

DÙNG CHO CHẨN ĐOÁN TRONG ỐNG NGHIỆM. CHỈ DÙNG CHO MỤC ĐÍCH XUẤT KHẨU.

Mục đích sử dụng

Bộ kit Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx là một bộ thuốc thử và vật tư tiêu hao được sử dụng để chuẩn bị các thư viện mẫu từ DNA hệ gen có nguồn gốc từ tế bào và mô người để phát triển các xét nghiệm chẩn đoán *trong ống nghiệm*. Người dùng cần cung cấp các bảng mẫu dò để chuẩn bị các thư viện nhằm đến các vùng hệ gen cụ thể cần quan tâm. Các thư viện mẫu được tạo ra được sử dụng trên các hệ thống giải trình tự Illumina. Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx bao gồm phần mềm để thiết lập, giám sát và phân tích lần chạy giải trình tự.

Nguyên tắc của quy trình

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit được thiết kế cho việc chuẩn bị thủ công thư viện giải trình tự DNA, được làm giàu cho các vùng mục tiêu từ DNA bộ gen có nguồn gốc từ tế bào và mô người.

Các bảng oligonucleotide gắn biotin do người dùng cung cấp là bắt buộc để làm giàu mục tiêu. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tương thích với nhiều kích thước bảng, từ bảng nhỏ (< 20.000 mẫu dò) đến bảng lớn (> 200.000 mẫu dò). Các thư viện DNA đã được làm giàu tạo ra sẽ được sử dụng cho quá trình giải trình tự trên các hệ thống Illumina.

Quy trình của Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit bao gồm các bước sau:

- **Cắt nối DNA bộ gen**—Sử dụng Enrichment BLT Small (eBLTS) để cắt nối đầu vào DNA. Trong quá trình cắt nối, gDNA được phân mảnh và gắn thẻ với adapter trong một bước duy nhất. Cần có đầu vào DNA tối thiểu là 50 ng để làm bão hòa eBLTS trong phản ứng cắt nối. Khi đã bão hòa, eBLTS sẽ phân mảnh một số lượng cố định phân tử DNA nhằm tạo ra thư viện chuẩn hóa với phân bố kích thước mảnh nhất quán.
- **Làm sạch sau bước cắt nối**—Làm sạch DNA đã được gắn thẻ adapter trên eBLTS để sử dụng trong khuếch đại.
- **Khuếch đại DNA đã được cắt nối**—Khuếch đại DNA đã được cắt nối bằng chương trình PCR chu kỳ giới hạn. Các chỉ thị kép độc nhất (UD) được thêm vào hai đầu của các mảnh DNA, cho phép gắn mã kép độc nhất cho thư viện DNA và tạo cụm trong quá trình giải trình tự.
- **Làm sạch thư viện**—Sử dụng quy trình tinh sạch bằng hạt để tinh sạch và chọn lọc kích thước thư viện DNA đã khuếch đại.
- **Gộp nhóm thư viện**—Kết hợp các thư viện DNA với chỉ thị độc nhất thành một nhóm gồm tối đa 12 thư viện. Bạn có thể gộp nhóm thư viện theo thể tích hoặc khối lượng.
- **Tạo thể lai mẫu dò**—Bao gồm phản ứng tạo thể lai, trong đó thư viện DNA sợi kép được biến tính và một bảng mẫu dò DNA gắn biotin được tạo thể lai với các vùng hệ gen mục tiêu.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tương thích với nhiều bảng mẫu dò. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit không bao gồm bảng làm giàu. Các bảng mẫu dò do người dùng cung cấp và phải đáp ứng các thông số kỹ thuật yêu cầu. Các thuốc thử Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tương thích với cả bảng oligonucleotide DNA làm giàu của Illumina và bên thứ ba nếu đáp ứng yêu cầu. Để biết thông tin về các thông số kỹ thuật cần thiết cho các bảng của bên thứ ba, hãy tham khảo mục [Các yêu cầu về bảng mẫu dò làm giàu trên trang 10](#)
- **Bắt giữ mẫu dò đã lai**—Sử dụng Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) để bắt giữ các đầu dò gắn biotin đã tạo thể lai với các vùng mục tiêu quan tâm.
- **Khuếch đại thư viện đã làm giàu**—Sử dụng PCR để khuếch đại các thư viện đã làm giàu.
- **Làm sạch thư viện đã làm giàu được khuếch đại**—Sử dụng quy trình tinh sạch bằng hạt để tinh sạch các thư viện đã làm giàu, sẵn sàng cho giải trình tự.
- **Giải trình tự**—Giải trình tự các thư viện đã làm giàu được thực hiện trên các hệ thống giải trình tự MiSeqDx™, NextSeq 550Dx™ hoặc NovaSeq 6000Dx™. Với MiSeqDx, mô-đun DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager tích hợp được sử dụng để thiết lập chạy, giám sát và tạo FASTQ từ các tín hiệu cơ sở. Với NextSeq 550Dx có DRAGEN Server và NovaSeq 6000Dx, Ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx được sử dụng để thiết lập chạy và phân tích thứ cấp với nhiều quy trình khả dụng.

Giới hạn của quy trình

- Dùng cho chẩn đoán *trong ống nghiệm*.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tương thích với DNA hệ gen có nguồn gốc từ tế bào và mô người.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tương thích với đầu vào gDNA sợi kép 50–1000 ng. Hiệu suất không được đảm bảo với các đầu vào nằm ngoài các ngưỡng này.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit không bao gồm thuốc thử để tách chiết DNA. Các kết quả xét nghiệm phân tích, bao gồm cả thử nghiệm mức độ gây trở ngại, được cung cấp trong [Đặc điểm hiệu suất trên trang 56](#) đã được lấy bằng cách dùng máu toàn phần và FFPE làm các loại mẫu đại diện với bộ kit tách chiết DNA đại diện. Tất cả các xét nghiệm chẩn đoán được phát triển để sử dụng với thuốc thử Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit đều yêu cầu xác nhận đầy đủ cho tất cả các khía cạnh về hiệu suất với bộ kit tách chiết DNA được lựa chọn.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit không được khuyến nghị cho các mẫu FFPE chất lượng kém có $\Delta C_q > 5$. Sử dụng các mẫu có $\Delta C_q > 5$ có thể làm tăng nguy cơ thất bại trong quá trình chuẩn bị thư viện và làm giảm hiệu suất phân tích.
- Các thuốc thử Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit đã được cấu hình và thử nghiệm đối với đầu vào mẫu, các phản ứng làm giàu, và số thành phần được đưa ra trong bảng sau đây.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Đầu vào mẫu	Phản ứng làm giàu	Số thành phần làm giàu
Bộ kit 16 mẫu	Chất lượng thấp (FFPE)	16 phản ứng	1 thành phần
Bộ kit 96 mẫu	Chất lượng cao (ví dụ: máu toàn phần)	8 phản ứng	12 thành phần

- Việc xử lý đầu vào FFPE đã được thử nghiệm và được khuyến nghị dành riêng cho các phản ứng làm giàu 1 thành phần khi sử dụng bộ kit 16 mẫu.
- Đối với bộ kit 96 mẫu, có thể xảy ra các trường hợp số thành phần không tiêu chuẩn (2 thành phần đến 11 thành phần), nhưng có các hạn chế sau:
 - Việc xử lý các mẫu trong các phản ứng làm giàu 2 thành phần đến 11 thành phần làm giảm thông lượng của bộ kit.
 - Không đảm bảo đạt được kết quả tối ưu. Để đạt được năng suất làm giàu phù hợp cho các trường hợp số thành phần không tiêu chuẩn có thể yêu cầu tối ưu hóa bổ sung.
 - Đối với các chiến lược gộp nhóm số thành phần thấp (2 thành phần đến 8 thành phần), việc chọn các adapter chỉ thị với các trình tự đa dạng là cần thiết để tối ưu hóa cân bằng màu sắc để giải trình tự và phân tích dữ liệu thành công. Mô-đun DNA GenerateFASTQ Dx trên MiSeqDx và NextSeq 550Dx cung cấp các tùy chọn cho các tổ hợp chỉ thị được cân bằng màu trong quá trình thiết lập lần chạy. Để biết thêm thông tin về các chiến lược gộp nhóm, hãy tham khảo [Phương pháp gộp nhóm trên trang 33](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit bị hạn chế trong việc cung cấp các thư viện đã được làm giàu được giải trình tự trên MiSeqDx, NextSeq 550Dx và NovaSeq 6000Dx. Việc sử dụng các hệ thống giải trình tự khác đòi hỏi phải xác nhận đầy đủ cho tất cả các khía cạnh về hiệu suất.
- Các bảng làm giàu không được bao gồm như một phần của sản phẩm này. Các kết quả xét nghiệm phân tích được cung cấp trong [Đặc điểm hiệu suất trên trang 56](#) đã được lấy với các bảng làm giàu đại diện và chỉ được cung cấp cho mục đích thông tin. Các đặc tính hiệu suất phân tích phục vụ mục đích minh họa các khả năng chung của xét nghiệm và không thiết lập các khả năng hoặc tính phù hợp liên quan đến bất kỳ tuyên bố xét nghiệm cụ thể nào. Tất cả các xét nghiệm chẩn đoán được phát triển để sử dụng với các thuốc thử này yêu cầu xác nhận đầy đủ cho tất cả các khía cạnh về hiệu suất.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tương thích với cả Illumina và các bảng làm giàu của bên thứ ba. Tuy nhiên, hiệu suất với các bảng làm giàu của bên thứ ba không đáp ứng các yêu cầu về bảng là không được đảm bảo. Để biết thông tin về các yêu cầu về bảng xét nghiệm, hãy tham khảo [Các yêu cầu về bảng mẫu dò làm giàu trên trang 10](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sử dụng thời gian tạo thể lai 2 giờ. Sử dụng thời gian tạo thể lai dài hơn có thể ảnh hưởng đến các số liệu hiệu suất.
- Các mô-đun DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager cho MiSeqDx chỉ cung cấp các tệp FASTQ. Nếu bạn đang sử dụng các mô-đun này, bạn phải thực hiện xác nhận phân tích phụ.

- Ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx có sẵn trên NextSeq 550Dx với Máy chủ DRAGEN và NovaSeq 6000Dx. Ứng dụng này hỗ trợ nhiều quy trình phân tích phụ, bao gồm tạo FASTQ, tạo FASTQ và VCF để phát hiện biến thể dòng mầm và tạo FASTQ và VCF để phát hiện biến thể soma. Nếu bạn đang sử dụng ứng dụng để tạo VCF, bạn không cần thực hiện xác nhận phân tích phụ. Các giới hạn của ứng dụng này bao gồm:
 - Các vùng chèn có chiều dài > 18 bp và các vùng xóa có chiều dài > 21 bp chưa được xác nhận.
 - Biến thể lớn, bao gồm các biến thể đa nucleotide (MNV) và các indel lớn, có thể được báo cáo là các biến thể nhỏ hơn riêng biệt trong tệp VCF đầu ra.
 - Các MNV nhỏ được báo cáo là các biến thể riêng biệt trong tệp VCF đầu ra.
 - Các vùng xóa được báo cáo trong tệp VCF tại tọa độ của base nằm trước theo định dạng VCF. Do đó, hãy xem xét các biến thể liền kề trước khi báo cáo một phát hiện base riêng lẻ là tham chiếu đồng hợp tử.
 - Các giới hạn dành riêng cho dòng mầm:
 - Quy trình phân tích tạo FASTQ và VCF dòng mầm của Ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx được thiết kế để cung cấp kết quả định tính cho việc phát hiện biến thể dòng mầm (ví dụ: đồng hợp tử, dị hợp tử, thể đại).
 - Sự thay đổi số lượng bản sao có thể ảnh hưởng đến việc xác định một biến thể là đồng hợp tử hay dị hợp tử.
 - Hệ thống sẽ không báo cáo nhiều hơn hai biến thể tại một vị trí duy nhất, ngay cả khi có sự thay đổi số bản sao.
 - Các giới hạn dành riêng cho soma:
 - Quy trình phân tích tạo FASTQ và VCF soma của Ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx được thiết kế để cung cấp kết quả định tính cho việc phát hiện biến thể soma (tức là sự hiện diện của biến thể soma).
 - Quy trình phân tích tạo FASTQ và VCF soma không thể phân biệt giữa các biến thể dòng mầm và soma. Quy trình này được thiết kế để phát hiện các biến thể trên một loạt các tần số biến thể, nhưng không thể sử dụng tần số biến thể để phân biệt các biến thể soma với các biến thể dòng mầm.
 - Mô bình thường trong mẫu xét nghiệm ảnh hưởng đến việc phát hiện các biến thể. Giới hạn phát hiện được báo cáo dựa trên tần số biến thể liên quan đến tổng số DNA tách chiết từ cả mô khối u và mô bình thường.
 - Nếu có nhiều hơn một alen biến thể được phát hiện ở cùng một lô-cut, không có alen nào sẽ được báo cáo là biến thể đạt. Thay vào đó, toàn bộ các alen sẽ được báo cáo nhưng được lọc qua thể đa alen.

Thành phần sản phẩm

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit gồm có các thành phần sau:

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx với UD Indexes Set A, danh mục số 20051354 (16 mẫu), hoặc 20051352 (96 mẫu)

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx với UD Indexes Set B, danh mục số 20051355 (16 mẫu), hoặc 20051353 (96 mẫu)
- Mô-đun Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx cho MiSeqDx, danh mục số 20063022
- Ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx cho NovaSeq 6000Dx, danh mục số 20074609
- Ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx cho NextSeq 550Dx, danh mục số 20074730

Các thuốc thử được cung cấp

Việc hoàn thành Illumina DNA Prep with Enrichment Dx yêu cầu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx với UD Indexes Set A hoặc Illumina DNA Prep with Enrichment Dx với UD Indexes Set B. Bạn có thể thực hiện việc chuẩn bị và các phản ứng làm giàu thư viện sau đây bằng cách sử dụng bộ kit 16 mẫu hoặc 96 mẫu.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Đầu vào mẫu	Phản ứng làm giàu	Số thành phần làm giàu
Bộ kit 16 mẫu	Chất lượng thấp (FFPE)	16 phản ứng	1 thành phần
Bộ kit 96 mẫu	Chất lượng cao (ví dụ: máu toàn phần)	8 phản ứng	12 thành phần

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

Thuốc thử Illumina Prep Dx Tagmentation 1, Bảo quản ở 15°C đến 30°C

Các thuốc thử sau được vận chuyển ở nhiệt độ phòng. Nhanh chóng bảo quản các thuốc thử ở nhiệt độ lưu trữ đã chỉ định để đảm bảo hiệu suất thích hợp.

Tên thuốc thử	Số lượng ống		Màu nắp	Thể tích đóng gói	Thành phần hoạt tính
	16 mẫu (số 20050020)	96 mẫu (số 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Đỏ	350 µl	Dung dịch chất tẩy trong nước.
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Xanh lục	41 ml	Dung dịch nước có đệm, chứa chất tẩy và muối.
Cleanup Beads (CB)	1	N/A*	Đỏ	10 ml	Hạt thuận từ pha rắn trong dung dịch nước có đệm.

* Cleanup Beads cho 96 mẫu được bao gồm trong Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 mẫu (số 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 mẫu), bảo quản ở 15°C đến 30°C

Đối với bộ kit 96 mẫu, Cleanup Beads được cung cấp trong Illumina Prep Dx Cleanup Beads (danh mục số 20050030). Thuốc thử sau đây được vận chuyển ở nhiệt độ phòng. Nhanh chóng bảo quản các thuốc thử ở nhiệt độ lưu trữ đã chỉ định để đảm bảo hiệu suất thích hợp. Đối với 16 bộ kit mẫu, Cleanup Beads được bao gồm trong Thuốc thử Illumina Prep Dx Tagmentation 1 (danh mục số 20050020).

Tên thuốc thử	Số lượng	Màu nắp	Thể tích đóng gói	Thành phần hoạt tính
Cleanup Beads (CB)	4	Đỏ	10 ml	Hạt thuận từ pha rắn trong dung dịch nước có đệm.

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, Bảo quản ở 2°C đến 8°C

Các thuốc thử sau đây được vận chuyển trong điều kiện làm lạnh. Nhanh chóng bảo quản các thuốc thử ở nhiệt độ lưu trữ đã chỉ định để đảm bảo hiệu suất thích hợp. Đặt ống dung dịch gốc eBLTS ở vị trí thẳng đứng để các hạt luôn ngập trong dung dịch đệm.

Tên thuốc thử	Số lượng ống		Màu nắp	Thể tích đóng gói		Thành phần hoạt tính
	16 mẫu (số 20050021)	96 mẫu (số 20050026)		16 mẫu	96 mẫu	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Vàng	200 μ l	290 μ l	Streptavidin Magnetic Beads được liên kết với transposome trong dung dịch nước đệm có chứa glycerol, EDTA, dithiothreitol, muối và chất tẩy.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Trong suốt	1,8 ml	1,8 ml	Dung dịch nước có đệm.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, Bảo quản ở -25°C đến -15°C

Các thuốc thử sau đây được vận chuyển đông lạnh. Nhanh chóng bảo quản các thuốc thử ở nhiệt độ lưu trữ đã chỉ định để đảm bảo hiệu suất thích hợp.

Tên thuốc thử	Số lượng ống		Màu nắp	Thể tích đóng gói		Thành phần hoạt tính
	16 mẫu (số 20050022)	96 mẫu (số 20050027)		16 mẫu	96 mẫu	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Trong suốt	290 μ l	290 μ l	Dung dịch nước có đệm chứa muối magiê và dimethylformamide.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Trong suốt	200 μ l	610 μ l	DNA polymerase và dNTP trong dung dịch nước có đệm.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 mẫu), Bảo quản ở 2°C đến 8°C

Đối với các bộ kit 16 mẫu, các thuốc thử sau được bao gồm trong Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (danh mục số 20050023). Đối với bộ kit 96 mẫu, các thuốc thử được bao gồm trong Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (danh mục số 20050028).

Các thuốc thử sau đây được vận chuyển trong điều kiện làm lạnh. Nhanh chóng bảo quản các thuốc thử ở nhiệt độ lưu trữ đã chỉ định để đảm bảo hiệu suất thích hợp.

Tên thuốc thử	Số lượng ống	Màu nắp	Thể tích đóng gói	Thành phần hoạt tính
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Trong suốt	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads trong dung dịch nước có đệm có chứa formamide, chất tẩy và muối.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Trong suốt	1,8 ml	Dung dịch nước có đệm.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Trong suốt	200 µl	Dung dịch nước có đệm, chứa chất tẩy và muối.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Trong suốt	200 µl	Dung dịch nước có đệm.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 mẫu), bảo quản ở 2°C đến 8°C

Đối với bộ kit 96 mẫu, các thuốc thử sau đây được bao gồm trong Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (danh mục số 20050028). Đối với bộ kit 16 mẫu, các thuốc thử được bao gồm trong Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (danh mục số 20050023).

Các thuốc thử sau đây được vận chuyển trong điều kiện làm lạnh. Nhanh chóng bảo quản các thuốc thử ở nhiệt độ lưu trữ đã chỉ định để đảm bảo hiệu suất thích hợp.

