleştirin. Bkz. Probları Hibridize Etme, sayfa 36. - Kütüphane hazırlığına iş akışının başından itibaren başlayın. Kullanım Talimatı, sayfa 20 bakın.
	Cihaz sorunu	Illumina Teknik Destek Birimi ile iletişime geçin.
FASTQ oluşturma hatası veya genel sekanslama sistemi hatası (ör. ağ hatası, reaktifleri yükleme/boşaltma hataları vb.)	Yazılım veya cihaz sorunu	Analiz konusunda yardım için modüle veya uygulama kılavuzuna bakın veya NextSeq 550Dx Cihazı Referans Kılavuzu (belge no 1000000009513) ya da MOS v4 için MiSeqDx Cihazı Referans Kılavuzu (belge no 200010452). NovaSeq 6000Dx Cihaz Ürün Belgelerine (belge no. 200010105) bakın. Ek yardım için Illumina Teknik Destek Birimi ile iletişime geçin.

Gözlem	Olası Neden	Tavsiye Edilen İşlem
DNA kütüphanesi, sekanslama yüklemesi için yeterli verim üretmiyor.	Numune girdisine ilişkin gereklilikler karşılanmadı	Uygun numune girdisi sağlayın ve kütüphane hazırlığını tekrarlayın. Bkz. Numune Girdi Önerileri, sayfa 17 .
	Test iş akışında kullanım veya ekipman hatası	Şüphelenilen kullanım veya ekipman hatasının nerede meydana geldiğine bağlı olarak kütüphane hazırlama işlemini, aşağıdaki adımlardan birinden yararlanarak tekrarlayın. Bilinmiyorsa veya başka hatalar oluştuysa çalıştırmanızın sorunlarını gidermek için Illumina Teknik Destek Birimi ile iletişime geçin. - Kütüphaneleri yeniden sekanslayın. Bkz. NextSeq 550Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 49, MiSeqDx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 51 veya NovaSeq 6000Dx Sekanslama Hazırlığı, sayfa 52. - Kütüphaneleri yeniden zenginleştirin. Bkz. Probları Hibridize Etme, sayfa 36. - Kütüphane hazırlığına iş akışının başından itibaren başlayın. Kullanım Talimatı, sayfa 20.
	Zenginleştirme probu paneli için gereklilikler karşılanmadı.	Uygun zenginleştirme prob panelinin bulunduğundan emin olun ve kütüphane hazırlama işlemini tekrarlayın. Bkz. Zenginleştirme Probu Paneli Gereklilikleri, sayfa 10 .

Performans Özellikleri

Tam Ekzom Panelleriyle Performans

Ekzom paneli performansı, germ hattı varyantı tespiti (Coriell platin genomu) için bilinen bir gerçeklik seti ile Coriell Hücre Hattı gDNA NA12878'in en düşük (50 ng) ve en yüksek (1000 ng) önerilen girdisi kullanılarak test edilmiştir. Ekzom paneli 1 (45 Mb) ve ekzom paneli 2 (36,8 Mb) temsili paneller olarak kullanılmıştır. 24 teknik kopya, iki 12'li zenginleştirme reaksiyonunda ekzom paneli 1 (45 Mb) Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi kullanılarak test edilmiştir. 12 teknik kopya, tek bir 12'li zenginleştirme reaksiyonunda ekzom paneli 2 (36,8 Mb) Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi kullanılarak test edilmiştir. Zenginleştirilmiş kütüphaneler NextSeq 550Dx sekanslama sisteminde DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager modülüyle sekanslanmıştır.

Aşağıdaki tabloda, her bir panelle test edilen teknik kopyalar için ikincil sekanslama ve varyant arama performans metriklerinin ortalama değerleri gösterilmektedir.

