

IN VITRO -DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN. VAIN VIENTIIN.

Suunniteltu käyttötarkoitus

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit on reagenssi- ja tarvikesarja, joka on tarkoitettu näytekirjastojen valmisteluun ihmisen soluista ja kudoksesta peräisin olevasta genomisesta DNA:sta *in vitro* -diagnostisten määritysten kehittämiseksi. Käyttäjän toimittamia anturipaneeleita tarvitaan sellaisten kirjastojen valmisteluun, joiden kohteena ovat erityiset genomikohdealueet. Luodut näytekirjastot on tarkoitettu käytettäväksi Illumina sekvensointijärjestelmissä. Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx sisältää ohjelmiston sekvensointiajon määritykseen, valvontaan ja analysointiin.

Menetelmän periaatteet

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarja on tarkoitettu sellaisten DNA-sekvensointikirjastojen valmisteluun, jotka on rikastettu kohdealueiden kohdalla ihmisen soluista ja kudoksesta saadusta genomisesta DNA:sta.

Käyttäjän toimittamia biotinyloituja oligonukleotidipaneeleja tarvitaan kohteen rikastamiseen. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva useiden erikokoisten paneelien kanssa, mukaan lukien pienet paneelit (< 20 000 koetinta) ja suuret paneelit (> 200 000 koetinta).. Luodut rikastetut kirjastot on tarkoitettu sekvensointiin Illumina-sekvensointijärjestelmissä.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -toimenpide koostuu seuraavista vaiheista:

- **Tagmentin genomi-DNA** – DNA-syötteen tagmentointiin on käytössä Enrichment BLT Small (eBLTS). Tagmentoinnin aikana gDNA fragmentoidaan ja varustetaan sovitintunnisteilla yhden vaiheen aikana. eBLTS:n kyllästykseen tagmentointireaktiossa tarvitaan vähintään 50 ng:n DNA-syöte. Kyllästettynä eBLTS fragmentoi asetetun määrän DNA-molekyylejä sellaisten normalisoitujen kirjastojen luomiseksi, joiden fragmenttikokojakauma on yhdenmukainen.
- **Tagmentoinnin jälkeinen puhdistus** – puhdistaa sovitintunnisteella varustetun DNA:n eBLTS:ssä monistuksessa käytettäväksi.
- **Tagmentoidun DNA:n monistaminen** – monistaa tagmentoidun DNA:n rajoitetun syklin PCR-ohjelmalla. Ainutkertaiset kaksoisindeksit (UD) lisätään DNA-fragmenttien päihin, jolloin voidaan ottaa käyttöön ainutkertainen DNA-kirjastojen viivakoodaus ja klustereiden luonti sekvensoinnin aikana.
- **Kirjastojen puhdistus** – raepuhdistustoimenpiteen avulla monistetut DNA-kirjastot puhdistetaan ja niiden koko valitaan.
- **Kirjastojen poolaus** – yhdistää ainutkertaisilla indekseillä varustetut DNA-kirjastot yhdeksi enintään 12 kirjaston pooliksi. Kirjastot voidaan poolata tilavuuden tai massan mukaan.
- **Antureiden hybridisaatio** – koostuu hybridisaatioreaktiosta, jonka aikana kaksisäikeiset DNA-kirjastot denaturoidaan ja biotinyloitujen DNA-antureiden paneeli hybridisoidaan kohdegenomialueiksi.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva useiden paneelien kanssa. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja ei sisällä rikastuspaneelia. Käyttäjä toimittaa anturipaneelit ja niiden on täytettävä vaaditut tekniset tiedot. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -reagenssit ovat yhteensopivia sekä Illumina että vaadittavien teknisten tietojen mukaisten kolmansien tahojen DNA-rikastusoligonukleotidipaneelien kanssa. Tietoa kolmansien tahojen paneeleilta edellytettävistä teknisistä tiedoista on kohdassa [Rikastusanturipaneelin vaatimukset sivulla 10](#)
- **Hybridisoitujen antureiden kaappaus** – Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) -magneettirakeita käytetään sellaisten biotinyloitujen antureiden kaappaukseen, jotka on hybridisoitu kohdealueille.
- **Rikastettujen kirjastojen monistaminen** – PCR:ää käytetään rikastettujen kirjastojen monistamiseen.
- **Monistettujen rikastettujen kirjastojen puhdistus** – sekvensointiin valmiit rikastetut kirjastot puhdistetaan raepuhdistustoimenpiteellä.
- **Sekvensointi** – rikastettujen kirjastojen sekvensointi suoritetaan MiSeqDx-, NextSeq 550Dx- tai NovaSeq 6000Dx -sekvensointijärjestelmissä. MiSeqDx- ja NextSeq 550Dx -järjestelmissä integroitua DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager -moduulia käytetään ajon asetusten sekvensointiin, ajon valvontaan ja FASTQ-tiedostojen luomiseen emästen tunnistuksesta. NextSeq 550Dx -laitteessa, jossa on DRAGEN Server ja NovaSeq 6000Dx -laitteessa, DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellusta käytetään ajoasetusten määrittämiseen ja toissijaiseen analyysiin useiden käytettävissä olevien työkulkujen avulla.