Tên thuốc thử	Số lượng ống	Màu nắp	Thể tích đóng gói	Thành phần hoạt tính
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Trong suốt	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads trong dung dịch nước có đệm có chứa formamide, chất tẩy và muối.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Trong suốt	1,8 ml	Dung dịch nước có đệm.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Trong suốt	200 µl	Dung dịch nước có đệm, chứa chất tẩy và muối.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Trong suốt	200 µl	Dung dịch nước có đệm.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, Bảo quản ở -25°C đến -15°C

Các thuốc thử sau đây được vận chuyển đông lạnh. Nhanh chóng bảo quản các thuốc thử ở nhiệt độ lưu trữ đã chỉ định để đảm bảo hiệu suất thích hợp.

Tên thuốc thử	Số lượng ống		Màu nắp	Thể tích đóng gói	Thành phần hoạt tính
	16 mẫu (số 20050024)	96 mẫu (số 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Trong suốt	580 µl	Dung dịch chất tẩy trong nước.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Hồ phách	4,1 ml	Dung dịch nước có đệm, chứa chất tẩy và muối.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Trong suốt	320 µl	Hỗn hợp PCR primers (oligonucleotides).
NaOH 2N (HP3)	1	1	Trong suốt	200 µl	Dung dịch natri hydroxit (NaOH) 2N.
Dung dịch đệm HYB số 2 + chất chặn IDT NXT (NHB2)	2	1	Xanh lam	480 µl	Dung dịch nước có đệm chứa Cot-1 DNA, tác nhân tạo mật độ và formamide
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Trong suốt	200 µl	DNA polymerase và dNTP trong dung dịch nước có đệm.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, Bảo quản ở -25°C đến -15°C

Các thuốc thử sau đây được vận chuyển đông lạnh. Nhanh chóng bảo quản các thuốc thử ở nhiệt độ lưu trữ đã chỉ định để đảm bảo hiệu suất thích hợp. Để biết các trình tự adapter chỉ thị, tham khảo [Phụ lục: Illumina UD Indexes Adapter Sequences](#) trên trang 61.

Thành phần	Số lượng
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 chỉ thị), số 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 chỉ thị), số 20050039	1

Các thuốc thử không được cung cấp

Các thuốc thử cần tự chuẩn bị chứ không được cung cấp

- Thuốc thử tách chiết và tinh sạch DNA
- Thuốc thử định lượng DNA
- Ethanol, 200 proof cho sinh học phân tử
- Nước không chứa nuclease
- Tris-HCl 10 mM, pH 8,5
- Dung dịch NaOH 1N, cấp độ sinh học phân tử
- Nếu sử dụng NextSeq 550Dx Sequencing System:
 - Tris 200 mM, pH 7,0 (có thể pha loãng từ Tris-HCl 1M, pH 7,0)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 chu kỳ) (danh mục số 20028871)
- Nếu sử dụng hệ thống giải trình tự MiSeqDx:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (danh mục số 20037124)
- Nếu sử dụng hệ thống giải trình tự NovaSeq 6000Dx:
 - Tris 400 mM, pH 8,0 (có thể pha loãng từ Tris-HCl 1M, pH 8,0)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 chu kỳ) (danh mục số 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 chu kỳ) (danh mục số 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (danh mục số 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (danh mục số 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (danh mục số 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (danh mục số 20062291)

Các yêu cầu về bảng mẫu dò làm giàu

Thuốc thử Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tương thích với cả Illumina và các bảng oligonucleotide DNA làm giàu của bên thứ ba. Nếu sử dụng mẫu dò DNA được biotin hóa của bên thứ ba (bảng cố định hoặc tùy chỉnh), hãy đảm bảo rằng chúng đáp ứng các thông số kỹ thuật cần thiết.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit đã được tối ưu hóa và xác nhận bằng cách sử dụng các thông số kỹ thuật bảng bên thứ ba sau đây. Hiệu suất tương đương không được đảm bảo khi sử dụng bảng của bên thứ ba không đáp ứng các thông số kỹ thuật.

- Chiều dài mẫu dò 80 bp hoặc 120 bp
- Từ 500 đến 675.000 mẫu dò
- DNA sợi đơn hoặc sợi kép
- Tổng mẫu dò đầu vào ≥ 3 pmol đối với làm giàu ở số thành phần từ 1 đến 12 thành phần

Bảo quản và xử lý

- Nhiệt độ phòng là khoảng nhiệt độ từ 15°C đến 30°C.
- Thuốc thử ổn định khi được bảo quản theo chỉ định đến ngày hết hạn đã ghi trên nhãn bộ kit. Để biết nhiệt độ bảo quản, hãy tham khảo mục [Các thuốc thử được cung cấp trên trang 5](#).
- Các thuốc thử đông lạnh ổn định tối đa qua bốn chu kỳ đông-rã đông trước ngày hết hạn ghi trên nhãn.
- Quy trình Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit bao gồm các điểm dừng an toàn sau:
 - Sau bước [Khuếch đại DNA được cắt nối trên trang 28](#), các thư viện đã khuếch đại sẽ ổn định trong tối đa 30 ngày khi được bảo quản ở -25°C đến -15°C.
 - Sau bước [Làm sạch thư viện trên trang 30](#), thư viện được khuếch đại đã làm sạch sẽ ổn định đến 30 ngày khi bảo quản ở -25°C đến -15°C.
 - Sau bước [Gộp nhóm các thư viện trước làm giàu trên trang 32](#), thư viện đã gộp nhóm ổn định đến 30 ngày khi bảo quản ở -25°C đến -15°C.
 - Sau bước [Khuếch đại thư viện đã được làm giàu trên trang 43](#), đĩa thư viện đã làm giàu và khuếch đại có thể để trên máy luân nhiệt tối đa 24 giờ. Ngoài ra, có thể bảo quản ở 2°C đến 8°C trong tối đa 48 giờ.
 - Thư viện cuối cùng đã làm sạch ổn định đến 7 ngày khi bảo quản ở -25°C đến -15°C.
- Nếu bao bì hoặc thành phần của Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit bị hỏng hoặc ảnh hưởng, hãy liên hệ với bộ phận Dịch vụ khách hàng của Illumina.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) có thể hình thành kết tủa hoặc tinh thể nhìn thấy. Nếu xuất hiện kết tủa, hãy ủ ở 37°C trong 10 phút, sau đó trộn xoáy cho đến khi tan hết.
- Hybridization Oligos (HYB) và Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) phải được gia nhiệt sơ bộ đến cùng nhiệt độ giữ tạo thể lai, tùy theo loại mẫu và bảng mẫu dò. Thông tin chi tiết về xử lý HYB và EEW có trong mục [Lưu ý về quy trình trên trang 16](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) và HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) có thể xuất hiện tinh thể hoặc vẩn đục. Nếu quan sát thấy, hãy trộn xoáy hoặc hút nhả bằng pipet cho đến khi dung dịch trong. Đảm bảo gia nhiệt sơ bộ NHB2 trước khi pipet.
- Khi xử lý Cleanup Beads (CB), hãy tuân thủ các biện pháp thực hành tốt nhất sau:
 - Tuyệt đối không cấp đông hạt.
 - Ngay trước khi sử dụng, trộn xoáy hạt cho đến khi được tái huyền phù và màu sắc đồng nhất.
- Khi xử lý Enrichment BLT Small (eBLTS), hãy tuân thủ các biện pháp thực hành tốt nhất sau:
 - Bảo quản ống eBLTS ở tư thế thẳng đứng để các hạt luôn được ngập trong dung dịch đệm.

- Trộn xoáy eBLTS kỹ lưỡng cho đến khi các hạt được tái huyền phù. Để tránh các hạt lắng xuống trở lại, không khuyến nghị ly tâm trước khi pipet.
- Nếu các hạt bám vào thành hoặc nắp của đĩa 96 giếng, ly tâm ở $280 \times g$ trong 3 giây, sau đó dùng pipet để tái huyền phù.
- Khi xử lý đĩa adapter chỉ thị, tuân thủ các biện pháp thực hành tốt nhất sau:
 - Không thêm mẫu vào đĩa adapter chỉ thị.
 - Mỗi giếng của đĩa chỉ thị chỉ được sử dụng một lần duy nhất.

Các thiết bị và vật liệu cần tự chuẩn bị chứ không được cung cấp

Ngoài Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, hãy đảm bảo rằng bạn có các thiết bị và vật liệu cần thiết trước khi bắt đầu quy trình.

Thiết bị

Đảm bảo rằng bạn chuẩn có sẵn thiết bị cần thiết trước khi bắt đầu quy trình.

Quy trình đã được tối ưu hóa và xác nhận bằng cách sử dụng các mục với thông số kỹ thuật được liệt kê. Hiệu suất tương đương không được đảm bảo khi sử dụng thiết bị nằm ngoài thông số kỹ thuật.

Một số vật liệu chỉ cần cho các quy trình cụ thể. Những vật liệu này sẽ được liệt kê trong các bảng riêng.

- Máy luân nhiệt có thông số kỹ thuật như sau:
 - Nắp đã gia nhiệt
 - Phạm vi kiểm soát nhiệt độ tối thiểu từ 10°C đến 98°C
 - Độ chính xác nhiệt độ tối thiểu $\pm 0,25^{\circ}\text{C}$
 - Thể tích phản ứng tối đa $100 \mu\text{l}$
 - Tương thích với đĩa PCR 96 giếng, gờ đầy đủ
- Máy ủ vi mẫu với các thông số kỹ thuật sau:
 - Khoảng nhiệt độ môi trường $+5,0^{\circ}\text{C}$ đến $99,0^{\circ}\text{C}$
 - Tương thích với các đĩa MIDI 96 giếng
- Vòng đệm máy ủ vi mẫu tương thích với các đĩa MIDI 96 giếng
- Máy lắc vi đĩa tốc độ cao với phạm vi tốc độ trộn từ 200–3000 vòng/phút
- Giá từ tính tương thích với các đĩa PCR 96 giếng
- Giá từ tính tương thích với các đĩa MIDI 96 giếng
- Máy đo huỳnh quang tương thích với phương pháp định lượng của bạn
- Máy phân tích đoạn DNA

- Pipet chính xác:
 - Pipet một kênh và đa kênh 10 µl
 - Pipet một kênh và đa kênh 20 µl
 - Pipet một kênh và đa kênh 200 µl
 - Pipet đơn kênh 1000 µl
 - Pipet chính xác đảm bảo phân phối thuốc thử và mẫu chính xác. Có thể sử dụng pipet một kênh hoặc đa kênh nếu pipet được hiệu chuẩn thường xuyên và có độ chính xác trong khoảng 5% thể tích đã nêu.
- Máy ly tâm vi đĩa
- Ống ly tâm nhỏ
- Một trong các hệ thống giải trình tự Illumina sau:
 - Thiết bị MiSeqDx, danh mục số DX-410-1001
 - Thiết bị NextSeq 550Dx, danh mục số 20005715 với tùy chọn Máy chủ Illumina DRAGEN cho NextSeq 550Dx, danh mục số 20086130
 - Thiết bị NovaSeq 6000Dx, danh mục số 20068232
- **[Tùy chọn]** Máy cô quay chân không
- **[FFPE]** Hệ thống phát hiện PCR thời gian thực

Vật liệu

Hãy đảm bảo rằng bạn có đầy đủ các vật liệu cần thiết trước khi bắt đầu quy trình.

Một số vật liệu chỉ cần cho các quy trình cụ thể Những vật liệu này sẽ được liệt kê trong các bảng riêng.

Quy trình đã được tối ưu hóa và xác nhận bằng các vật liệu dưới đây. Hiệu suất tương đương không được đảm bảo nếu sử dụng vật liệu thay thế.

- Đầu pipet có lọc
- Ống ly tâm hình nón, 15ml hoặc 50ml
- Ống ly tâm nhỏ 1,5 ml
- Khay chứa thuốc thử dùng cho pipet đa kênh, dùng một lần, không chứa RNase/DNase
- Dải 8 ống và nắp, không chứa RNase/DNase
- Pipet huyết thanh
- Đĩa lưu trữ sâu 96 giếng polypropylene, 0,8 ml (đĩa MIDI)
- Đĩa PCR 96 giếng Hard-Shell, có viền đầy đủ
- **[FFPE]** Đĩa qPCR tương thích với thiết bị qPCR
- Miếng dán niêm phong kín cho đĩa 96 giếng với các đặc điểm sau:
 - Có thể bóc, làm từ polyester trong suốt quang học
 - Phù hợp cho đĩa PCR có viền

- Keo dán mạnh, chịu được nhiều lần thay đổi nhiệt độ từ -40°C đến 110°C
- Không chứa DNase/RNase
- Vật tư tiêu hao bằng nhựa tương thích với phương pháp định lượng được lựa chọn
- Bộ kit định lượng dsDNA bằng huỳnh quang tương thích với hệ thống định lượng đã chọn:
 - Để định lượng các thư viện đã khuếch đại trước làm giàu, có thể sử dụng bộ kit định lượng phạm vi rộng.
 - Đối với việc định lượng thư viện đã làm giàu, phạm vi của bộ kit định lượng phụ thuộc vào bảng mẫu dò được sử dụng.
- Bộ kit phân tích mảnh để đánh giá chất lượng thư viện với hệ thống đánh giá đã chọn:
 - Để định lượng các thư viện đã khuếch đại trước làm giàu, có thể sử dụng một bộ kit phạm vi rộng.
 - Đối với việc đánh giá thư viện đã làm giàu, phạm vi của bộ kit đánh giá phụ thuộc vào bảng mẫu dò được sử dụng.
- **[Tùy chọn]** Bộ kit tách chiết DNA từ tế bào và mô người. Có thể sử dụng bất kỳ phương pháp tách chiết nào đã được xác nhận.

Thu thập, vận chuyển và bảo quản mẫu xét nghiệm



THẬN TRỌNG

Xử lý tất cả mẫu xét nghiệm như thể đó là tác nhân có khả năng lây nhiễm.

- Xét nghiệm này tương thích với DNA hệ gen có nguồn gốc từ tế bào và mô người.
- Đối với gDNA tinh sạch thương mại, cần đảm bảo rằng mẫu đã được vận chuyển trong điều kiện thích hợp và được bảo quản theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thực hiện các thực hành tốt nhất về bảo quản và chu kỳ đông-rã đông của gDNA.
- Đối với mẫu máu toàn phần, tuân thủ các yêu cầu về thu thập, vận chuyển và bảo quản máu phù hợp với phương pháp tách chiết DNA được lựa chọn. Có thể sử dụng bất kỳ phương pháp tách chiết đã xác thực nào. Việc vận chuyển máu toàn phần phải tuân thủ các quy định của quốc gia, liên bang, tiểu bang và địa phương về hoạt động vận chuyển các tác nhân gây bệnh.
- Đối với tách chiết DNA từ mô FFPE, có thể sử dụng bất kỳ phương pháp tách chiết đã được xác nhận nào. Tuân thủ hướng dẫn và khuyến nghị của phương pháp tách chiết được lựa chọn để xác định các thực hành sau:
 - Phương pháp cố định bằng formalin và đúc paraffin cho mô, nhằm đảm bảo chất lượng DNA tách chiết tốt nhất.
 - Bảo quản mẫu FFPE.
 - Yêu cầu về vật liệu đầu vào, chẳng hạn như số lượng và độ dày của các lát cắt FFPE. Hầu hết các phương pháp tinh sạch khuyến nghị sử dụng các lát cắt mới được cắt.

Cảnh báo và biện pháp phòng ngừa

- Các hóa chất trong thuốc thử Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit có thể gây nguy hiểm. Có thể xảy ra thương tích cá nhân nếu hít phải, nuốt phải, tiếp xúc với da và mắt. Mang thiết bị bảo hộ, bao gồm bảo vệ mắt, găng tay và áo choàng phòng thí nghiệm tương ứng với các nguy cơ phơi nhiễm. Xử lý thuốc thử đã sử dụng như chất thải hóa học và thải bỏ theo các luật và quy định hiện hành của địa phương, quốc gia và khu vực. Để biết thêm thông tin về môi trường, sức khỏe và an toàn, hãy tham khảo Bảng dữ liệu an toàn (SDS) tại địa chỉ support.illumina.com/sds.html.
- Báo cáo ngay mọi sự cố nghiêm trọng liên quan đến sản phẩm này cho Illumina và Cơ quan có thẩm quyền của các quốc gia thành viên nơi người dùng và bệnh nhân cư trú.
- Xử lý tất cả các mẫu xét nghiệm máu như thể các mẫu đó được biết là có khả năng lây nhiễm Vi-rút suy giảm miễn dịch ở người (HIV), Vi-rút viêm gan B ở người (HBV) và các mầm bệnh lây qua đường máu khác (các biện pháp phòng ngừa chung).
- Sử dụng các biện pháp phòng ngừa thường quy của phòng thí nghiệm. Không dùng pipet bằng miệng. Không ăn uống hoặc hút thuốc trong khu vực làm việc được chỉ định. Đeo găng tay và mặc áo khoác phòng thí nghiệm dùng một lần khi xử lý các mẫu xét nghiệm và thuốc thử trong bộ kit. Rửa tay kỹ càng sau khi xử lý các mẫu xét nghiệm và thuốc thử trong bộ kit.
- Để ngăn ngừa sự suy giảm của mẫu hoặc thuốc thử, hãy đảm bảo rằng tất cả hơi natri hypoclorit từ quá trình làm sạch đã bay hơi hoàn toàn trước khi bắt đầu quy trình.
- Nhiễm chéo mẫu với các sản phẩm PCR/amplicon khác có thể gây kết quả không chính xác và không đáng tin cậy. Để tránh nhiễm chéo, hãy áp dụng các biện pháp thực hành tốt nhất sau:
 - Thực hiện đúng quy trình và vệ sinh phòng thí nghiệm.
 - Thực hiện các bước quy trình trong khu vực tiền khuếch đại hoặc hậu khuếch đại được chỉ định.
 - Bảo quản thuốc thử đã dùng trước khi làm sạch thư viện trong khu vực tiền khuếch đại.
 - Tách biệt thuốc thử tiền khuếch đại và hậu khuếch đại.
 - Đảm bảo khu vực tiền khuếch đại và hậu khuếch đại có thiết bị riêng biệt, như pipet, đầu pipet, máy lắc vortex và máy ly tâm.
- Tránh nhiễm bẩn chéo. Sử dụng đầu pipet mới giữa các mẫu và giữa các lần phân phối thuốc thử. Việc dùng đầu lọc giúp giảm nguy cơ mang theo amplicon và nhiễm chéo giữa các mẫu.
 - Khi thêm hoặc chuyển mẫu hay hỗn hợp tổng thể thuốc thử, cần thay đầu pipet giữa mỗi mẫu.
 - Khi thêm adapter chỉ thị bằng pipet đa kênh, thay đầu pipet giữa mỗi hàng hoặc mỗi cột. Nếu sử dụng pipet đơn kênh, thay đầu pipet giữa mỗi mẫu.
 - Loại bỏ các đĩa adapter chỉ thị chưa dùng khỏi khu vực làm việc.
- Sử dụng thực hành tốt cho bước rửa ethanol như sau:
 - Luôn chuẩn bị ethanol 80% mới. Ethanol có thể hút nước từ không khí, ảnh hưởng đến kết quả.
 - Đảm bảo loại bỏ hết ethanol ở đáy giếng trong bước rửa. Ethanol dư có thể ảnh hưởng đến kết quả.