Tablo 6 İki Tam Ekzom Paneliyle Test Performansı

Panel	Dolgulu Benzersiz Okuma Zenginleştirme	Kapsam Tekdüzeliliği	Parça Uzunluğu Medyanı	SNV Geri Arama ¹	SNV Hassasiyeti ²	İndel Duyarlılığı ¹	İndel Kesinliği ²
Ekzom paneli 1 (45 Mb)	%80	%96	186 bp	%96	%99	%90	%89
Ekzom paneli 2 (36,8 Mb)	%93	%98	188 bp	%96	%99	%92	%93

¹ Duyarlılık=Pozitifler/(gerçek pozitifler + sahte negatifler)² Kesinlik=Doğru pozitifler/(doğru pozitifler + sahte pozitifler)

Saptama Sınırı

Tespit sınırını test etmek için Horizon HD799 DNA referans standardı kullanılmıştır. HD799, %1-24,5 arasında değişen alelik sıklıklarda bilinen SNV'lere sahip orta derecede bozulmuş formalinle işlem görmüş DNA'dan oluşur. En düşük tavsiye edilen DNA girişi (50 ng) kullanılmış ve $\geq$ %5,0 varyant alel frekansına (VAF) sahip SNV'lerin tespit oranı değerlendirilmiştir. 16 teknik kopya, FFPE iş akışı kullanılarak Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla test edilmiş, 16 (1'li) zenginleştirmede bir pan-kanser zenginleştirme paneli (1,94 Mb) ile zenginleştirilmiş ve ardından DNA GenerateFASTQ Dx modülü ile bir NextSeq 550Dx cihazında sekanslanmıştır.

Tüm numuneler, aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi panele özgü numune performans gerekliliklerini karşılamıştır.

Tablo 7 Saptama Sınırı için Numune Performansı

Panel	$\geq$ %5,0 VAF'lik SNV'lerin Varyant Saptama Oranı	Ortalama Kapsam Tekdüzeliliği
Pan-kanser zenginleştirme paneli (1,94 Mb, 523 gen)	%100	%99

Enterferan Maddeler

Potansiyel olarak interferans yapan maddelerin etkisi, interferans yapan maddelerin varlığında testin performansı değerlendirilerek Illumina DNA Prep with Enrichment Dx'da değerlendirilmiştir.

Tam Kanda İnterferans

DNA ekstraksiyonundan önce tam insan kan numunelerine eklenmesi yoluyla asetaminofen (ekzojen bileşik, ilaç), kreatinin ve trigliseritler (endojen metabolitler) test edilmiştir. Kan alımından (kısa alım) kaynaklanan etkileşimi değerlendirmek için EDTA da tam kan numunelerine eklenmiştir. Ayrıca, numune hazırlığından kaynaklanan interferansı değerlendirmek için tam kandan ekstrakte edilen DNA'ya moleküler sınıf etanol eklenmiştir.

Aşağıdaki tablo, interferansa göre test konsantrasyonlarını göstermektedir.

Tablo 8 Tam Kanda Test Edilen Potansiyel Olarak Etkileşime Giren Maddeler ve Konsantrasyonlar

Test Maddesi	Test Konsantrasyonu
Asetaminofen	15,6 mg/dl* Bir ilaç terapötik dozunun ardından beklenen en yüksek konsantrasyonun üç katı.
Kreatinin	15 mg/dl* Popülasyonda en yüksek gözlemlenen konsantrasyon.
Trigliseritler	1,5 g/dl* Popülasyonda en yüksek gözlemlenen konsantrasyon.
EDTA	6 mg/ml EDTA tüplerinde toplanan kanda beklenen konsantrasyonun üç katı.
Moleküler sınıf etanol	%15 h/h DNA ekstraksiyonu sonrası elüatta.

* CLSI EP37-ED1:2018 uyarınca

İnterferans yapan madde başına test yoluyla 12 adet teknik kopya, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla test edilmiş, tek bir (12'li) bir zenginleştirmede ekzom paneli 1 (45 Mb) ile zenginleştirilmiş ve ardından DNA GenerateFASTQ Dx modülü ile bir NextSeq 550Dx cihazında sekanslanmıştır.

Test edilen maddeler için 12 numunenin tümü numune performans gerekliliklerini karşılamıştır ve testin performansında herhangi bir interferans gözlemlenmemiştir.

FFPE Dokusunda İnterferans

İki kolorektal FFPE örneği, yüksek hemoglobin düzeyi kanla %50 FFPE doku örneği kontaminasyonu en kötü durum senaryosunu temsil etmek için 10 µm FFPE kesiti başına 0,1 mg hemoglobin varlığında ve yokluğunda test edilmiştir. Numuneler, tekli zenginleştirmelerde temsili bir panel olarak pan-kanser zenginleştirme paneli 1 (1,94 Mb) kullanılarak Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla test edilmiştir. Zenginleştirilmiş kütüphaneler daha sonra DNA GenerateFASTQ Dx modülüyle birlikte bir NextSeq 550Dx cihazında sekanslanmıştır. Tüm numuneler, numune performans gerekliliklerini karşılamıştır ve hemoglobinin, testin performansını etkilemediği gösterilmiştir.