- Tuân thủ thời gian sấy khô quy định trong bước giá đỡ từ để đảm bảo bay hơi hoàn toàn. Ethanol tồn dư có thể ảnh hưởng đến hiệu suất của các phản ứng tiếp theo.
- Luôn chuẩn bị hỗn hợp tổng thể ngay trước khi sử dụng và không lưu trữ dung dịch đã pha.
- Hiệu suất của Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit không được đảm bảo nếu quy trình không được tuân thủ như hướng dẫn trong tờ hướng dẫn đi kèm.
- Không sử dụng bất kỳ thành phần nào của bộ kit sau ngày hết hạn ghi trên nhãn.
- Không được hoán đổi các thành phần của bộ kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx khác nhau. Các bộ kit được nhận diện dựa trên nhãn của kit.

Lưu ý về quy trình

Khuyến nghị về lượng DNA đầu vào

Quy trình Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tương thích với DNA hệ gen (gDNA) sợi kép chất lượng cao trong khoảng 50–1000 ng.

Đảm bảo mẫu gDNA ban đầu không chứa > 1 mM EDTA và không có các chất hữu cơ gây nhiễu như phenol hoặc ethanol. Những chất này có thể cản trở phản ứng cắt nối và dẫn đến thất bại của xét nghiệm.

gDNA đầu vào ≥ 50 ng

Với lượng gDNA từ 50–1000 ng, không cần định lượng và chuẩn hóa mẫu gDNA ban đầu.

gDNA đầu vào < 50 ng

Có thể sử dụng lượng gDNA từ 10–50 ng, với các điều chỉnh sau:

- Nếu dùng 10–49 ng gDNA, khuyến nghị định lượng mẫu gDNA ban đầu để xác định số chu kỳ PCR cần thiết sau cắt nối. Sử dụng phương pháp định lượng dựa trên huỳnh quang để đo gDNA sợi kép. Tránh các phương pháp đo tổng axit nucleic như NanoDrop hoặc các phương pháp hấp thụ UV khác.
- Quy trình này không chuẩn hóa lượng thư viện trước làm giàu từ gDNA 10–49 ng, do đó cần định lượng và chuẩn hóa thư viện trước và sau khi làm giàu.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit đã được đặc trưng và xác minh cho lượng gDNA từ 50–1000 ng. Hiệu suất sản phẩm tương đương không được đảm bảo với gDNA < 50 ng.

Khuyến nghị về máu đầu vào

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tương thích với gDNA được tách chiết từ máu toàn phần ngoại vi. Có thể sử dụng bất kỳ phương pháp tách chiết đã xác thực nào. Khi tách chiết gDNA từ máu toàn phần, không cần định lượng ban đầu DNA đầu vào và Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tạo ra lượng thư viện đã được chuẩn hóa trước làm giàu.

Các yếu tố sau đây có thể ảnh hưởng xấu đến lượng DNA thu được từ các mẫu máu toàn phần và do đó đến việc chuẩn hóa thư viện:

- Tuổi của mẫu máu
- Điều kiện bảo quản
- Các tình trạng bệnh lý tiềm ẩn ảnh hưởng đến số lượng bạch cầu

Các khuyến nghị về đầu vào mẫu mô FFPE

Sử dụng các tiêu chí chất lượng DNA FFPE sau đây để xác định đầu vào thích hợp để chuẩn bị thư viện thành công:

- Đối với các mẫu FFPE có giá trị $\Delta Cq \leq 5$, đầu vào DNA được khuyến nghị là 50–1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx không được khuyến nghị cho các mẫu FFPE chất lượng kém có $\Delta Cq > 5$. Sử dụng các mẫu có $\Delta Cq > 5$ là có thể, nhưng có thể làm tăng khả năng thất bại trong chuẩn bị thư viện hoặc làm giảm hiệu suất phân tích.

Tách chiết FFPE

Sử dụng phương pháp phân lập axit nucleic tạo ra năng suất thu hồi cao, giảm thiểu tiêu thụ mẫu và bảo toàn tính toàn vẹn của mẫu. Bạn có thể sử dụng bất kỳ phương pháp đã được phê chuẩn nào để tách chiết DNA từ các mẫu FFPE. Đối với gDNA được tách chiết từ mô FFPE, cần định lượng ban đầu DNA đầu vào và Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit không tạo ra lượng thư viện trước làm giàu được chuẩn hóa.

Đánh giá DNA FFPE

gDNA được tách từ mô FFPE phải được thẩm định chất lượng trước khi sử dụng. Để đạt hiệu suất tối ưu, hãy đánh giá chất lượng mẫu DNA bằng cách sử dụng phương pháp tách chiết đã được phê chuẩn để đánh giá chất lượng DNA được tách chiết từ các mẫu FFPE. Quy trình Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tương thích với các mẫu DNA FFPE có giá trị $\Delta Cq \leq 5$. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit không được khuyến nghị cho các mẫu FFPE chất lượng kém có $\Delta Cq > 5$. Sử dụng các mẫu có $\Delta Cq > 5$ là có thể, nhưng có thể làm tăng khả năng thất bại trong chuẩn bị thư viện hoặc làm giảm hiệu suất phân tích.

[Tùy chọn] Mẫu tham chiếu FFPE

Sử dụng các vật liệu tham chiếu đặc trưng như Horizon HD799 (DNA) làm đối chứng dương khi thực hiện quy trình. Các vật liệu FFPE đủ điều kiện từ các mô ghép ngoại lai có nguồn gốc từ dòng tế bào cũng có thể được sử dụng làm mẫu tham chiếu. Sử dụng phương pháp dựa trên huỳnh quang để định lượng các vật liệu tham chiếu trước khi sử dụng.

LƯU Ý Việc chạy mẫu tham chiếu đối chứng dương hoặc chứng không có khuôn sẽ tốn thuốc thử và làm giảm tổng số mẫu không xác định có thể xử lý.

Khuyến nghị về đầu vào mẫu

Các khuyến nghị về đầu vào mẫu cho Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit được tóm tắt trong bảng sau.

Bảng 1 Khuyến nghị về đầu vào mẫu

Loại đầu vào mẫu	Lượng đầu vào mẫu	Định lượng DNA đầu vào được yêu cầu	Chất lượng đầu vào DNA được yêu cầu	Lượng thư viện trước làm giàu đã được chuẩn hóa
gDNA	10–49 ng	Có	Tỷ lệ 260/280 là 1,8–2,0	Không
gDNA	50–1000 ng	Không	Tỷ lệ 260/280 là 1,8–2,0	Có
gDNA từ máu	50–1000 ng	Không	Tỷ lệ 260/280 là 1,8–2,0	Có
gDNA từ FFPE	50–1000 ng	Có	Giá trị $\Delta Cq \leq 5$	Không

Các chu kỳ PCR được khuyến nghị cho chương trình eBLTS PCR được điều chỉnh dựa trên nồng độ và chất lượng đầu vào mẫu. Để biết thêm thông tin, hãy tham khảo [Khuếch đại DNA được cắt nối trên trang 28](#).

Mẹo và kỹ thuật

Tránh nhiễm chéo

- Khi thêm hoặc chuyển mẫu, thay đầu pipet giữa *mỗi mẫu*.
- Khi thêm adapter chỉ thị bằng pipet đa kênh, thay đầu pipet giữa *mỗi hàng* hoặc *mỗi cột*. Nếu sử dụng pipet đơn kênh, thay đầu pipet giữa *mỗi mẫu*.

Bịt kín đĩa

- Luôn bịt kín đĩa 96 giếng bằng miếng dán niêm phong mới và dùng con lăn cao su để dán kín trước khi thực hiện các bước sau trong quy trình:
 - Các bước lắc
 - Các bước ủ. Nếu không bịt kín đúng cách có thể gây bay hơi trong quá trình ủ.
 - Các bước ly tâm
 - Các bước tạo thể lai
- Đảm bảo mép và các giếng được bịt kín hoàn toàn để giảm nguy cơ nhiễm chéo và bay hơi.
 - Nếu thấy có chất lỏng hoặc hơi ngưng tụ trên miếng dán hoặc thành giếng, hãy ly tâm khi cần trước khi mở.
- Đặt đĩa lên bề mặt phẳng trước khi từ từ gỡ màng dán.

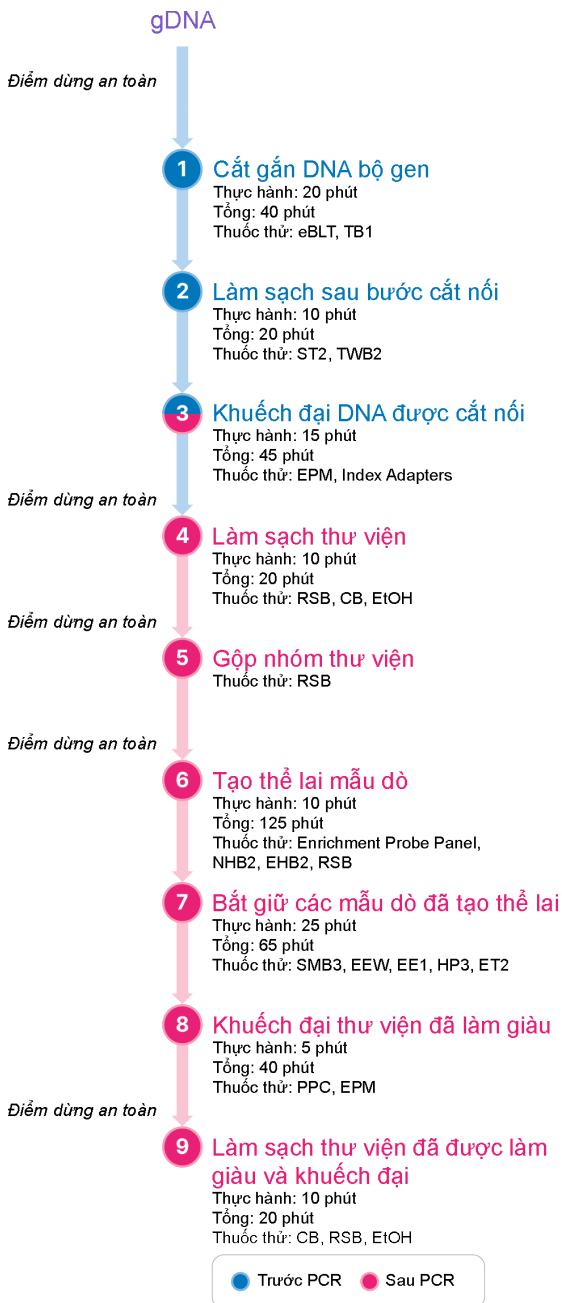
Xử lý Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Bảo quản ống gốc eBLTS thẳng đứng trong tủ lạnh để các hạt luôn được ngập trong dung dịch đệm.

- Ngay trước khi sử dụng, trộn xoáy ống gốc eBLTS thật kỹ cho đến khi các hạt được tái huyền phù. Để tránh các hạt lắng xuống trở lại, không khuyến nghị ly tâm trước khi pipet.
- Nếu các hạt bám vào thành hoặc nắp của đĩa 96 giếng, ly tâm ở 280 × g trong 3 giây, sau đó dùng pipet để tái huyền phù.
- Khi rửa eBLTS:
 - Sử dụng giá từ tính phù hợp với loại đĩa.
 - Giữ đĩa trên giá từ tính cho đến khi hướng dẫn chỉ định tháo ra.
 - Nếu các hạt bị hút vào đầu pipet, hãy nhả lại vào đĩa trên giá từ tính và chờ cho đến khi dung dịch trở nên trong (khoảng 2 phút).

Quy trình công việc Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Sơ đồ sau đây minh họa quy trình làm việc Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Các điểm dừng an toàn được đánh dấu giữa các bước. Ước tính thời gian dựa trên việc xử lý 12 mẫu ở mức làm giàu 12 thành phần.



Hướng dẫn sử dụng

Chương này mô tả quy trình Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Xem xét quy trình giải trình tự hoàn chỉnh theo kế hoạch, từ mẫu đến phân tích, để đảm bảo khả năng tương thích của sản phẩm và thông số thí nghiệm.
- Trước khi tiếp tục, hãy xác nhận bên trong bộ dụng cụ và đảm bảo rằng bạn có các thành phần cần thiết, thiết bị và vật liệu.
 - Các mẫu dò được gắn biotin của bên thứ ba phải đáp ứng các yêu cầu cụ thể. Tham khảo [Các yêu cầu về bảng mẫu dò làm giàu trên trang 10](#) để đảm bảo rằng các mẫu dò của bên thứ ba đáp ứng các yêu cầu.
- Thực hiện quy trình theo thứ tự được hiển thị, sử dụng các thông số thể tích và thông số ủ được chỉ định.
- Tiến hành ngay bước tiếp theo nếu không có một điểm dừng an toàn được chỉ định trong quy trình.
- Khi tạo hỗn hợp tổng thể, lượng dư thừa được bao gồm trong thể tích được cung cấp.
- Hãy đảm bảo sử dụng giá từ tính phù hợp với loại đĩa của bạn.

Chuẩn bị gộp nhóm

Bước này là cần thiết để đảm bảo giải trình tự thành công của các thư viện được làm giàu. Việc gộp nhóm các thư viện có thể xảy ra trước khi làm giàu và trước khi giải trình tự.

Trước khi làm giàu—Các thư viện đã khuếch đại theo chỉ thị riêng lẻ được gộp lại với nhau để làm giàu với bảng mẫu dò đã chọn. Điều này tạo ra một nhóm đa thành phần của các thư viện được làm giàu. Đối với đầu vào mẫu FFPE, việc xử lý đã được thử nghiệm và được khuyến nghị dành riêng cho các phản ứng làm giàu 1 thành phần. Đối với gDNA chất lượng cao, 12 thành phần đã được thử nghiệm, nhưng 2 thành phần đến 11 thành phần là có thể.

Trước khi giải trình tự—các thư viện đã được làm giàu 1 thành phần và/hoặc các thư viện đã được làm giàu đa thành phần được gộp lại với nhau trước khi giải trình tự. Số lượng thư viện đã được làm giàu có thể được giải trình tự phụ thuộc vào độ sâu đoạn đọc mục tiêu cho mỗi mẫu trên hệ thống giải trình tự của bạn.

Lập chỉ thị kép duy nhất

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sử dụng các chỉ thị kép duy nhất.

- Các thư viện được lập chỉ thị kép thêm các trình tự Chỉ thị 1 (i7) và Chỉ thị 2 (i5) để tạo các thư viện được gắn thẻ duy nhất.
- Các chỉ thị UD có các trình tự chỉ thị riêng biệt, không liên quan cho Đoạn đọc chỉ thị i7 và i5. Các chỉ thị có chiều dài 10 base.

Việc chọn các adapter chỉ thị với các trình tự khác nhau cho các thư viện gộp sẽ tối ưu hóa cân bằng màu cho phép giải trình tự và phân tích dữ liệu thành công. Các nhóm có số thành phần ≥ 10 thành phần vốn đã được cân

bằng màu sắc, vì vậy bạn có thể sử dụng bất kỳ tổ hợp adapter chỉ thị nào. Trong quá trình chạy giải trình tự, Mô-đun DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager cung cấp các tùy chọn cho các tổ hợp chỉ thị được cân bằng màu sắc và thông báo cho bạn nếu không có đủ sự đa dạng trong các tổ hợp chỉ thị đã chọn.

Để biết thông tin về trình tự adapter chỉ thị Illumina UD và sơ đồ bố trí đĩa, tham khảo [Phụ lục: Illumina UD Indexes Adapter Sequences](#) trên trang 61

Số thành phần làm giàu được hỗ trợ

Các thuốc thử Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit được cấu hình và thử nghiệm ở số thành phần làm giàu 1 thành phần và 12 thành phần. Mặc dù số thành phần làm giàu khác là có thể có, nhưng một số trường hợp về số thành phần đòi hỏi bổ sung các thuốc thử chuẩn bị thư viện làm giàu trước và bảng mẫu dò làm giàu.

Để đạt được năng suất làm giàu phù hợp cho các trường hợp số thành phần làm giàu không tiêu chuẩn có thể yêu cầu tối ưu hóa bổ sung. Không đảm bảo đạt được kết quả tối ưu.

- **Số thành phần làm giàu**—Số lượng các thư viện trước làm giàu (1–12) được gộp lại với nhau trong một phản ứng làm giàu để tạo thể lai với các bảng mẫu dò làm giàu. Ví dụ: kết hợp 12 thư viện trước làm giàu cùng nhau tạo ra một nhóm làm giàu 12 thành phần.
- **Phản ứng làm giàu**—Số lượng các chế phẩm phản ứng làm giàu duy nhất, bất kể số lượng thư viện trước làm giàu được gộp nhóm trên mỗi phản ứng. Ví dụ: phản ứng làm giàu đơn lẻ có thể điều chế nhóm làm giàu 1 thành phần hoặc 12 thành phần.

Để tính tổng số thư viện sau làm giàu, nhân số thành phần làm giàu trên mỗi phản ứng với số phản ứng làm giàu. Ví dụ: một phản ứng làm giàu đơn lẻ của một nhóm làm giàu 12 thành phần sẽ tạo ra một nhóm 12 thư viện sau làm giàu.

Khi gộp nhóm các thư viện trước làm giàu, các thuốc thử Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit hỗ trợ các phản ứng và số thành phần sau đây.

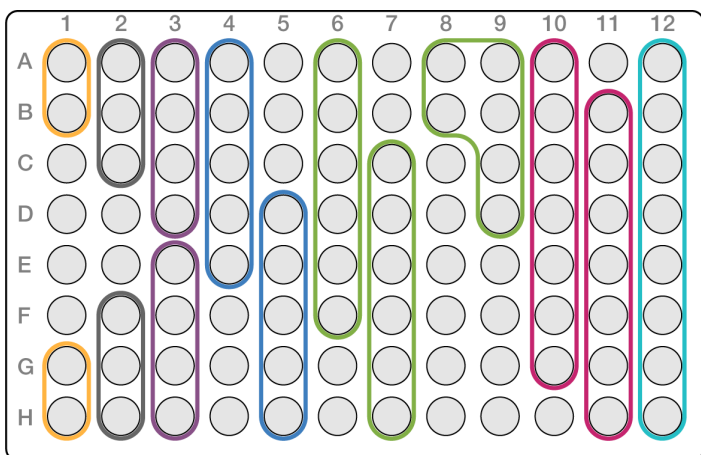
Thuốc thử Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Phản ứng làm giàu	Số thành phần làm giàu
Bộ kit 16 mẫu	16 phản ứng	1 thành phần
Bộ kit 96 mẫu	8 phản ứng	12 thành phần

Chiến lược gộp nhóm hai thành phần đến tám thành phần

Bảng sau đây cho thấy các adapter chỉ thị (giống) có thể được kết hợp trong một nhóm 2–8 thành phần, trong khi hình được mã hóa bằng màu minh họa từng tổ hợp.

Gộp nhóm bất kỳ số thành phần ≥ 2 từ trên cùng hoặc dưới cùng của một cột. Không gộp ngang hàng.

Số thành phần	Tổ hợp	Màu trong hình
2	Hai giếng đầu tiên hoặc hai giếng cuối cùng trong một cột: • A và B • G và H Các hàng C–F không được sử dụng.	Cam
3	Ba giếng đầu tiên hoặc ba giếng cuối cùng trong một cột: • A–C • F–H Các hàng D và E không được sử dụng.	Xám
4	Bốn giếng đầu tiên hoặc bốn giếng cuối cùng trong một cột: • A–D • E–H	Tím
5	Năm giếng đầu tiên hoặc năm giếng cuối cùng trong một cột: • A–E • D–H	Xanh lam
6	[Tùy chọn 1] Sáu giếng đầu tiên hoặc sáu giếng cuối cùng trong một cột: • A–F • C–H [Tùy chọn 2] Hai giếng đầu tiên (A và B) hoặc hai giếng cuối cùng (G và H) trong một cột và bất kỳ bốn giếng nào trong cột liền kề.	Xanh lục
7	Bảy giếng đầu tiên hoặc bảy giếng cuối cùng trong một cột: • A–G • B–H	Hồng
8	Toàn bộ cột.	Xanh ngọc

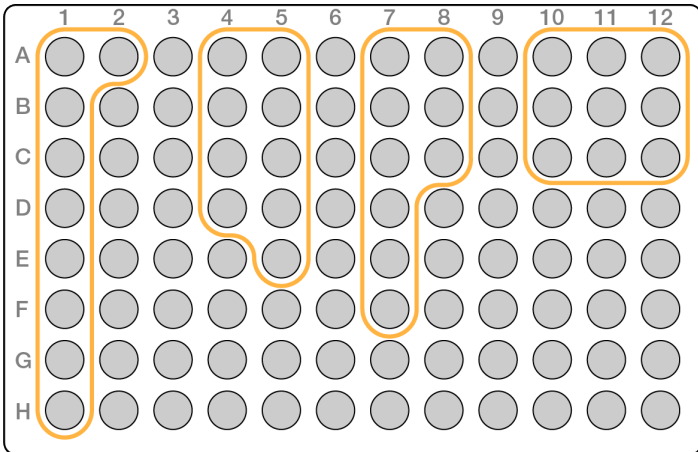


Chiến lược gộp nhóm chín thành phần

Sử dụng các adapter chỉ thị từ bất kỳ giếng nào nhằm tối ưu cân bằng màu trong một lần chạy giải trình tự, ví dụ:

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

Hình dưới đây minh họa cả bốn ví dụ.



Cắt nối DNA bộ gen

Bước này sử dụng Enrichment BLT Small (eBLTS) để cắt nối DNA, đây là quá trình phân mảnh và gắn thẻ DNA với các trình tự adapter.

Vật tư tiêu hao

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (nắp màu vàng)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nước không chứa nuclease
- Đĩa PCR 96 giếng
- Miếng dán niêm phong
- Ống ly tâm nhỏ 1,7 ml
- Dải 8 ống
- Đầu pipet
 - Pipet đa kênh 200 µl

**WARNING (CẢNH BÁO)**

Bộ thuốc thử này chứa các hóa chất độc hại tiềm ẩn. Có thể xảy ra thương tích cá nhân nếu hít phải, nuốt phải, tiếp xúc với da và mắt. Mang thiết bị bảo hộ, bao gồm bảo vệ mắt, găng tay và áo choàng phòng thí nghiệm tương ứng với các nguy cơ phơi nhiễm. Xử lý thuốc thử đã sử dụng như chất thải hóa học và thải bỏ theo các luật và quy định hiện hành của địa phương, quốc gia và khu vực. Để biết thêm thông tin về môi trường, sức khỏe và an toàn, hãy tham khảo Bảng dữ liệu an toàn (SDS) tại địa chỉ support.illumina.com/sds.html.

Giới thiệu về thuốc thử

- eBLTS phải được bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C. Không sử dụng eBLTS đã được bảo quản dưới 2°C.
- Không ly tâm eBLTS.

Chuẩn bị

- Chuẩn bị các vật tư tiêu hao sau:

Vật tư	Bảo quản	Hướng dẫn
eBLTS (nắp màu vàng)	2°C đến 8°C	Đưa về nhiệt độ phòng. Trộn xoáy ngay trước khi sử dụng để trộn. Không ly tâm trước khi pipet.
TB1	-25°C đến -15°C	Đưa về nhiệt độ phòng. Trộn xoáy để trộn đều.

- Trộn xoáy hoặc pipet DNA, sau đó ly tâm trong thời gian ngắn.
- Lưu chương trình TAG sau trên máy luân nhiệt:
 - Chọn tùy chọn gia nhiệt sơ bộ nắp và đặt ở 100°C
 - Đặt thể tích phản ứng là 50 µl
 - 55°C trong 5 phút
 - Duy trì ở 10°C

Quy trình

1. Thêm 2–30 µl DNA vào mỗi giếng của đĩa PCR 96 giếng sao cho tổng lượng DNA đầu vào đạt 50–1000 ng. Nếu thể tích DNA < 30 µl, thêm nước không chứa nuclease vào mẫu DNA để đạt tổng thể tích 30 µl.
2. Trộn xoáy eBLTS thật kỹ cho đến khi các hạt được tái huyền phù hoàn toàn.
3. Kết hợp các thể tích sau trong một ống để chuẩn bị Tagmentation Master Mix. Nhân mỗi thể tích với số lượng mẫu đang được xử lý.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Thể tích đã bao gồm phần dư của thuốc thử.
4. Pipet Tagmentation Master Mix một cách kỹ lưỡng để trộn.
5. Chia thể tích Tagmentation Master Mix đồng đều vào dải 8 ống.
6. Sử dụng ống pipet đa kênh 200 µl, chuyển 20 µl Tagmentation Master Mix vào mỗi giếng của đĩa PCR chứa mẫu. Dùng đầu pipet mới cho mỗi cột hoặc hàng mẫu.
7. Vứt bỏ dải 8 ống sau khi đã phân phối Tagmentation Master Mix.
8. Sử dụng pipet đa kênh 200 µl đặt ở 40 µl, hút nhả mỗi mẫu 10 lần để trộn. Dùng đầu pipet mới cho mỗi cột mẫu.
Hoặc, bịt kín đĩa PCR và dùng máy lắc đĩa ở tốc độ 1600 vòng/phút trong 1 phút.
9. Bịt kín đĩa, sau đó đặt vào máy luân nhiệt đã được lập trình sẵn và chạy chương trình TAG.
10. Chờ cho đến khi chương trình TAG đạt đến nhiệt độ giữ 10°C, sau đó lấy đĩa ra ngay lập tức.
11. Để đĩa PCR 96 giếng ở nhiệt độ phòng trong 2 phút, rồi tiếp tục bước tiếp theo.

Làm sạch sau bước cắt nối

Bước này rửa sạch DNA đã được gắn adapter trên eBLTS trước khi khuếch đại PCR.

Vật tư tiêu hao

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Giá từ tính cho đĩa PCR 96 giếng
- Miếng dán niêm phong
- Dải 8 ống
- Đầu pipet
 - Pipet đa kênh 20 µl
 - Pipet đa kênh 200 µl
- Chuẩn bị cho quy trình sau:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)

- Đĩa adapter chỉ thị

Giới thiệu về thuốc thử

- Hãy đảm bảo sử dụng giá từ tính phù hợp với loại đĩa của bạn. Việc sử dụng giá từ tính loại MIDI cho đĩa PCR có thể khiến TWB2 không bám vào hạt từ.
- Dùng pipet hút TWB2 chậm rãi để giảm tạo bọt, tránh hút sai thể tích và trộn không hoàn toàn.

Chuẩn bị

1. Chuẩn bị các vật tư tiêu hao sau:

Vật tư	Bảo quản	Hướng dẫn
EPM	-25°C đến -15°C	Rã đông trên đá lạnh trong 1 giờ. Lật ngược để trộn đều, sau đó ly tâm trong thời gian ngắn.
ST2	15°C đến 30°C	Nếu quan sát thấy kết tủa, hãy ủ ở 37°C trong 10 phút, sau đó trộn xoáy cho đến khi kết tủa tan hết. Sử dụng ở nhiệt độ phòng.
TWB2	15°C đến 30°C	Sử dụng ở nhiệt độ phòng.
Đĩa adapter chỉ thị	-25°C đến -15°C	Rã đông ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

Quy trình

1. Thêm 10 µl ST2 vào mỗi phản ứng cắt nối. Nếu bạn sử dụng pipet đa kênh, pipet ST2 vào một dải 8 ống, sau đó chuyển thể tích thích hợp vào đĩa PCR. Dùng đầu pipet mới cho mỗi cột hoặc hàng mẫu.
2. Sử dụng pipet 200 µl được đặt thành 50 µl, pipet từ từ mỗi giếng 10 lần để tái huyền phù các hạt. Hoặc, bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1600 vòng/phút trong 1 phút. Lặp lại nếu cần.
3. Bịt kín đĩa, sau đó ly tâm ở 280 × g trong 10 giây.
4. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
5. Đặt lên giá từ tính của đĩa PCR và đợi cho đến khi chất lỏng trong suốt (3 phút).
6. [**≤ 48 mẫu**] Rửa ba lần như sau.
 - a. Sử dụng pipet đa kênh 200 µl được đặt thành 60 µl, lấy ra và loại bỏ phần nổi trên bề mặt mà không làm xáo trộn viên hạt.
 - b. Lấy ra khỏi giá từ tính.
 - c. Ngay sau đó, từ từ thêm 100 µl TWB2 trực tiếp lên các hạt.
 - d. Pipet từ từ cho đến khi các hạt được tái huyền phù hoàn toàn. Hoặc, bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1600 vòng/phút trong 1 phút.
 - e. Nếu bị bắn tóe, giảm tốc độ ly tâm xuống còn 280 × g trong 10 giây.
 - f. Đặt lên giá từ tính của đĩa PCR và đợi cho đến khi chất lỏng trong suốt (3 phút).

Để đĩa trên giá từ tính và TWB2 trong các giếng để tránh bị khô quá mức khi thực hiện lần rửa thứ ba. Lấy ra và loại bỏ phần nổi trên bề mặt sau khi bạn đã chuẩn bị PCR Master Mix.

- g. Sử dụng pipet đa kênh 200 µl được đặt ở mức 100 µl, lấy ra và loại bỏ phần nổi trên bề mặt.
- h. Lặp lại các bước b–g hai lần để có tổng cộng ba lần rửa.

7. [**> 48 mẫu**] Rửa ba lần như sau.

- a. Thực hiện các bước b và c theo các mức tăng từ 1 cột đến 2 cột cho đến khi tất cả các cột đã được xử lý để tránh quá khô.
- b. Sử dụng pipet đa kênh 200 µl được đặt ở mức 60 µl, lấy ra và loại bỏ phần nổi trên bề mặt.
- c. Lấy ra khỏi giá từ tính.
- d. Ngay sau đó, từ từ phân phối 100 µl TWB2 trực tiếp lên các hạt.
- e. Pipet từ từ cho đến khi các hạt được tái huyền phù hoàn toàn. Hoặc, bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1600 vòng/phút trong 1 phút.
- f. Nếu bị bắn tóe, giảm tốc độ ly tâm xuống còn 280 × g trong 10 giây.
- g. Đặt lên giá từ tính của đĩa PCR và đợi cho đến khi chất lỏng trong suốt (3 phút).
Để đĩa trên giá từ tính và TWB2 trong các giếng để tránh bị khô quá mức khi thực hiện lần rửa thứ ba. Lấy ra và loại bỏ phần nổi trên bề mặt sau khi bạn đã chuẩn bị PCR Master Mix.
- h. Sử dụng pipet đa kênh 200 µl được đặt ở mức 100 µl, lấy ra và loại bỏ phần nổi trên bề mặt.
- i. Lấy ra khỏi giá từ tính và từ từ thêm 100 µl TWB2 trực tiếp lên các hạt.
- j. Lặp lại các bước h và i theo các mức tăng 1 hoặc 2 cột cho đến khi tất cả các cột đã được xử lý.
- k. Lặp lại các bước e–h hai lần để có tổng cộng ba lần rửa.

8. Giữ trên giá từ tính cho đến bước 4 của mục *Quy trình* trong *Khuếch đại DNA đã được cắt nối*. TWB2 vẫn ở trong giếng để tránh làm khô quá mức các hạt.

Khuếch đại DNA được cắt nối

Bước này khuếch đại DNA đã được cắt nối bằng chương trình PCR với số chu kỳ giới hạn. Bước PCR thêm các adapter Chỉ thị 1 (i7), các adapter Chỉ thị 2 (i5), và các trình tự cần thiết cho việc tạo cụm trong quá trình giải trình tự.

Vật tư tiêu hao

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Đĩa adapter chỉ thị
- Đĩa PCR 96 giếng
- Nước không chứa nuclease
- Miếng dán niêm phong
- Ống ly tâm nhỏ 1,5 ml
- Đầu pipet

- Pipet đa kênh 20 µl
- Pipet đa kênh 200 µl

Giới thiệu về thuốc thử

- Đĩa adapter chỉ thị
 - Một giếng có thể chứa > 10 µl adapter chỉ thị.
 - Không thêm mẫu vào đĩa adapter chỉ thị.
 - Mỗi giếng của đĩa chỉ thị chỉ được sử dụng một lần duy nhất.

Chuẩn bị

1. Chuẩn bị các vật tư tiêu hao sau:

Vật tư	Bảo quản	Hướng dẫn
EPM	-25°C đến -15°C	Rã đông ở 4°C hoặc trên đá lạnh trong 1 giờ. Lật ngược để trộn đều, sau đó ly tâm trong thời gian ngắn.
Đĩa adapter chỉ thị	-25°C đến -15°C	Rã đông ở nhiệt độ phòng trong 30 phút.

2. Lưu chương trình eBLTS PCR sau trên máy luân nhiệt, sử dụng số chu kỳ PCR phù hợp được chỉ định trong bảng bên dưới.

- Chọn tùy chọn gia nhiệt sơ bộ nắp và đặt ở 100°C
- Đặt thể tích phản ứng là 50 µl
- 72°C trong 3 phút
- 98°C trong 3 phút
- X chu kỳ của:
 - 98°C trong 20 giây
 - 60°C trong 30 giây
 - 72°C trong 1 phút
- 72°C trong 3 phút
- Duy trì ở 10°C

Tổng thời gian chạy là khoảng 38 phút cho 9 chu kỳ và khoảng 46 phút cho 12 chu kỳ.

Loại đầu vào mẫu	Số chu kỳ PCR (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1000 ng gDNA	9
50–1000 ng gDNA được tách chiết từ FFPE	12
gDNA được tách chiết từ máu	9

Quy trình

1. Kết hợp các thành phần sau để chuẩn bị hỗn hợp PCR Master Mix. Nhân mỗi thể tích với số lượng mẫu đang được xử lý.
 - EPM (23 µl)
 - Nước không chứa nuclease (23 µl)Thể tích đã bao gồm phần dư của thuốc thử.
2. Dùng pipet hút và nhả hỗn hợp PCR Master Mix 10 lần để trộn đều, sau đó ly tâm trong thời gian ngắn.
3. Khi đặt đĩa trên giá từ tính, sử dụng pipet đa kênh 200 µl để lấy ra và loại bỏ TWB2. Bọt còn lại trên thành giếng không ảnh hưởng đến thư viện.
4. Lấy ra khỏi giá từ tính.
5. Ngay lập tức thêm 40 µl PCR Master Mix trực tiếp lên các hạt trong mỗi giếng.
6. Ngay lập tức dùng pipet để trộn cho đến khi các hạt được phân tán hoàn toàn. Hoặc, bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1600 vòng/phút (rpm) trong 1 phút.
7. Bịt kín đĩa mẫu và ly tâm ở 280 × g trong 10 giây.
8. Ly tâm đĩa adapter chỉ thị ở 1000 × g trong 1 phút.
9. Chuẩn bị đĩa adapter chỉ thị.
 - [< 96 mẫu] Dùng đầu pipet mới để chọc thủng lớp màng nhôm trên đĩa adapter chỉ thị cho từng giếng, chỉ với số lượng mẫu cần xử lý.
 - [96 mẫu] Đặt một đĩa PCR nửa viên mới lên trên đĩa adapter chỉ thị và ấn xuống để chọc thủng lớp màng nhôm. Loại bỏ đĩa PCR đã dùng để chọc thủng.
10. Dùng đầu pipet mới, thêm 10 µl adapter chỉ thị đã ghép cặp sẵn vào mỗi giếng.
11. Dùng pipet đặt ở 40 µl, hút nhả 10 lần để trộn. Hoặc, bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1600 vòng/phút trong 1 phút.
12. Bịt kín đĩa, sau đó ly tâm ở 280 × g trong 10 giây.
13. Đặt vào máy luân nhiệt và chạy chương trình eBLTS PCR.

ĐIỂM DỪNG AN TOÀN

Nếu bạn dừng lại, hãy bảo quản ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C trong tối đa 30 ngày.

Làm sạch thư viện

Bước này sử dụng quy trình tinh sạch bằng hạt hai mặt để tinh sạch các thư viện đã khuếch đại.

Vật tư tiêu hao

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Ethanol (EtOH) 80% mới pha chế

- Đĩa lưu trữ sâu 96 giếng polypropylene, 0,8 ml (đĩa MIDI)
- Đĩa PCR 96 giếng
- Giá từ tính cho đĩa MIDI
- Giá từ tính cho đĩa PCR
- Ống ly tâm nhỏ 1,5 ml
- Nước không chứa nuclease

Giới thiệu về thuốc thử

- Cleanup Beads
 - Trộn xoáy trước mỗi lần sử dụng.
 - Trộn xoáy thường xuyên để đảm bảo các hạt từ được phân bố đều.
 - Hút và phân phối chậm do độ nhớt của dung dịch.

Chuẩn bị

1. Chuẩn bị các vật tư tiêu hao sau:

Vật tư	Bảo quản	Hướng dẫn
CB	Nhiệt độ phòng	Trộn xoáy và đảo ngược để trộn cho đến khi màu của chất lỏng đồng nhất.
RSB	2°C đến 8°C	Rã đông ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Trộn xoáy để trộn đều.

Quy trình

1. Lắc đĩa PCR 96 giếng ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 1 phút, sau đó ly tâm trong thời gian ngắn.
2. Đặt lên giá từ tính của đĩa PCR và đợi cho đến khi chất lỏng trở nên trong (1 phút).
3. Trộn xoáy CB 3 lần trong 10 giây, sau đó đảo ngược nhiều lần để tái huyền phù.
4. Đối với gDNA chất lượng cao, hãy làm như sau.
 - a. Thêm 77 µl nước không chứa nuclease vào mỗi giếng của đĩa MIDI mới.
 - b. Thêm 88 µl CB vào mỗi giếng của đĩa MIDI.
 - c. Chuyển 45 µl phần nổi trên bề mặt từ mỗi giếng của đĩa PCR sang giếng tương ứng của đĩa MIDI.
 - d. Loại bỏ đĩa PCR.
 - e. Pipet mỗi giếng 10 lần để trộn. Hoặc, bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 1 phút.
 - f. Bịt kín đĩa và ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
 - g. Kiểm tra xem có bọt khí không. Nếu có, tiến hành ly tâm.
 - h. Đặt lên giá từ tính của đĩa MIDI và đợi cho đến khi chất lỏng trở nên trong (5 phút).
 - i. Trong khi ủ, trộn xoáy kỹ CB, và sau đó thêm 20 µl vào mỗi giếng của đĩa MIDI mới.