Numune hazırlığından kaynaklanan etkileşimi değerlendirmek için iki ekzojen bileşik, mesane kanseri FFPE doku numunesinden ekstrakte edilen DNA'ya eklenmiştir. Test edilen ekzojen maddeler, DNA ekstraksiyon prosesi sırasında yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon çözeltileridir ve aşağıdaki tabloda test edildikleri miktarlarla listelenmiştir.

Test maddesi çözeltileri, kolon bazlı DNA izolasyon kitlerinde ticari olarak mevcuttur.

Tablo 9 FFPE'de Test Edilen Potansiyel Olarak Etkileşime Giren Ekzojen Maddeler ve Konsantrasyonlar

Test Maddesi	Test Konsantrasyonu (µl / 30 µl Elüat)
Deparafinizasyon Çözeltisi	113 x 10 ⁻⁶
Yıkama Tamponu AW2	0,417

İnterferans yapan madde başına sekiz adet teknik kopya, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla test edilmiş, tekli zenginleştirmelerde bir pan-kanser zenginleştirme paneli (1,94 Mb) ile zenginleştirilmiş ve ardından DNA GenerateFASTQ Dx modülü ile bir NextSeq 550Dx cihazında sekanslanmıştır.

Test edilen her iki madde için sekiz numunenin tümü numune performans gerekliliklerini karşılamıştır ve testin performansında herhangi bir interferans gözlemlenmemiştir.

Çapraz Kontaminasyon

Coriell Hücre Hattı gDNA NA12878 (kadın, 10 numune), Coriell Hücre Hattı gDNA NA12877 (erkek, 12 numune) bir dama tahtası plakası düzeninde Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testi yoluyla test edilmiştir ve hiçbir şablon kontrolü (NTC, 2 numune) test edilmemiştir. Tüm numuneler, numune çapraz kontaminasyonunu değerlendirmek için en sıkı koşul olarak en yüksek (1000 ng) gDNA girdi önerisini kullanmıştır. Test iki ayrı operatör tarafından iki kez gerçekleştirilmiştir. Ekzom paneli 1 (45 Mb), 12'li zenginleştirme reaksiyonunda kullanılmıştır. Zenginleştirilmiş kütüphaneler NextSeq 550Dx üzerinde DNA GenerateFASTQ Dx ile sekanslanmıştır. Değerlendirme, tam bir kadın numunesi plakasının arka plan düzeyleri ve NTC numunelerinin dizin temsili ile karşılaştırılarak kadın numunelerindeki erkek spesifik Y kromozomunun kapsamı değerlendirilerek yapılmıştır.

Tablo 10 Çapraz Kontaminasyon Sonuçları

<3x Başlangıç Parazitinde Erkek Y-Kromozom Kapsamına Sahip Kadın Numuneleri	NTC'de Dizin Temsili
%100	< %0,0005

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulama Performansı

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx NovaSeq 6000Dx Uygulamasının performans özellikleri *NovaSeq 6000Dx Cihaz Kullanım Talimatında* (belge no. 200025276) verilmiştir.

NextSeq 550Dx üzerindeki DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx aşağıdaki üç iş akışı da dahil olmak üzere NovaSeq 6000Dx uygulamasıyla aynı ikincil analiz iş akışlarını sağlar: FASTQ üretimi, germ hattı varyant tespiti için FASTQ ve VCF üretimi ve somatik varyant tespiti için FASTQ ve VCF üretimi.

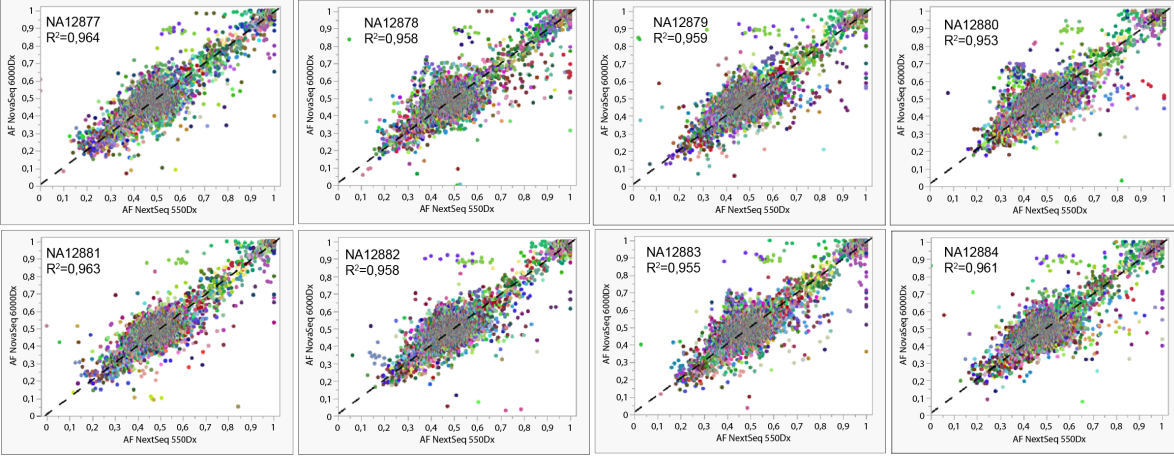
Benzer ikincil analiz performansı, her iki platformda sekanslanan aynı kütüphane hazırlığından elde edilmiştir. Coriell Hücre Hattı gDNA numuneleri için varyant saptama oranı (Tablo 11) ve frekans uyumu (Bkz. Şekil 1), 23 insan kromozomunun tamamında 1.970.505 bazı (9.232 hedef) kapsayan çeşitli genleri sorgulamak için tasarlanmış temsili bir test kullanılarak değerlendirilmiştir. Sekiz Platin Genom DNA örneği, altı kopya halinde yedi (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) ve beş kopya halinde bir (NA12881) kez test edildi (Bkz. Şekil 1). Kütüphaneler, NovaSeq 6000Dx ve NextSeq 550Dx Cihazlar üzerinde üç çalıştırma ile sekanslanmış ve varyant çağırma, DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulamasının germ hattı varyant saptama analizi iş akışı için FASTQ ve VCF üretimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

NovaSeq 6000Dx ve NextSeq 550Dx cihazlarında uygulama performansı arasındaki güçlü korelasyona dayanarak *NovaSeq 6000Dx Cihaz Kullanım Kılavuzu'nda* (belge no. 200025276) sağlanan ikincil analizle ilgili performans özelliklerinin de NextSeq 550Dx uygulaması üzerinde DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx için de geçerli olduğu belirlenmiştir.

Tablo 11 Uygulama Performansı – SNV'ler, İnsersiyonlar ve Delesyonlar için Varyant Algılama Oranı

Panel	NovaSeq 6000Dx üzerinde Varyant Saptama Oranı	NextSeq 550Dx'te Varyant Saptama Oranı
Pan-genom paneli (1,97 Mb, 9.232 hedef, 23 Kromozom)	%99,9	%99,9

Şekil 1 DRAGEN for IDPE Dx Uygulama analizi ile NovaSeq 6000Dx ve NextSeq 550Dx çalıştırmaları için Varyant Frekansı karşılaştırması



Ek: Illumina UD Dizinleri Adaptör Sekansları

Bu benzersiz ikili (UD) dizin adaptörleri, önerilen eşleştirme stratejisini uygulamak için plakada düzenlenmiştir. Dizin adaptörleri, tipik sekiz taban yerine 10 taban uzunluğundadır.

Dizin 1 (i7) Adaptörleri

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Dizin 2 (i5) Adaptörleri

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Aşağıdaki sekanslama, Okuma 1 ve Okuma 2 adaptör kırpması için kullanılır.