- j. Chuyển 200 µl phần nổi trên bề mặt từ mỗi giếng của đĩa MIDI đầu tiên vào giếng tương ứng của đĩa MIDI mới (chứa 20 µl CB).
 - k. Loại bỏ đĩa MIDI đầu tiên.
 - l. Pipet mỗi giếng của đĩa MIDI mới 10 lần để trộn. Hoặc, bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 1 phút.
5. Đối với FFPE được tách chiết, hãy làm như sau.
- a. Thêm 81 µl CB vào mỗi giếng của đĩa MIDI mới.
 - b. Chuyển 45 µl phần nổi trên bề mặt từ mỗi giếng của đĩa PCR sang giếng tương ứng của đĩa MIDI.
 - c. Loại bỏ đĩa PCR.
 - d. Pipet mỗi giếng 10 lần để trộn. Hoặc, bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 1 phút.
6. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
7. Kiểm tra xem có bọt khí không. Nếu có, tiến hành ly tâm.
8. Đặt lên giá từ tính của đĩa MIDI và đợi cho đến khi chất lỏng trở nên trong (5 phút).
9. Không làm xáo trộn các hạt, lấy ra và loại bỏ phần nổi trên bề mặt.
10. Rửa hạt như sau.
- a. Khi đĩa đang trên giá từ tính, thêm 200 µl EtOH 80% mới mà không trộn.
 - b. Ủ trong 30 giây.
 - c. Không làm xáo trộn các hạt, lấy ra và loại bỏ phần nổi trên bề mặt.
11. Rửa hạt lần **thứ hai**.
12. Để khô tự nhiên trên giá từ tính trong 5 phút.
13. Trong khi để khô tự nhiên, dùng micropipette 20 µl để lấy ra và loại bỏ phần EtOH còn sót lại.
14. Lấy ra khỏi giá từ tính.
15. Thêm 17 µl RSB vào các hạt.
16. Bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 2 phút.
17. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút.
18. Kiểm tra xem có bọt khí không. Nếu có, tiến hành ly tâm.
19. Đặt đĩa lên giá từ tính của đĩa MIDI và chờ cho đến khi chất lỏng trở nên trong (2 phút).
20. Chuyển 15 µl phần nổi trên bề mặt sang một đĩa PCR 96 giếng mới.

ĐIỂM DỪNG AN TOÀN

Nếu bạn dừng lại, hãy bịt kín đĩa và bảo quản ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C trong tối đa 30 ngày.

Gộp nhóm các thư viện trước làm giàu

Bước này kết hợp các thư viện DNA với các chỉ thị duy nhất vào một nhóm lên đến 12 thư viện.

Phương pháp gộp nhóm

Bạn có thể gộp theo thể tích hoặc khối lượng. Sử dụng bảng sau để xác định phương pháp thích hợp cho đầu vào của bạn.

Bảng 2 Các phương pháp gộp nhóm được khuyến nghị

Đầu vào mẫu	Phương pháp gộp nhóm
10–49 ng gDNA	Khối lượng
50–1000 ng gDNA	Thể tích
gDNA được tách chiết từ FFPE	Khối lượng
gDNA được tách chiết từ máu	Thể tích

- Làm giàu một thành phần không yêu cầu gộp nhóm các thư viện trước làm giàu. Tuy nhiên, việc thêm RSB có thể là cần thiết.
- Sau khi định lượng thư viện trước làm giàu, tất cả các loại đầu vào mẫu có thể được gộp theo khối lượng để đạt được cân bằng chỉ thị tối ưu.
- Lượng cuối cùng của các thư viện trước làm giàu được tạo ra trong các chế phẩm thí nghiệm riêng biệt có thể khác nhau. Do đó, gộp nhóm theo khối lượng được khuyến nghị để đạt được sự cân bằng chỉ thị tối ưu.
- Sử dụng phương pháp làm giàu 1 thành phần cho các tình huống sau.
 - 10–49 ng gDNA
 - 50–1000 ng gDNA được tách chiết từ FFPE
 - Phát hiện tần số alen nhỏ thấp cho phát hiện biến thể soma.

Gộp nhóm theo khối lượng

Đối với các tình huống sau đây, định lượng các thư viện của bạn để sử dụng khối lượng DNA cho mỗi thư viện để làm giàu được chỉ định trong [Gộp nhóm các thư viện trước làm giàu ở nồng độ bằng nhau trên trang 34](#).

- Đầu vào mẫu gDNA 10–49 ng
- 50–1000 ng gDNA được tách chiết từ đầu vào mẫu FFPE
- Phát hiện tần số alen nhỏ thấp cho phát hiện biến thể soma
- gDNA được tách chiết từ máu để có cân bằng chỉ thị tối ưu

Định lượng thư viện trước làm giàu

- Chạy 1 µl các thư viện trước làm giàu bằng phương pháp định lượng dựa trên huỳnh quang bạn ưa thích bằng cách sử dụng thuốc nhuộm cài xen dsDNA.
 - Đối với 50–1000 ng gDNA chất lượng cao, dự kiến thu được ≥ 500 ng thư viện trước làm giàu.
 - Đối với 50–1000 ng gDNA được tách chiết từ FFPE, dự kiến thu được 500–6000 ng thư viện trước làm giàu, tùy thuộc vào chất lượng của mẫu ban đầu.

LƯU Ý Đối với các phương pháp định lượng có độ lệch khác nhau, hãy kiểm tra chất lượng lượng phương pháp định lượng cho quy trình làm việc này. Kết quả nồng độ có thể khác nhau tùy thuộc vào phương pháp được sử dụng.

Gộp nhóm các thư viện trước làm giàu ở nồng độ bằng nhau

Sử dụng bảng sau để xác định khối lượng DNA mỗi thư viện cần cho bước làm giàu, dựa theo loại mẫu và số thành phần làm giàu. Năng suất làm giàu tối ưu và hiệu quả xét nghiệm không được đảm bảo khi sử dụng lượng thư viện trước làm giàu thấp hơn mức khuyến nghị.

Tổng khối lượng DNA trong phản ứng làm giàu không được vượt quá 6000 ng.

Đầu vào mẫu	Số thành phần làm giàu	Khối lượng DNA trên mỗi thư viện (ng)	Tổng khối lượng DNA thư viện (ng)
gDNA chất lượng cao	12	250–500	3000–6000
gDNA được tách chiết từ FFPE	1	200	200

- Ghi lại các chỉ thị cho các thư viện mà bạn dự định gộp trong bước này.
- Dựa trên nồng độ của mỗi thư viện, hãy tính thể tích cần thêm vào phản ứng làm giàu để đạt khối lượng DNA yêu cầu.
 - gDNA chất lượng cao: Tính thể tích thư viện cần thêm để đạt 250–500 ng DNA đầu vào.
 - gDNA được tách chiết từ FFPE: Tính thể tích thư viện cần thêm để đạt 200 ng DNA đầu vào.
- Thêm thể tích đã tính toán cho mỗi thư viện vào cùng một giếng của đĩa PCR.
- Nếu sử dụng gDNA chất lượng cao, hãy thực hiện một trong các thao tác sau dựa trên tổng thể tích của các thư viện trước làm giàu được gộp nhóm:
 - Nếu thể tích thư viện trước làm giàu = 30 µl, tiến hành bước [Tạo thể lai mẫu dò trên trang 36](#).
 - Nếu thể tích thư viện trước làm giàu < 30 µl, thêm RSB để đạt tổng thể tích 30 µl.
 - Nếu thể tích thư viện trước làm giàu > 30 µl, hãy sử dụng phương pháp cô đặc bằng hạt từ hoặc máy cô quay chân không để cô đặc mẫu gộp. Thêm RSB vào mẫu gộp được cô đặc để đạt tổng thể tích 30 µl.
- Nếu sử dụng gDNA được tách chiết từ FFPE, hãy thực hiện một trong các thao tác sau dựa trên tổng thể tích của các thư viện trước làm giàu được gộp nhóm.
 - Nếu thể tích thư viện trước làm giàu = 7,5 µl, tiến hành bước [Tạo thể lai mẫu dò trên trang 36](#).

- Nếu thể tích thư viện trước làm giàu < 7,5 µl, hãy thêm RSB để đạt tổng thể tích 7,5 µl.

ĐIỂM DỪNG AN TOÀN

Nếu bạn dừng lại, hãy bịt kín đĩa và bảo quản ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C trong tối đa 30 ngày.

Gộp nhóm theo thể tích

Khi lượng đầu vào là 50–1000 ng gDNA, việc định lượng và chuẩn hóa các thư viện riêng lẻ được tạo ra trong cùng một thí nghiệm là không cần thiết.

Để đạt hiệu suất tối ưu, chỉ gộp nhóm các thư viện trước làm giàu được chuẩn bị bởi cùng một người dùng, cùng lô thuốc thử và cùng đĩa adapter chỉ thị.

1. Ghi lại các chỉ thị cho các thư viện mà bạn dự định gộp trong bước này.
2. Kết hợp các thể tích thư viện trước làm giàu và RSB cho số thành phần làm giàu của bạn vào cùng một giếng của đĩa PCR mới.

Thể tích thu được là 30 µl.

Số thành phần làm giàu *	Thể tích của từng thư viện trước làm giàu (µl)	Thể tích RSB (µl)
1 thành phần	14	16
2 thành phần	14	2
3 thành phần	10	0
4 thành phần	7,5	0
5 thành phần	6	0
6 thành phần	5	0
7 thành phần	4,2	0,6
8 thành phần	3,7	0,4
9 thành phần	3,3	0,3
10 thành phần	3	0
11 thành phần	2,7	0,3
12 thành phần	2,5	0

*Để biết thông tin về số thành phần không chuẩn (từ 2 thành phần đến 11 thành phần), hãy xem mục [Giới hạn của quy trình trên trang 2](#).

ĐIỂM DỪNG AN TOÀN

Nếu bạn dừng lại, hãy bịt kín đĩa và bảo quản ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C trong tối đa 30 ngày.

[Tùy chọn] Đánh giá chất lượng thư viện trước làm giàu

Nếu gộp nhóm theo thể tích, để định lượng các thư viện trước làm giàu, hãy sử dụng phương pháp dựa trên huỳnh quang sử dụng thuốc nhuộm cài xen dsDNA. Để đánh giá chất lượng các thư viện trước làm giàu, hãy sử dụng máy phân tích đoạn DNA với bộ kit phân tích đoạn thích hợp.

Sử dụng tổng cộng 1 µl để đánh giá chất lượng thư viện. Các thư viện trước làm giàu được cô đặc đủ để cho phép pha loãng lượng nhỏ nhằm mục đích định lượng hoặc phân tích đoạn.

Tạo thể lai mẫu dò

Bước này gắn các vùng DNA mục tiêu với các mẫu dò bắt giữ.

Thuốc thử Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit tương thích với cả Illumina và các bảng oligonucleotide DNA làm giàu của bên thứ ba. Để biết thông tin về các thông số kỹ thuật cần thiết cho các bảng của bên thứ ba, hãy tham khảo mục [Các yêu cầu về bảng mẫu dò làm giàu trên trang 10](#).

Vật tư tiêu hao

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (Dung dịch đệm HYB 2 + Chất chặn IDT NXT) (nắp xanh dương)
- Bảng mẫu dò làm giàu
- Đĩa PCR 96 giếng
- Miếng dán niêm phong
- Chuẩn bị cho quy trình sau:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (nắp màu hổ phách)

Giới thiệu về thuốc thử

- NHB2 kết tủa và tách lớp trong quá trình bảo quản.
- Bảng mẫu dò làm giàu đề cập đến bảng oligonucleotide làm giàu được chọn từ nhà cung cấp Illumina.

Chuẩn bị

1. Chuẩn bị các vật tư tiêu hao sau:

Vật tư	Bảo quản	Hướng dẫn
EHB2	2°C đến 8°C	Đưa về nhiệt độ phòng. Trộn xoáy để trộn đều. Nếu thấy tinh thể và vẩn đục, lặp lại việc trộn xoáy hoặc pipet lên xuống để trộn cho đến khi dung dịch trong.

Vật tư	Bảo quản	Hướng dẫn
Bảng mẫu dò làm giàu	-25°C đến -15°C (Illumina)	Đối với cả Illumina và các bảng của bên thứ ba, hãy đưa đến nhiệt độ phòng. Trộn xoáy để trộn đều.
NHB2 (nắp màu xanh dương)	-25°C đến -15°C	Rã đông ở nhiệt độ phòng. Khi ở nhiệt độ phòng, làm nóng sơ bộ trên máy ủ vi mẫu đến nhiệt độ tương tự như mẫu dò bạn đang sử dụng trong 5 phút. Trộn xoáy ở tốc độ tối đa 3 lần trong 10 giây mỗi lần để tái huyền phù. Ly tâm trong thời gian ngắn. Pipet lên và xuống từ đáy ống. Nếu thấy tinh thể và vẩn đục, lặp lại việc trộn xoáy hoặc pipet lên xuống để trộn cho đến khi dung dịch trong. Sử dụng trong khi còn ấm để tránh kết tủa do quá trình tái tạo.
SMB3*	2°C đến 8°C	Nếu bạn tiến hành quy trình tiếp theo ngay sau 90 phút giữ lại trong chương trình HYB, hãy đưa đến nhiệt độ phòng ít nhất 2 giờ trước khi bắt đầu chương trình HYB.
EEW* (ống hổ phách)	-25°C đến -15°C	Nếu bạn tiến hành quy trình tiếp theo ngay sau 90 phút giữ lại trong chương trình HYB, hãy đưa đến nhiệt độ phòng ít nhất 2 giờ trước khi bắt đầu chương trình HYB. Khi ở nhiệt độ phòng, làm nóng sơ bộ trên máy ủ vi mẫu đến nhiệt độ tạo thể lai và bắt giữ áp dụng trong 30 phút trước khi chương trình HYB kết thúc.

*Nếu bạn dừng lại trước quy trình tiếp theo, hãy trì hoãn việc chuẩn bị thuốc thử này cho đến khi bạn đến quy trình đó.

2. Lưu chương trình HYB sau trên máy luân nhiệt bằng cách sử dụng số chu kỳ thích hợp được liệt kê trong [Bảng 3](#).

- Chọn tùy chọn gia nhiệt sơ bộ nắp và đặt ở 100°C
- Đặt thể tích phản ứng
 - [gDNA chất lượng cao] 100 µl
 - [gDNA được tách chiết từ FFPE] 25 µl
- 98°C trong 5 phút
- X chu kỳ mỗi chu kỳ 1 phút, bắt đầu từ 98°C trong chu kỳ đầu tiên, sau đó giảm 2°C mỗi chu kỳ
- Giữ trong 90 phút ở nhiệt độ thích hợp:
 - [gDNA được tách chiết từ FFPE] 58°C
 - [Bảng mẫu dò 80 mer] 58°C
 - [Phát hiện biến thể soma] 58°C
 - [Tất cả các mẫu khác] 62°C

Tổng thời gian chạy là khoảng 115 phút.

Bảng 3 Số chu kỳ cho mỗi mẫu hoặc bảng

Loại mẫu và bảng	Số chu kỳ (X)
gDNA được tách chiết từ FFPE (bất kể loại bảng)	20
80 bảng mẫu dò mer (bất kể loại mẫu)	20
Phát hiện biến thể soma	20
Tất cả các mẫu và bảng khác	18

Quy trình

1. **[gDNA chất lượng cao]** Thêm các thuốc thử sau theo *thứ tự được liệt kê* vào mỗi thư viện đã gộp nhóm trong đĩa PCR.

Không tạo hỗn hợp tổng thể. Việc tạo hỗn hợp tổng thể của NHB2 và EHB2 tác động tiêu cực đến hiệu suất làm giàu.

- NHB2 (nắp xanh dương) (50 µl)
- Bảng mẫu dò làm giàu (10 µl)
- EHB2 (10 µl)

2. **[gDNA chất lượng cao]** Sử dụng bộ pipet để 90 µl, pipet mỗi giếng 10 lần để trộn.

3. **[gDNA được tách chiết từ FFPE]** Thêm các thuốc thử sau *theo thứ tự được liệt kê* vào mỗi thư viện đã gộp nhóm trong đĩa PCR.

Không tạo hỗn hợp tổng thể. Việc tạo hỗn hợp tổng thể của NHB2 và EHB2 tác động tiêu cực đến hiệu suất làm giàu.

- NHB2 (nắp xanh dương) (12,5 µl)
 - Bảng mẫu dò làm giàu (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[gDNA được tách chiết từ FFPE]** Sử dụng bộ pipet để 20 µl, pipet mỗi giếng 10 lần để trộn.
 5. Bịt kín đĩa và sau đó ly tâm ở 280 × g trong 10 giây.
 6. Đặt đĩa mẫu lên máy luân nhiệt đã lập trình sẵn rồi chạy chương trình HYB.
 7. Chuyển ngay đến quy trình tiếp theo khi thời gian giữ nhiệt độ của chương trình HYB kết thúc.

**THẬN TRỌNG**

Kết tủa xảy ra nếu nhiệt độ của phản ứng tạo thể lai xuống dưới nhiệt độ phòng.

Bắt giữ các mẫu dò đã tạo thể lai

Bước này sử dụng Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) để bắt giữ các mẫu dò đã được lai với các vùng quan tâm mục tiêu.

Vật tư tiêu hao

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (nắp màu hổ phách)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (NaOH 2N)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- Ống ly tâm nhỏ 1,5 ml
- Đĩa MIDI 96 giếng
- Đĩa PCR 96 giếng
- Miếng dán niêm phong
- Giá từ tính cho đĩa MIDI
- Chuẩn bị cho quy trình sau:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Giới thiệu về thuốc thử

- EEW
 - Đảm bảo EEW đã được rã đông ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 2 giờ trước khi gia nhiệt sơ bộ trên máy ủ vi mẫu.
 - Đảm bảo EEW đã được gia nhiệt trong máy ủ vi mẫu trong 30 phút trước khi chương trình HYB kết thúc.

- Để EEW trong máy ủ vi mẫu khi không sử dụng. EEW phải được giữ nóng trong toàn bộ quy trình.
- Có thể bị vẩn đục sau khi đạt đến nhiệt độ phòng.
- Có thể xuất hiện màu vàng.
- SMB3
 - SMB3 phải ở nhiệt độ phòng trước khi sử dụng.