CTGTCTTACATCT

Plaka A/Set 1 Dizin Adaptörleri

Dizin Adı	Adaptördeki i7 Tabanları	Adaptördeki i5 Tabanları
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA

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

Dizin Adı	Adaptördeki i7 Tabanları	Adaptördeki i5 Tabanları
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC

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

Plaka B/Set 2 Dizin Adaptörleri

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

Dizin Adı	Adaptördeki i7 Tabanları	Adaptördeki i5 Tabanları
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCTG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCTTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA

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

Dizin Adı	Adaptördeki i7 Tabanları	Adaptördeki i5 Tabanları
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Revizyon Geçmişi

Belge	Tarih	Değişiklik Açıklaması
Belge No. 200038118 v01	Aralık 2025	- NextSeq 550Dx için Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Modülüne yapılan referans kaldırıldı. - Tagmentasyon Sonrası Temizleme prosedürü netleştirildi. - MOS v4 belge parça numarasına ait MiSeqDx Cihazı Referans Kılavuzu güncellendi.
Belge No. 200038118 v00	Temmuz 2023	İlk Sürüm. Önceki belge 200019584'nin yerine bu geçti. Belge 200019584 v2'den bu yeni belgeye yapılan değişiklikler: - NextSeq 550Dx için DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Uygulaması kullanılarak NextSeq 550Dx Cihazının üzerinde sekanslamayı desteklemek için içerik eklendi. - Sağlanmayan Reaktifler listesi netleştirildi. - Uyarılar ve Önlemler bölümüne olay raporlama bilgileri eklendi. - Zenginleştirme Kütüphaneleri beklentisi netleştirildi. 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 hazırlama talimatı eklendi. - Sekanslama Hazırlığı adımı yazım hatası kaldırıldı. Daha önce 200019584 belgesinde yapılan değişiklikler: - NovaSeq 6000Dx Cihazının üzerinde sekanslamayı desteklemek için içerik eklendi. - Sekanslama sistemi adları ve katalog numaraları eklendi. - Tek dizinli kütüphaneler için benzersiz çift dizinleme bilgileri kaldırıldı.

Patentler ve Ticari Markalar

Bu belge ve içindekiler Illumina, Inc. ve iştiraklerinin ("Illumina") mülkiyetinde olup yalnızca işbu belgede açıklanan ürünün/ürünlerin kullanımıyla bağlantılı olarak müşterisinin sözleşmeye ilişkin kullanımı içindir. Bu belge ve içindekiler Illumina'nın önceden yazılı izni olmaksızın başka hiçbir amaçla kullanılamaz veya dağıtılamaz ve/veya hiçbir şekilde iletilemez, ifşa edilemez ya da kopyalanamaz. Illumina bu belge ile patenti, ticari markası, telif hakkı veya genel hukuk hakları ya da üçüncü tarafların benzer hakları kapsamında hiçbir lisansı devretmez.

Bu belgede açıklanan ürünün/ürünlerin uygun ve güvenli bir şekilde kullanılması için nitelikli ve uygun eğitim almış çalışanlar bu belgedeki talimatı tam olarak ve açık bir şekilde uygulamalıdır. Söz konusu ürün/ürünler kullanılmadan önce bu belgedeki tüm bilgiler tam olarak okunmalı ve anlaşılmalıdır.

BU BELGEDE YER ALAN TÜM TALİMATIN TAMAMEN OKUNMAMASI VE AÇIK BİR ŞEKİLDE UYGULANMAMASI, ÜRÜNÜN/ÜRÜNLERİN HASAR GÖRMESİNE, KULLANICI VEYA BAŞKALARI DÂHİL OLMAK ÜZERE KİŞİLERİN YARALANMASINA VE DİĞER MALLARIN ZARAR GÖRMESİNE NEDEN OLABİLİR VE ÜRÜN/ÜRÜNLER İÇİN GEÇERLİ OLAN HER TÜRLÜ GARANTİYİ GEÇERSİZ KILACAKTIR.

ILLUMINA BU BELGEDE AÇIKLANAN ÜRÜNÜN/ÜRÜNLERİN (ÜRÜNÜN PARÇALARI VE YAZILIMI DÂHİL) YANLIŞ KULLANIMINDAN DOĞAN DURUMLARDAN SORUMLU TUTULAMAZ.

© 2025 Illumina, Inc. Tüm hakları saklıdır.

Tüm ticari markalar Illumina, Inc. veya ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir. Özel ticari marka bilgileri için www.illumina.com/company/legal.html sayfasına başvurun.

İletişim Bilgileri



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 ABD
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (Kuzey Amerika dışından)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Avustralya Sponsoru

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

Ürün Etiketi

Ürün ambalajı ve etiketinde görülebilecek sembollere dair eksiksiz referans için support.illumina.com adresinden kitinize yönelik *Documentation* (Belge) sekmesindeki sembol anahtarına bakın.