Chuẩn bị

1. Chuẩn bị các vật tư tiêu hao sau:

Vật tư	Bảo quản	Hướng dẫn
SMB3	2°C đến 8°C	Để yên trong 2 giờ để đưa về nhiệt độ phòng. Đảo ngược, sau đó trộn xoáy cho đến khi tái huyền phù hoàn toàn.
EEW (ống màu hồ phách)	-25°C đến -15°C	Sau khi ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng, gia nhiệt sơ bộ trên máy ủ vi mẫu đến nhiệt độ tạo thể lai và bắt giữ thích hợp trong 30 phút trước khi chương trình HYB kết thúc.
EE1	-25°C đến -15°C	Rã đông ở nhiệt độ phòng, sau đó trộn xoáy.
HP3	-25°C đến -15°C	Rã đông ở nhiệt độ phòng, sau đó trộn xoáy.
ET2	2°C đến 8°C	Đưa về nhiệt độ phòng. Trộn xoáy để trộn đều.
EPM	-25°C đến -15°C	Rã đông trên đá lạnh trong một giờ. Trộn xoáy để trộn đều, rồi ly tâm trong thời gian ngắn. Đặt sang một bên trên đá lạnh.
PPC	-25°C đến -15°C	Rã đông trên đá lạnh trong một giờ. Trộn xoáy để trộn đều, rồi ly tâm trong thời gian ngắn. Đặt sang một bên trên đá lạnh.

2. Gia nhiệt sơ bộ trên máy ủ vi mẫu bằng miếng chêm khối gia nhiệt MIDI để ủ đĩa mẫu đến một trong các nhiệt độ sau. Một máy ủ vi mẫu thứ hai (tùy chọn) có thể được dùng để gia nhiệt sơ bộ EEW. Đặt EEW trên miếng chêm khối gia nhiệt MIDI.
 - [FFPE] 58°C
 - [Các bảng mẫu dò 80 mer] 58°C
 - [Phát hiện biến thể soma] 58°C
 - [Tất cả các mẫu khác] 62°C

Quy trình

Bắt giữ

1. Thêm SMB3 vào giếng tương ứng của đĩa MIDI mới như sau.
 - [gDNA chất lượng cao] Thêm 250 µl SMB3.
 - [gDNA được tách chiết từ FFPE] Thêm 62,5 µl SMB3.

2. Dùng pipet đặt ở 100 µl cho gDNA chất lượng cao hoặc 25 µl cho FFPE, chuyển mỗi thư viện đã gộp nhóm từ đĩa PCR 96 giếng vào giếng tương ứng của đĩa MIDI mới.
3. Bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1200 vòng/phút trong 4 phút.
4. Nếu xảy ra bắn tóe, hãy ly tâm đĩa trong thời gian ngắn.
5. Đặt đĩa thư viện đã gộp nhóm lên miếng chêm khối gia nhiệt MIDI trên máy ủ vi mẫu, bên dưới ống EEW, đóng nắp, sau đó ủ trong 15 phút ở nhiệt độ áp dụng:
 - [FFPE] 58°C
 - [Bảng mẫu dò 80 mer] 58°C
 - [Phát hiện biến thể soma] 58°C
 - [Tất cả các mẫu khác] 62°C
6. Lấy đĩa thư viện đã gộp nhóm ra và ly tâm ở tốc độ 280 × g trong 30 giây.
7. Đặt ngay lên giá từ tính của đĩa MIDI và đợi cho đến khi chất lỏng trở nên trong (2 phút).
8. **[gDNA chất lượng cao]** Sử dụng bộ pipet được đặt ở mức 200 µl, lấy ra và loại bỏ toàn bộ phần nổi trên bề mặt từ mỗi giếng mà không làm ảnh hưởng đến viên hạt.
9. **[gDNA được tách chiết từ FFPE]** Sử dụng bộ pipet được đặt ở mức 90 µl, lấy ra và loại bỏ toàn bộ phần nổi trên bề mặt từ mỗi giếng mà không làm ảnh hưởng đến viên hạt.
10. Lấy ra và loại bỏ toàn bộ phần nổi trên bề mặt còn lại.

Rửa

1. Lấy ra khỏi giá từ tính.
2. **[gDNA chất lượng cao]** Nhanh chóng lấy EEW ra khỏi máy ủ vi mẫu và thêm 200 µl vào mỗi giếng.
3. **[gDNA được tách chiết từ FFPE]** Nhanh chóng lấy EEW ra khỏi máy ủ vi mẫu và thêm 50 µl vào mỗi giếng.
4. Đưa EEW chưa sử dụng trở lại máy ủ vi mẫu và giữ nhiệt.
5. Bịt kín và lắc ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 4 phút.
6. Đặt đĩa mẫu trên miếng chêm khối gia nhiệt MIDI trong máy ủ vi mẫu, dưới ống EEW, đóng nắp, sau đó ủ trong 5 phút ở nhiệt độ áp dụng:
 - [FFPE] 58°C
 - [Bảng mẫu dò 80 mer] 58°C
 - [Phát hiện biến thể soma] 58°C
 - [Tất cả các bảng khác] 62°C
7. Đặt ngay lên giá từ tính của đĩa MIDI và đợi cho đến khi chất lỏng trở nên trong (2 phút).
8. Dùng pipet đặt ở 200 µl cho gDNA chất lượng cao hoặc 50 µl cho FFPE, lấy ra và loại bỏ toàn bộ phần nổi trên bề mặt từ mỗi giếng.
9. Lặp lại các bước 1–8 hai lần để có tổng cộng ba lần rửa.

Rửa chuyển

1. Lấy ra khỏi giá từ tính.
2. **[gDNA chất lượng cao]** Nhanh chóng lấy EEW từ máy ủ vi mẫu và thêm 200 µl vào mỗi giếng.
3. **[gDNA được tách chiết từ FFPE]** Nhanh chóng lấy EEW ra khỏi máy ủ vi mẫu và thêm 50 µl vào mỗi giếng.
4. Bịt kín và lắc ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 4 phút. Nếu có hiện tượng bắn mẫu, giảm tốc độ xuống 1600 vòng/phút.
5. Chuyển dung dịch hạt đã được tái huyền phù hóa sang một đĩa MIDI mới.
Một phần mẫu có thể vẫn còn lại trong giếng.

**THẬN TRỌNG**

Việc chuyển thuốc thử giúp giảm thiểu tình trạng mang theo dư lượng có thể ức chế PCR ở bước sau.

6. Đặt đĩa mẫu lên miếng đệm khối gia nhiệt MIDI trên máy ủ vi mẫu, đóng nắp, và sau đó ủ trong 5 phút ở nhiệt độ áp dụng:
 - [FFPE] 58°C
 - [Bảng mẫu dò 80 mer] 58°C
 - [Phát hiện biến thể soma] 58°C
 - [Tất cả các mẫu khác] 62°C
7. Đặt ngay lên giá từ tính của đĩa MIDI và đợi cho đến khi chất lỏng trở nên trong (2 phút).
8. Dùng pipet đặt ở 200 µl cho gDNA chất lượng cao hoặc 50 µl cho FFPE, lấy ra và loại bỏ toàn bộ phần nổi trên bề mặt từ mỗi giếng.
9. Ly tâm đĩa ở 280 × g trong 30 giây.
10. Đặt lại lên giá từ tính của đĩa MIDI trong 10 giây.
11. Dùng pipet 20 µl để lấy ra và loại bỏ chất lỏng dư còn lại trong mỗi giếng.
12. Ngay lập tức chuyển sang bước [Rửa giải trên trang 42](#) để tránh hạt bị khô quá mức và mất hiệu suất thu hồi thư viện.

Rửa giải

1. Kết hợp các thể tích sau để chuẩn bị Hỗn hợp rửa giải tổng thể. Nhân mỗi thể tích với số lượng thư viện đã gộp đang được xử lý.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Lượng thuốc thử bổ sung được tính trong thể tích.
2. Trộn xoáy rồi ly tâm trong thời gian ngắn.
3. Tháo đĩa MIDI khỏi giá từ tính.
4. Thêm 23 µl Hỗn hợp rửa giải tổng thể vào mỗi giếng.
5. Bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1800 vòng/phút trong 2 phút.

6. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 2 phút.
7. Ly tâm ở tốc độ 280 × g trong 30 giây.
8. Đặt lên giá từ tính của đĩa MIDI và đợi cho đến khi chất lỏng trở nên trong (2 phút).
9. Chuyển 21 µl chất nổi trên bề mặt từ đĩa MIDI sang giếng tương ứng của đĩa PCR 96 giếng mới.
10. Loại bỏ đĩa MIDI.
11. Thêm 4 µl ET2 vào mỗi giếng chứa 21 µl chất nổi trên bề mặt.
12. Đặt pipet ở 20 µl và từ từ pipet mỗi giếng 10 lần để trộn.
13. Bịt kín đĩa và sau đó ly tâm ở 280 × g trong 10 giây.
14. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 1 phút.

Khuếch đại thư viện đã được làm giàu

Bước này sử dụng PCR để khuếch đại thư viện đã được làm giàu.

Vật tư tiêu hao

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Miếng dán niêm phong

Chuẩn bị

1. Chuẩn bị các vật tư tiêu hao sau:

Vật tư	Bảo quản	Hướng dẫn
EPM	-25°C đến -15°C	Rã đông ở 4°C hoặc trên đá lạnh trong 1 giờ. Trộn xoáy để trộn đều, rồi ly tâm trong thời gian ngắn. Đặt sang một bên trên đá lạnh.
PPC	-25°C đến -15°C	Rã đông ở 4°C trên đá lạnh trong 1 giờ. Trộn xoáy để trộn đều, rồi ly tâm trong thời gian ngắn. Đặt sang một bên trên đá lạnh.

2. Lưu chương trình AMP trên máy luân nhiệt sử dụng số chu kỳ PCR thích hợp, được liệt kê trong bảng sau.

- Chọn tùy chọn gia nhiệt sơ bộ nắp và đặt ở 100°C
- Đặt thể tích phản ứng là 50 µl
- 98°C trong 45 giây
- (X) chu kỳ gồm:
 - 98°C trong 30 giây
 - 60°C trong 30 giây
 - 72°C trong 30 giây
- 72°C trong 5 phút
- Duy trì ở 10°C

Tổng thời gian chạy là khoảng 35 phút.

Loại mẫu và bảng	Số chu kỳ (X)
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) cho gDNA chất lượng cao	10
Illumina Exome Panel (CEX) cho FFPE	12
Tất cả các mẫu và bảng khác	12 ¹²³⁴

¹ Có thể điều chỉnh lên đến 15 chu kỳ cho các bảng nhỏ của bên thứ ba thông qua tối ưu hóa sau đó. Nếu sử dụng FFPE, số chu kỳ có thể được điều chỉnh lên đến 17.

² Có thể điều chỉnh lên đến 17 chu kỳ cho các bảng của bên thứ ba chỉ có 500 mẫu dò. Nếu sử dụng FFPE, số chu kỳ có thể được điều chỉnh lên đến 19.

³ Có thể điều chỉnh lên đến 14 chu kỳ cho các mẫu FFPE.

⁴ Tăng số chu kỳ PCR có thể dẫn đến tỷ lệ trùng lặp cao hơn và kích thước mảnh nhỏ hơn đối với các mẫu FFPE.

Quy trình

1. Thêm 5 µl PPC vào mỗi giếng.
2. Thêm 20 µl EPM vào mỗi giếng.
3. Bịt kín đĩa và lắc ở tốc độ 1200 vòng/phút trong 1 phút.
4. Ly tâm đĩa ở 280 × g trong 10 giây.
5. Đặt lên máy luân nhiệt đã lập trình sẵn và chạy chương trình HYB.

ĐIỂM DỪNG AN TOÀN

Nếu bạn dừng lại, hãy bảo quản ở nhiệt độ từ 2°C đến 8°C trong tối đa hai ngày. Ngoài ra, hãy để trên máy luân nhiệt trong tối đa 24 giờ.

Làm sạch thư viện đã được khuếch đại và làm giàu

Bước này sử dụng Cleanup Beads để tinh lọc thư viện đã được làm giàu và loại bỏ các sản phẩm không mong muốn.

Vật tư tiêu hao

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Ethanol (EtOH) 80% mới pha chế
- Miếng dán niêm phong
- Đĩa MIDI 96 giếng
- Đĩa PCR 96 giếng
- Giá từ tính cho đĩa MIDI

Giới thiệu về thuốc thử

- Cleanup Beads
 - Trộn xoáy trước mỗi lần sử dụng.
 - Trộn xoáy thường xuyên để đảm bảo các hạt từ được phân bố đều.
 - Hút và phân phối chậm do độ nhớt của dung dịch.

Chuẩn bị

1. Chuẩn bị các vật tư tiêu hao sau:

Vật tư	Bảo quản	Hướng dẫn
CB	Nhiệt độ phòng	Trộn xoáy và đảo ngược để trộn cho đến khi màu của chất lỏng đồng nhất.
RSB	2°C đến 8°C	Đưa về nhiệt độ phòng. Trộn xoáy để trộn đều.

2. Chuẩn bị EtOH 80% mới từ ethanol tuyệt đối.

Quy trình

1. Ly tâm đĩa PCR ở 280 × g trong 10 giây.
2. Trộn xoáy CB 3 lần, mỗi lần 10 giây, sau đó đảo ngược để trộn.
3. Thêm 40,5 µl CB vào mỗi giếng của một đĩa **MIDI** mới.
4. Chuyển 45 µl từ mỗi giếng của đĩa PCR sang giếng tương ứng của đĩa MIDI.
5. Bịt kín đĩa và lắc ở 1800 vòng/phút trong 1 phút.
6. Ủ đĩa MIDI ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.

7. Ly tâm ở 280 × g trong 10 giây.
8. Đặt đĩa lên giá từ tính của đĩa MIDI và chờ cho đến khi dung dịch trở nên trong (5 phút).
9. Sử dụng pipet đặt ở 95 µl, lấy ra và loại bỏ toàn bộ phần nổi trên bề mặt từ mỗi giếng.
10. Rửa hai lần theo quy trình sau.
 - a. Khi đĩa đang trên giá từ tính, thêm 200 µl EtOH 80% mới mà không trộn.
 - b. Ủ trong 30 giây.
 - c. Không làm xáo trộn các hạt, lấy ra và loại bỏ phần nổi trên bề mặt.
11. Để khô tự nhiên trên giá từ tính trong 5 phút.
12. Trong khi để khô, dùng pipet 20 µl để loại bỏ và bỏ đi lượng EtOH còn sót lại trong mỗi giếng.
13. Lấy đĩa ra khỏi giá từ tính và thêm 32 µl RSB vào mỗi giếng.
14. Bịt kín đĩa và lắc ở 1800 vòng/phút trong 1 phút.
15. Ủ đĩa ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
16. Ly tâm ở 280 × g trong 10 giây.
17. Đặt lại đĩa lên giá từ tính của đĩa MIDI và chờ cho đến khi dung dịch trở nên trong (2 phút).
18. Chuyển 30 µl phần nổi trên bề mặt từ đĩa MIDI 96 giếng sang giếng tương ứng của một đĩa PCR mới.
19. Loại bỏ đĩa MIDI.

ĐIỂM DỪNG AN TOÀN

Nếu bạn dừng lại, hãy bịt kín đĩa và bảo quản ở nhiệt độ từ -25°C đến -15°C trong tối đa 7 ngày.

Kiểm tra thư viện đã làm giàu

Để định lượng gDNA sợi kép đầu vào, hãy sử dụng phương pháp dựa trên huỳnh quang sử dụng thuốc nhuộm cải thiện. Tránh các phương pháp đo tổng axit nucleic như NanoDrop hoặc các phương pháp hấp thụ UV khác.

1. Chạy 1 µl các thư viện đã làm giàu bằng phương pháp định lượng của bạn.

LƯU Ý Tổng số mol của mẫu dò ảnh hưởng tỷ lệ thuận với lượng thư viện sau làm giàu.

Dự kiến kích thước khay chèn trung bình là 125–235 bp và phân phối các đoạn thư viện với phạm vi kích thước từ khoảng 200 bp đến khoảng 1000 bp.

Pha loãng thư viện đến nồng độ khởi đầu

Bước này pha loãng các thư viện đến nồng độ khởi đầu cho hệ thống giải trình tự của bạn và là bước đầu tiên trong pha loãng nối tiếp. Sau khi pha loãng đến nồng độ khởi đầu, các thư viện đã sẵn sàng để được biến tính và pha loãng đến nồng độ nạp cuối cùng.

Để giải trình tự, bất kể bảng mẫu dò làm giàu bạn đang sử dụng, Illumina khuyến nghị thiết lập một lần chạy kết thúc ghép nối với 151 chu kỳ mỗi đoạn đọc (2 × 151) và 10 chu kỳ mỗi Đoạn đọc chỉ mục. Nếu bạn muốn các đoạn đọc ít chồng chéo hoặc ít phạm vi bao phủ thô, bạn có thể giải trình tự xuống 2 × 126 hoặc 2 × 101.

1. Tính toán giá trị mol của thư viện hoặc các thư viện đã gộp bằng công thức sau đây.

- Đối với các thư viện được kiểm tra chất lượng trên máy phân tích đoạn DNA, hãy sử dụng kích thước trung bình thu được cho thư viện.
- Đối với tất cả các phương pháp kiểm tra chất lượng khác, sử dụng 350 bp làm kích thước thư viện trung bình.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{kích thước thư viện trung bình (bp)}} = \text{Nồng độ mol (nM)}$$

Ví dụ: nếu nồng độ trong thư viện của bạn là 20 ng/μl và kích thước trung bình là 350 bp, giá trị nồng độ mol kết quả là 86,58 nM.

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

2. Sử dụng giá trị nồng độ mol, tính toán thể tích RSB và thư viện cần thiết để pha loãng các thư viện tới nồng độ khởi đầu cho hệ thống của bạn.

Hệ thống giải trình tự	Thể tích thư viện yêu cầu tối thiểu (μl)	Nồng độ khởi đầu (nM)	Nồng độ nạp cuối cùng (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) hoặc 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM là nồng độ khởi đầu cho nồng độ nạp cuối cùng là 350 pM. Nếu cần, hãy điều chỉnh nồng độ nạp cuối cùng bằng cách sử dụng bảng sau.

Nồng độ nạp cuối cùng (pM)	Nồng độ thư viện gộp (nM)
100	0,50
150	0,75

Nồng độ nạp cuối cùng (pM)	Nồng độ thư viện gộp (nM)
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Pha loãng các thư viện bằng cách sử dụng RSB:

- **Các thư viện được định lượng dưới dạng nhóm thư viện đa thành phần**—Pha loãng nhóm đó tới nồng độ khởi đầu cho hệ thống của bạn.
- **Các thư viện được định lượng riêng lẻ**—Pha loãng mỗi thư viện tới nồng độ khởi đầu cho hệ thống của bạn. Thêm 10 µl mỗi thư viện đã pha loãng vào một ống để tạo một nhóm thư viện đa thành phần.

4. Thực hiện theo các hướng dẫn biến tính và pha loãng cho hệ thống của bạn để pha loãng đến nồng độ nạp cuối cùng.

- Đối với Hệ thống NextSeq 550Dx, tham khảo mục [Chuẩn bị giải trình tự NextSeq 550Dx trên trang 48](#).
- Đối với Hệ thống MiSeqDx, tham khảo mục [Chuẩn bị giải trình tự trên MiSeqDx trên trang 50](#).
- Đối với Hệ thống NovaSeq 6000Dx, tham khảo mục [Chuẩn bị giải trình tự NovaSeq 6000Dx trên trang 51](#).

Nồng độ nạp cuối cùng là điểm bắt đầu và hướng dẫn chung. Tối ưu hóa nồng độ cho quy trình làm việc và phương pháp định lượng của bạn trong các lần chạy giải trình tự tiếp theo hoặc bằng cách chuẩn độ tế bào dòng chảy.

Chuẩn bị giải trình tự NextSeq 550Dx

Sử dụng các hướng dẫn sau đây để biến tính và pha loãng các thư viện để giải trình tự trên hệ thống giải trình tự NextSeq 550Dx Sequencing System.

Vật tư tiêu hao

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

Chuẩn bị

Chuẩn bị dung dịch pha loãng *mới* của NaOH 0,2N để biến tính thư viện phục vụ giải trình tự. Để tránh sai số nhỏ trong thao tác hút pipet ảnh hưởng đến nồng độ NaOH cuối cùng, cần chuẩn bị thêm một lượng dư.



THẬN TRỌNG

Dung dịch NaOH 0,2N mới pha loãng là thiết yếu cho quá trình biến tính. Việc biến tính không đúng cách có thể làm giảm năng suất.

- Chuẩn bị các vật tư tiêu hao sau:

Vật tư	Bảo quản	Hướng dẫn
HT1	-25°C đến -15°C	Rã đông ở nhiệt độ phòng. Bảo quản ở 2°C đến 8°C cho đến khi sẵn sàng để pha loãng các thư viện đã biến tính.

- Kết hợp các thể tích sau trong ống ly tâm nhỏ để chuẩn bị dung dịch NaOH mới pha loãng:
 - Nước đạt chuẩn phòng thí nghiệm (800 µl)
 - NaOH 1N (200 µl)
 Kết quả thu được là 1 ml NaOH 0,2N.
- Đảo ngược ống nhiều lần để trộn đều.
- Kết hợp các thể tích sau trong ống ly tâm nhỏ để chuẩn bị dung dịch Tris-HCl 200 mM, pH 7,0.
 - Nước đạt chuẩn phòng thí nghiệm (800 µl)
 - Tris-HCl 1M, pH 7,0 (200 µl)
 Kết quả thu được là 1 ml Tris-HCl 200 mM, pH 7,0

LƯU Ý Giữ ống luôn đầy nắp. Sử dụng dung dịch mới pha loãng trong vòng **12 giờ**.

Biến tính thư viện

- Kết hợp các thể tích sau đây của thư viện và NaOH 0,2N mới pha loãng trong một ống ly tâm nhỏ.
 - 10 µl thư viện
 - 10 µl NaOH 0,2N
- Trộn xoáy nhanh sau đó ly tâm ở tốc độ 280 × g trong 1 phút.
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
- Thêm 10 µl Tris-HCl 200 mM, pH 7.

Pha loãng các thư viện biến tính đến 20 pM

- Thêm 970 µl HT1 đã được làm lạnh trước vào ống của các thư viện biến tính.
Kết quả là thư viện được biến tính 20 pM.

2. Trộn xoáy nhanh sau đó ly tâm ở tốc độ $280 \times g$ trong 1 phút.
3. Đặt các thư viện 20 pM lên đá lạnh cho đến khi bạn sẵn sàng tiến hành pha loãng lần cuối cùng.

Pha loãng các thư viện đến nồng độ nạp

1. Thêm các thể tích sau để pha loãng dung dịch thư viện 20 pM đã biến tính thành 1,2 pM.
 - Dung dịch thư viện đã biến tính (78 μ l)
 - HT1 đã làm lạnh trước (1222 μ l)
 Tổng thể tích là 1,3 ml ở 1,2 pM.
2. Đảo ngược để trộn đều, sau đó ly tâm theo nhịp điệu.
3. Tiến hành giải trình tự. Để biết hướng dẫn, hãy tham khảo *Hướng dẫn tham khảo về thiết bị NextSeq 550Dx* (tài liệu số 1000000009513) và *Hướng dẫn sử dụng ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx trên NextSeq 550Dx* (tài liệu số 200025238).

Chuẩn bị giải trình tự trên MiSeqDx

Sử dụng các hướng dẫn sau đây để biến tính và pha loãng các thư viện để giải trình tự trên hệ thống giải trình tự MiSeqDx.

Vật tư tiêu hao

- HT1 (Hybridization Buffer)
- NaOH 1N

Chuẩn bị

Chuẩn bị dung dịch pha loãng *mới* của NaOH 0,2N để biến tính thư viện phục vụ giải trình tự. Để tránh sai số nhỏ trong thao tác hút pipet ảnh hưởng đến nồng độ NaOH cuối cùng, cần chuẩn bị thêm một lượng dư.



THẬN TRỌNG

Dung dịch NaOH 0,2N mới pha loãng là thiết yếu cho quá trình biến tính. Việc biến tính không đúng cách có thể làm giảm năng suất.

1. Chuẩn bị các vật tư tiêu hao sau:

Vật tư	Bảo quản	Hướng dẫn
HT1	-25°C đến -15°C	Rã đông ở nhiệt độ phòng. Bảo quản ở 2°C đến 8°C cho đến khi sẵn sàng để pha loãng các thư viện đã biến tính.

2. Kết hợp các thể tích sau trong ống ly tâm nhỏ để chuẩn bị dung dịch NaOH mới pha loãng:

- Nước cất chuẩn phòng thí nghiệm (800 μ l)
- NaOH 1N (200 μ l)

Kết quả thu được là 1 ml NaOH 0,2N.

LƯU Ý Giữ ống luôn đầy nắp. Sử dụng dung dịch mới pha loãng trong vòng **12 giờ**.

Biến tính thư viện 4 nM

1. Trộn các thể tích sau trong ống ly tâm nhỏ.
 - Thư viện 4 nM (5 µl)
 - NaOH 0,2N (5 µl)
2. Trộn xoáy nhanh sau đó ly tâm ở tốc độ 280 × g trong 1 phút.
3. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút.
4. Thêm 990 µl HT1 đã làm lạnh trước vào ống chứa thư viện được biến tính.
Kết quả thu được 1 ml thư viện được biến tính 20 pM.

Pha loãng thư viện 20 pM đã biến tính

1. Pha loãng đến nồng độ mong muốn bằng cách sử dụng các thể tích sau.

Nồng độ	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Thư viện 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
HT1 đã được làm lạnh trước	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Đảo ngược để trộn đều, sau đó ly tâm theo nhịp điệu.
3. Tiến hành giải trình tự. Để biết hướng dẫn, hãy tham khảo *Hướng dẫn tham khảo về thiết bị MiSeqDx dành cho MOS v4 (tài liệu số 200010452)* và *Hướng dẫn về quy trình làm việc Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx cho MiSeqDx (tài liệu số 200015661)*.

Chuẩn bị giải trình tự NovaSeq 6000Dx

Sử dụng các hướng dẫn sau đây để biến tính và pha loãng các thư viện để giải trình tự trên hệ thống giải trình tự NovaSeq 6000Dx Sequencing System.

Vật tư tiêu hao

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

Chuẩn bị

Chuẩn bị dung dịch pha loãng *mới* của NaOH 0,2N để biến tính thư viện phục vụ giải trình tự. Để tránh sai số nhỏ trong thao tác hút pipet ảnh hưởng đến nồng độ NaOH cuối cùng, cần chuẩn bị thêm một lượng dư.



THẬN TRỌNG

Dung dịch NaOH 0,2N mới pha loãng là thiết yếu cho quá trình biến tính. Việc biến tính không đúng cách có thể làm giảm năng suất.

- Kết hợp các thể tích sau trong ống ly tâm nhỏ để pha loãng NaOH 1N thành NaOH 0,2N:

Bảng 4 Chế độ S2

Thuốc thử	Thể tích cho Một Tế bào dòng chảy (μl)	Thể tích cho Hai Tế bào dòng chảy (μl)
Nước đạt chuẩn phòng thí nghiệm	40	80
Dung dịch gốc NaOH 1N	10	20

Các thể tích này tạo ra 50 μl NaOH 0,2N cho một tế bào dòng chảy hoặc 100 μl NaOH 0,2N cho hai tế bào dòng chảy.

Bảng 5 Chế độ S4

Thuốc thử	Thể tích cho Một Tế bào dòng chảy (μl)	Thể tích cho Hai Tế bào dòng chảy (μl)
Nước đạt chuẩn phòng thí nghiệm	80	160
Dung dịch gốc NaOH 1N	20	40

Các thể tích này tạo ra 100 μl NaOH 0,2N cho một tế bào dòng chảy hoặc 200 μl NaOH 0,2N cho hai tế bào dòng chảy.

- Lật đảo nhiều lần để trộn hoặc lắc kỹ.
- Kết hợp các thể tích sau trong ống ly tâm nhỏ để chuẩn bị dung dịch Tris-HCl 400 mM, pH 8,0.
 - Nước đạt chuẩn phòng thí nghiệm (600 μl)
 - Tris-HCl 1M, pH 8,0 (400 μl)

Kết quả là 1 ml dung dịch Tris-HCl 400 mM, pH 8,0

LƯU Ý Giữ ống luôn đầy nắp. Sử dụng dung dịch mới pha loãng trong vòng **12 giờ**.

Tạo nhóm thư viện được chuẩn hóa

Nồng độ nạp có thể thay đổi tùy vào phương pháp chuẩn bị, định lượng và chuẩn hóa thư viện.

Sử dụng các hướng dẫn sau đây để chuẩn hóa các thư viện đến nồng độ thích hợp và sau đó gộp nhóm. Các thư viện được giải trình tự trên cùng một tế bào dòng chảy phải được kết hợp thành một nhóm được chuẩn hóa duy nhất.

LƯU Ý Số lượng mẫu tối đa có thể chạy trên mỗi làn với Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit là 192. Giới hạn này là do tổng số chỉ thị UD trong Bộ A và B.

Chuẩn hóa thư viện để gộp nhóm

- Xác định nồng độ thư viện gộp cần thiết dựa trên nồng độ nạp cuối cùng mong muốn.
 - Với nồng độ nạp cuối cùng là 350 pM, nồng độ thư viện gộp cần thiết là 1,75 nM.
 - Để xác định nồng độ thư viện gộp cho một nồng độ nạp cuối cùng khác, hãy tham khảo mục [Pha loãng thư viện đến nồng độ khởi đầu trên trang 47](#).
- Chuẩn hóa thư viện đến nồng độ gộp mong muốn bằng dung dịch Tris-HCl 10 mM, pH 8,5. Để được hỗ trợ trong việc pha loãng thư viện đến nồng độ thích hợp, hãy tham khảo [Công cụ tính toán gộp nhóm](#) trên trang web Illumina.

Nồng độ nạp khuyến nghị

Nồng độ nạp DNA tối ưu phụ thuộc vào loại thư viện và kích thước đoạn chèn. Đối với các thư viện > 450 bp, có thể cần nồng độ nạp cao hơn.

Gộp các thư viện đã chuẩn hóa và thêm PhiX tùy chọn

- Kết hợp thể tích thích hợp của mỗi thư viện đã chuẩn hóa trong một ống ly tâm nhỏ mới để thu được một trong các thể tích cuối cùng sau:

Chế độ	Thể tích cuối cùng (µl)
S2	150
S4	310

- [Tùy chọn]** Thêm 1% PhiX chưa biến tính> như sau:
 - Pha loãng PhiX 10 nM xuống 2,5 nM bằng dung dịch Tris-HCl 10 mM, pH 8,5.
 - Thêm thể tích thích hợp của PhiX 2,5 nM chưa biến tính vào ống chứa nhóm thư viện chưa biến tính.

Chế độ	PhiX 2,5 nM chưa biến tính (µl)	Nhóm thư viện chưa biến tính (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Khi tăng PhiX, 1% là số lượng được khuyến nghị cho các thư viện cân bằng tốt. Thư viện đa dạng thấp có thể yêu cầu nhiều hơn. Để sử dụng chất kiểm chuẩn PhiX với các thư viện độ đa mẫu thấp, hãy liên lạc với bộ phận Hỗ trợ kỹ thuật Illumina để được hướng dẫn.

Biến tính nhóm thư viện và đối chứng PhiX tùy chọn

- Thêm NaOH 0,2N vào ống chứa nhóm thư viện chưa biến tính và PhiX tùy chọn như sau.

Tế bào dòng chảy	NaOH 0,2N	Nhóm thư viện chưa biến tính (µl)	Thể tích thu được
S2	37	150	187 µl, hoặc 187,9 µl với PhiX
S4	77	310	387 µl, hoặc 388,9 µl với PhiX

- Đậy nắp rồi lắc nhanh.
- Ly tâm ở mức 280 × g trong 1 phút.
- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 8 phút để biến tính.
- Thêm Tris-HCl 400 mM, pH 8,0 như sau để trung hòa.

Chế độ	Tris-HCl 400 mM, pH 8,0 (µl)	Thể tích thu được
S2	38	225 µl, hoặc 225,9 µl với PhiX
S4	78	465 µl, hoặc 466,9 µl với PhiX

- Đậy nắp rồi lắc nhanh.
- Ly tâm ở mức 280 × g trong 1 phút.
- Chuyển toàn bộ thể tích thư viện được biến tính hoặc thư viện được biến tính và PhiX sang ống thư viện NovaSeq 6000Dx.
- Tiến hành giải trình tự. Để biết hướng dẫn, hãy tham khảo *Tài liệu về sản phẩm thiết bị NovaSeq 6000Dx* (tài liệu số 200010105) và *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx cho NovaSeq 6000Dx* (tài liệu số 200014776).

Khắc phục sự cố

Sử dụng bảng sau để khắc phục sự cố trong quy trình. Nếu một lần chạy giải trình tự hoặc quá trình chuẩn bị thư viện cho một mẫu thất bại hai lần, cần thực hiện thêm các bước khắc phục sự cố. Liên hệ với bộ phận Hỗ trợ kỹ thuật của Illumina.

Quan sát	Nguyên nhân có thể	Hành động khuyến nghị
Lần chạy giải trình tự không đạt thông số kỹ thuật kiểm soát chất lượng	Lỗi người dùng hoặc thiết bị phòng thí nghiệm trong quy trình xét nghiệm	Kiểm tra thư viện đã làm giàu để đảm bảo sản lượng và phân bố kích thước đoạn phù hợp cho thư viện. Lặp lại quy trình chuẩn bị thư viện từ một trong các bước sau, tùy thuộc vào vị trí nghi ngờ xảy ra lỗi thao tác hoặc thiết bị. Nếu không xác định được nguyên nhân hoặc có lỗi khác, liên hệ với bộ phận Hỗ trợ kỹ thuật Illumina để khắc phục sự cố cho lần chạy của bạn. - Chạy lại giải trình tự thư viện. Tham khảo mục Chuẩn bị giải trình tự NextSeq 550Dx trên trang 48, Chuẩn bị giải trình tự trên MiSeqDx trên trang 50 hoặc Chuẩn bị giải trình tự NovaSeq 6000Dx trên trang 51. - Làm giàu lại thư viện. Tham khảo mục Tạo thể lai mẫu dò trên trang 36. - Bắt đầu chuẩn bị thư viện từ đầu quy trình. Tham khảo Hướng dẫn sử dụng trên trang 21.
	Sự cố thiết bị	Liên hệ với bộ phận Hỗ trợ kỹ thuật của Illumina.
Lỗi trong quá trình tạo FASTQ hoặc lỗi hệ thống giải trình tự nói chung (ví dụ: lỗi mạng, lỗi khi nạp/tháo thuốc thử, v.v.)	Sự cố về phần mềm hoặc thiết bị	Tham khảo hướng dẫn của mô-đun hoặc ứng dụng để được hỗ trợ phân tích, hoặc tham khảo Hướng dẫn tham khảo về thiết bị NextSeq 550Dx (tài liệu số 1000000009513), Hướng dẫn tham khảo về thiết bị MiSeqDx dành cho MOS v4 (tài liệu số 200010452) hoặc Tài liệu hướng dẫn sản phẩm cho Thiết bị NovaSeq 6000Dx (tài liệu số 200010105). Để được hỗ trợ thêm, hãy liên hệ với bộ phận Hỗ trợ kỹ thuật của Illumina.

Quan sát	Nguyên nhân có thể	Hành động khuyến nghị
Thư viện DNA không tạo ra đủ sản lượng để nạp vào quá trình giải trình tự	Yêu cầu đối với mẫu đầu vào chưa được đáp ứng	Đảm bảo mẫu đầu vào phù hợp và lặp lại quy trình chuẩn bị thư viện. Tham khảo phần Khuyến nghị về đầu vào mẫu trên trang 18 .
	Lỗi thao tác hoặc thiết bị trong quy trình xét nghiệm	Lặp lại quy trình chuẩn bị thư viện từ một trong các bước sau, tùy thuộc vào vị trí nghi ngờ xảy ra lỗi thao tác hoặc thiết bị. Nếu không xác định được nguyên nhân hoặc có lỗi khác, liên hệ với bộ phận Hỗ trợ kỹ thuật Illumina để khắc phục sự cố cho lần chạy của bạn. - Chạy lại giải trình tự thư viện. Tham khảo mục Chuẩn bị giải trình tự NextSeq 550Dx trên trang 48, Chuẩn bị giải trình tự trên MiSeqDx trên trang 50 hoặc Chuẩn bị giải trình tự NovaSeq 6000Dx trên trang 51. - Làm giàu lại thư viện. Tham khảo mục Tạo thể lai mẫu dò trên trang 36. - Bắt đầu chuẩn bị thư viện từ đầu quy trình. Tham khảo Hướng dẫn sử dụng trên trang 21.
	Yêu cầu đối với bảng mẫu dò làm giàu chưa được đáp ứng	Đảm bảo bảng mẫu dò làm giàu phù hợp và lặp lại quy trình chuẩn bị thư viện. Tham khảo Các yêu cầu về bảng mẫu dò làm giàu trên trang 10 .

Đặc điểm hiệu suất

Hiệu suất với các bảng toàn exome

Hiệu suất của bảng exome được kiểm tra bằng cách sử dụng lượng DNA đầu vào thấp nhất (50 ng) và cao nhất (1000 ng) theo khuyến nghị từ dòng tế bào Coriell gDNA NA12878, với bộ dữ liệu chuẩn đã biết cho phát hiện biến thể dòng mầm (Coriell platinum genome). Bảng exome 1 (45 Mb) và bảng exome 2 (36,8 Mb) được sử dụng làm các bảng đại diện. 24 bản sao kỹ thuật đã được thử nghiệm thông qua xét nghiệm Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sử dụng bảng exome 1 (45 Mb) trong hai phản ứng làm giàu 12 thành phần. 12 bản sao kỹ thuật đã được thử nghiệm thông qua xét nghiệm Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sử dụng bảng exome 2 (36,8 Mb) trong phản ứng làm giàu 12 thành phần đơn lẻ. Các thư viện đã làm giàu được giải trình tự trên NextSeq 550Dx Sequencing System với mô-đun DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

Bảng dưới đây cho thấy giá trị trung bình của các chỉ số hiệu suất giải trình tự phụ và phát hiện biến thể cho các bản sao kỹ thuật được kiểm tra với từng bảng.

Bảng 6 Hiệu suất xét nghiệm với hai bảng toàn exome

Bảng	Tỷ lệ đọc đệm làm giàu	Độ đồng nhất của phạm vi	Trung vị độ dài đoạn	Độ nhạy SNV ¹	Độ chụm SNV ²	Độ nhạy Indel ¹	Độ chụm Indel ²
Bảng Exome 1 (45 Mb)	80%	96%	186 bp	96%	99%	90%	89%
Bảng Exome 2 (36,8 MB)	93%	98%	188 bp	96%	99%	92%	93%

¹ Độ nhạy=Số kết quả dương tính phát hiện được / (dương tính thật + âm tính giả)

² Độ chụm=Số dương tính thật / (dương tính thật + dương tính giả)

Giới hạn phát hiện

Tiêu chuẩn tham chiếu DNA Horizon HD799 được sử dụng để kiểm tra giới hạn phát hiện. HD799 bao gồm DNA được xử lý bằng formalin bị tổn thương vừa phải với các SNV đã biết ở tần số alen dao động từ 1–24,5%. Đầu vào DNA được khuyến nghị thấp nhất (50 ng) đã được sử dụng và tỷ lệ phát hiện các SNV với tần số alen biến thể (VAF) $\geq 5,0\%$ đã được đánh giá. 16 bản sao kỹ thuật đã được xét nghiệm thông qua xét nghiệm Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sử dụng quy trình làm việc FFPE, được làm giàu bằng bảng làm giàu ung thư pan (1,94 Mb) trong 16 (1 thành phần) lần làm giàu, sau đó được giải trình tự trên thiết bị NextSeq 550Dx với mô-đun DNA GenerateFASTQ Dx.

Tất cả các mẫu đều đạt yêu cầu về hiệu suất mẫu cụ thể theo bảng như được trình bày trong bảng sau.

Bảng 7 Hiệu suất mẫu cho Giới hạn phát hiện

Bảng	Tỷ lệ phát hiện biến thể của các SNV có VAF $\geq 5,0\%$	Trung bình Độ đồng nhất của phạm vi
Bảng làm giàu ung thư pan (1,94 Mb, 523 gen)	100%	99%

Chất gây trở ngại

Ảnh hưởng của các chất gây trở ngại tiềm ẩn được đánh giá trong Illumina DNA Prep with Enrichment Dx bằng cách đánh giá hiệu suất xét nghiệm khi có các chất gây trở ngại.

Trở ngại trong máu toàn phần

Acetaminophen (hợp chất ngoại sinh, thuốc), creatinine và triglyceride (các chất chuyển hóa nội sinh) đã được thử nghiệm bằng cách pha chúng vào mẫu máu toàn phần của người trước khi tách chiết DNA. Để đánh giá mức độ trở ngại do lấy máu (lượng ít hơn đề xuất), EDTA cũng được pha thêm vào các mẫu máu toàn phần. Ngoài ra, để đánh giá trở ngại do chuẩn bị mẫu, ethanol cấp độ phân tử đã được thêm vào DNA được tách chiết từ máu toàn phần.

Bảng sau đây cho thấy nồng độ thử nghiệm cho mỗi chất gây trở ngại.

Bảng 8 Các chất có khả năng gây trở ngại và nồng độ được thử nghiệm trong máu toàn phần

Chất thử nghiệm	Nồng độ thử nghiệm
Acetaminophen	15,6 mg/dL* Ba lần nồng độ cao nhất dự kiến sau khi dùng liều trị liệu bằng thuốc.
Creatinine	15 mg/dL* Nồng độ quan sát được cao nhất trong quần thể.
Triglyceride	1,5 g/dL* Nồng độ quan sát được cao nhất trong quần thể.
EDTA	6 mg/mL Ba lần nồng độ dự kiến trong máu, được lấy vào ống EDTA.
Ethanol cấp độ phân tử	15% v/v Trong dịch rửa giải sau khi tách chiết DNA.

* Theo CLSI EP37-ED1:2018

Với mỗi chất gây trở ngại, 12 bản sao kỹ thuật đã được thử nghiệm thông qua xét nghiệm Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, được làm giàu bằng bảng exome 1 (45 Mb) trong một lượt làm giàu (12 thành phần), và sau đó được giải trình tự trên thiết bị NextSeq 550Dx với mô-đun DNA GenerateFASTQ Dx.

Đối với các chất được thử nghiệm, tất cả 12 mẫu đều đáp ứng các yêu cầu về hiệu suất mẫu và không quan sát thấy trở ngại với hiệu suất phân tích.

Trở ngại trong mô FFPE

Hai mẫu FFPE đại trực tràng đã được xét nghiệm trong điều kiện có và không có hemoglobin ở mức 0,1 mg cho mỗi phần FFPE 10 µm để đại diện cho trường hợp xấu nhất là 50% mẫu mô bị nhiễm bẩn với máu có nồng độ hemoglobin cao. Các mẫu thử được xét nghiệm thông qua xét nghiệm Illumina DNA Prep with Enrichment Dx bằng cách sử dụng bảng làm giàu ung thư pan 1 (1,94 Mb) làm bảng đại diện trong các lượt làm giàu đơn thành phần. Các thư viện được làm giàu sau đó được giải trình tự trên thiết bị NextSeq 550Dx với mô-đun DNA GenerateFASTQ Dx. Tất cả các mẫu đều đáp ứng các yêu cầu về hiệu suất mẫu và đã được chứng minh rằng hemoglobin không ảnh hưởng đến hiệu suất phân tích.

Để đánh giá trở ngại do việc chuẩn bị mẫu, hai hợp chất ngoại sinh được pha vào DNA được tách chiết từ mẫu mô FFPE ung thư bàng quang. Các chất ngoại sinh đã thử nghiệm là dung dịch tách chiết thường dùng trong quá trình tách chiết DNA và được liệt kê với số lượng đã thử nghiệm trong bảng sau.

Các dung dịch chất thử nghiệm được bán trên thị trường ở dạng các bộ kit phân lập DNA dựa trên cột.

Bảng 9 Các chất ngoại sinh có khả năng gây trở ngại và nồng độ được thử nghiệm trong FFPE

Chất thử nghiệm	Nồng độ thử nghiệm (µl / 30 µl chất rửa giải)
Dung dịch khử parafin	113 x 10 ⁻⁶
Wash Buffer AW2	0,417

Với mỗi chất gây trở ngại, tám bản sao kỹ thuật đã được thử nghiệm thông qua xét nghiệm Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, được làm giàu bằng bằng làm giàu ung thư pan (1,94 Mb) trong các lượt làm giàu đơn thành phần, và sau đó được giải trình tự trên thiết bị NextSeq 550Dx với mô-đun DNA GenerateFASTQ Dx.

Đối với cả hai chất được thử nghiệm, tất cả tám mẫu đều đáp ứng các yêu cầu về hiệu suất mẫu và không quan sát thấy trở ngại đối với hiệu suất phân tích.

Nhiễm bẩn chéo

Dòng tế bào Coriell gDNA NA12878 (nữ, 10 mẫu), dòng tế bào Coriell gDNA NA12877 (nam, 12 mẫu), và mẫu đối chứng không có khuôn (NTC, 2 mẫu) đã được kiểm tra bằng xét nghiệm Illumina DNA Prep with Enrichment Dx trong bố trí dạng bàn cờ trên đĩa. Tất cả các mẫu đều sử dụng lượng gDNA đầu vào cao nhất (1000 ng) theo khuyến nghị, như một điều kiện nghiêm ngặt nhất để đánh giá mức độ nhiễm chéo giữa các mẫu. Việc kiểm tra được thực hiện hai lần bởi hai kỹ thuật viên khác nhau. Bảng Exome 1 (45 Mb) được sử dụng trong các phản ứng làm giàu 12 thành phần. Các thư viện đã được làm giàu được giải trình tự trên hệ thống NextSeq 550Dx với DNA GenerateFASTQ Dx. Việc đánh giá được tiến hành bằng cách kiểm tra độ bao phủ của nhiễm sắc thể Y đặc hiệu cho nam trong các mẫu nữ, bằng cách so sánh với mức nền của toàn bộ đĩa mẫu nữ cũng như sự biểu hiện chỉ thị của các mẫu đối chứng không khuôn (NTC).

Bảng 10 Kết quả nhiễm chéo

Các mẫu nữ với độ bao phủ nhiễm sắc thể Y đặc hiệu nam < 3 lần mức nhiễu nền	Biểu hiện chỉ thị trong NTC
100%	< 0,0005%

Hiệu suất ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Đặc tính hiệu suất của Ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx trên hệ thống NovaSeq 6000Dx được cung cấp trong *Tài liệu hướng dẫn đi kèm Thiết bị NovaSeq 6000Dx (tài liệu số 200025276)*.

Ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx trên NextSeq 550Dx cung cấp cùng các quy trình phân tích phụ như trên NovaSeq 6000Dx, bao gồm ba quy trình sau: Tạo FASTQ, tạo FASTQ và VCF để phát hiện biến thể dòng mầm, và tạo FASTQ và VCF để phát hiện biến thể soma.

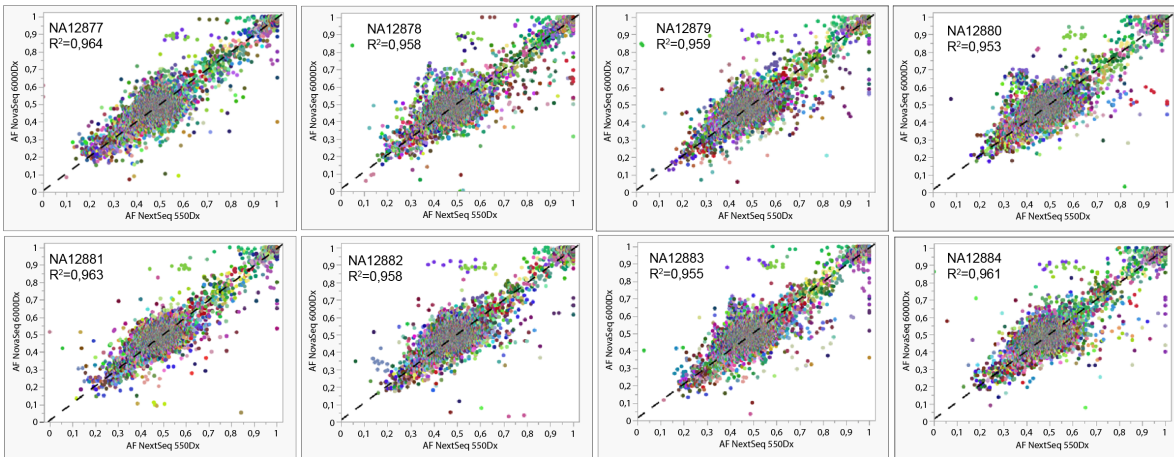
Hiệu suất phân tích phụ tương đương đã được ghi nhận từ cùng một quy trình chuẩn bị thư viện, khi giải trình tự trên cả hai nền tảng. Tỷ lệ phát hiện biến thể ([Bảng 11](#)) và mức độ tương đồng về tần suất (xem [Hình 1](#)) đối với mẫu gDNA từ dòng tế bào Coriell đã được đánh giá bằng một xét nghiệm đại diện, thiết kế để khảo sát nhiều gen bao phủ 1.970.505 base (9.232 mục tiêu) trên toàn bộ 23 nhiễm sắc thể người. Tám mẫu Platinum Genome DNA đã được kiểm tra, trong đó bảy mẫu được lặp lại sáu lần (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) và một mẫu (NA12881) được lặp lại năm lần (xem [Hình 1](#)). Các thư viện được giải trình tự với ba lần chạy trên cả thiết bị NovaSeq 6000Dx và NextSeq 550Dx, và việc phát hiện biến thể được thực hiện bằng quy trình tạo FASTQ và VCF để phát hiện biến thể dòng mầm của ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Dựa trên sự tương quan mạnh mẽ giữa hiệu suất ứng dụng trên thiết bị NovaSeq 6000Dx và NextSeq 550Dx, các đặc tính hiệu suất liên quan đến phân tích phụ được cung cấp trong *Tờ hướng dẫn sử dụng thiết bị NovaSeq 6000Dx (tài liệu số 200025276)* cũng được xác định là áp dụng cho ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx trên NextSeq 550Dx.

Bảng 11 Hiệu suất ứng dụng – Tỷ lệ phát hiện biến thể đối với SNV, vùng chèn và vùng xóa

Bảng	Tốc độ phát hiện biến thể trên NovaSeq 6000Dx	Tỷ lệ phát hiện biến thể trên NextSeq 550Dx
Bảng toàn bộ hệ gen (1,97 Mb, 9.232 mục tiêu, 23 NST)	99,9%	99,9%

Hình 1 So sánh tần suất biến thể cho các lần chạy trên NovaSeq 6000Dx và NextSeq 550Dx với phân tích ứng dụng DRAGEN for IDPE Dx



Phụ lục: Illumina UD Indexes Adapter Sequences

Các adapter chỉ thị kép (UD) duy nhất này được bố trí trong đĩa để thực thi chiến lược ghép nối được đề xuất. Các adapter chỉ thị này dài 10 base, thay vì tám base điển hình.

Index 1 (i7) Adapters

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (i5) Adapters

AATGATACGGCGACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Trình tự sau đây được sử dụng để cắt adapter Đoạn đọc 1 và Đoạn đọc 2.

CTGTCTCTTATACACATCT

Đĩa A/Bộ 1 adapter chỉ thị

Tên chỉ thị	i7 Bases in Adapter	i5 Bases in Adapter
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA

Tên chỉ thị	i7 Bases in Adapter	i5 Bases in Adapter
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

Tên chỉ thị	i7 Bases in Adapter	i5 Bases in Adapter
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	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC

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

Đĩa B/Bộ 2 adapter chỉ thị

Tên chỉ thị	i7 Bases in Adapter	i5 Bases in Adapter
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	AGAGCTCCTC	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Tên chỉ thị	i7 Bases in Adapter	i5 Bases in Adapter
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	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

Tên chỉ thị	i7 Bases in Adapter	i5 Bases in Adapter
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

Tên chỉ thị	i7 Bases in Adapter	i5 Bases in Adapter
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Lịch sử sửa đổi

Tài liệu	Ngày	Mô tả thay đổi
Tài liệu số 200038118 v01	Tháng 12 năm 2025	• Đã xóa tham chiếu đến Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Module cho NextSeq 550Dx. • Đã làm rõ quy trình Làm sạch sau bước cắt nối. • Đã cập nhật Hướng dẫn tham khảo về thiết bị MiSeqDx dành cho số hiệu tài liệu MOS v4.
Tài liệu số 200038118 v00	Tháng 7 năm 2023	Phát hành lần đầu. Tài liệu trước 200019584 được thay thế bằng tài liệu này. Các thay đổi từ tài liệu 200019584 v2 sang tài liệu mới này: • Đã thêm nội dung để hỗ trợ giải trình tự trên Thiết bị NextSeq 550Dx sử dụng Ứng dụng DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx cho NextSeq 550Dx. • Đã làm rõ danh sách thuốc thử không được cung cấp. • Đã thêm thông tin báo cáo sự cố vào Cảnh báo và biện pháp phòng ngừa. • Đã làm rõ kỳ vọng về Các thư viện làm giàu. • Đã thêm hướng dẫn để chuẩn bị Tris-HCl 400 nM, pH 8,0. • Đã xóa lỗi đánh máy bước Chuẩn bị giải trình tự. Những thay đổi trước đây đối với tài liệu 200019584: • Đã thêm nội dung để hỗ trợ giải trình tự trên thiết bị NovaSeq 6000Dx. • Đã thêm tên hệ thống giải trình tự và danh mục số. • Đã xóa thông tin lập chỉ thị kép duy nhất cho các thư viện được lập chỉ thị đơn.

Bảng sáng chế và nhãn hiệu

Tài liệu này và nội dung trong đó thuộc quyền sở hữu của Illumina, Inc. và các công ty liên kết của Illumina, Inc. ("Illumina") và chỉ dành cho việc sử dụng theo hợp đồng với khách hàng của Illumina liên quan đến việc sử dụng (các) sản phẩm được mô tả trong tài liệu này và không dành cho mục đích nào khác. Tài liệu này và nội dung trong đó sẽ không được sử dụng hay phân phối vì bất kỳ mục đích nào khác và/hoặc không được truyền tải, tiết lộ hay sao chép dưới bất kỳ hình thức nào khác mà không có sự cho phép trước bằng văn bản của Illumina.

Illumina không chuyển nhượng bất kỳ giấy phép nào theo các bằng sáng chế, nhãn hiệu, bản quyền hoặc các quyền theo thông luật cũng như các quyền tương tự của bất kỳ bên thứ ba nào thông qua tài liệu này.

Các hướng dẫn nêu trong tài liệu này phải được tuân thủ nghiêm ngặt và rõ ràng bởi cá nhân được đào tạo phù hợp và có đủ trình độ nhằm đảm bảo sử dụng an toàn và đúng cách (các) sản phẩm được mô tả trong tài liệu này. Phải đọc và hiểu hoàn toàn tất cả nội dung của tài liệu này trước khi sử dụng (các) sản phẩm đó.

VIỆC KHÔNG ĐỌC TOÀN BỘ VÀ TUÂN THỦ RÕ RÀNG TẤT CẢ CÁC HƯỚNG DẪN NÊU TRONG TÀI LIỆU NÀY CÓ THỂ DẪN ĐẾN GÂY HƯ HỎNG (CÁC) SẢN PHẨM, GÂY TỔN THƯƠNG CHO CON NGƯỜI, BAO GỒM NGƯỜI DÙNG HOẶC NHỮNG NGƯỜI KHÁC VÀ GÂY THIẾT HẠI TÀI SẢN KHÁC, VÀ SẼ LÀM MẤT HIỆU LỰC BẢO HÀNH ÁP DỤNG CHO (CÁC) SẢN PHẨM ĐÓ.

ILLUMINA KHÔNG CHỊU BẤT KỲ TRÁCH NHIỆM NÀO PHÁT SINH TỪ VIỆC SỬ DỤNG KHÔNG ĐÚNG CÁCH (CÁC) SẢN PHẨM ĐƯỢC MÔ TẢ TRONG TÀI LIỆU NÀY (BAO GỒM CẢ CÁC BỘ PHẬN CỦA SẢN PHẨM HOẶC PHẦN MỀM).

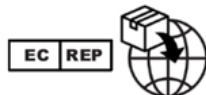
© 2025 Illumina, Inc. Bảo lưu mọi quyền.

Tất cả các nhãn hiệu đều là tài sản của Illumina, Inc. hoặc các chủ sở hữu tương ứng. Để biết thông tin cụ thể về nhãn hiệu, hãy tham khảo trang www.illumina.com/company/legal.html.

Thông tin liên hệ



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (ngoài khu vực Bắc Mỹ)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Nhà bảo trợ tại Úc

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

Thông tin trên nhãn sản phẩm

Để có thông tin tham chiếu đầy đủ về các ký hiệu xuất hiện trên bao bì và nhãn sản phẩm, hãy tham khảo bản chú giải ký hiệu tại địa chỉ support.illumina.com, trên tab *Documentation* (Tài liệu) cho bộ kit của bạn.