Menetelmän rajoitukset

- *In vitro* -diagnostiseen käyttöön.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva ihmisen soluista ja kudoksesta saatavan genomi-DNA:n kanssa.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva 50–1 000 ng:n suuruisten kaksijuosteisten gDNA-syötteiden kanssa. Suorituskykyä ei taata, mikäli syötteet jäävät näiden kynnysten ulkopuolelle.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja ei sisällä reagensseja DNA:n eristystä varten. Analyytiset testaustulokset, muun muassa interferenssitestaus, jotka ilmoitetaan kohdassa [Suorituskykyominaisuudet sivulla 58](#), on saatu käyttämällä kokoverta ja FFPE:tä edustavina näytetyyppeinä edustavien DNA-eristyssarjojen avulla. Kaikki diagnostiset testit, jotka on kehitetty käytettäväksi Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan reagenssien kanssa, edellyttävät kaikkien suorituskyknäkökohtien täydellistä validointia valitulla DNA-eristyssarjalla.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan käyttöä ei suositella huonolaatuisille FFPE-näytteille, joiden ΔCq -arvo > 5. Sellaisten näytteiden käyttö, joiden ΔCq -arvo on > 5, voi lisätä kirjaston valmistelun epäonnistumisen todennäköisyyttä ja heikentää määrityksen suorituskykyä.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan reagenssit on määritetty ja testattu seuraavassa taulukossa ilmoitetun näyttesyötteen, rikastusreaktioiden ja pleksisyyden osalta.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja	Näyttesyöte	Rikastusreaktiot	Rikastuksen pleksisyys
16 näytteen sarja	Heikko laatu (FFPE)	16 reaktiota	1 pleksi
96 näytteen sarja	Korkea laatu (esim. kokoveri)	8 reaktiota	12 pleksiä

- FFPE-syötteen käsittely on testattu ja sitä suositellaan ainoastaan 1 pleksin rikastusreaktioille, kun käytetään 16 näytteen sarjaa.
- 96 näytteen sarjassa muut kuin vakiopleksisyys (2 pleksistä 11 pleksiin) ovat mahdollisia, mutta niihin liittyvät seuraavat rajoitukset:
 - 2–11 pleksin rikastusreaktioissa olevien näytteiden käsittely alentaa sarjan käsittelynopeutta.
 - Optimaalisia tuloksia ei taata. Sopivan rikastustuotoksen saaminen muun kuin vakiopleksisyyden kohdalla saattaa edellyttää lisäoptimointia.
 - Alhaisen pleksisyyden poolausstrategioissa (2-pleksisestä 8-pleksiseen) on valittava monimuotoisilla sekvensseillä varustettuja indeksisovittimia, jotta voidaan optimoida väritasapaino, jota vaaditaan onnistuneeseen sekvensointiin ja tietoanalyysiin. MiSeqDx:n ja NextSeq 550Dx:n DNA Generate FASTQ Dx -moduulissa tarjotaan vaihtoehtoja väritasapainotettuja indeksiyhdistelmiä varten ajon määrittämisen aikana. Lisätietoja poolausstrategioista on kohdassa [Poolausmenetelmät sivulla 34](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarja on rajoitettu toimittamaan rikastettuja kirjastoja, jotka on sekvensoitu vain MiSeqDx-, NextSeq 550Dx- ja NovaSeq 6000Dx -laitteilla. Muiden sekvensointijärjestelmien käyttö edellyttää kaikkien suorituskykykohtien täydellistä validointia.
- Rikastuspaneelija ei toimiteta osana tätä tuotetta. Analyttiset testaustulokset, jotka on ilmoitettu kohdassa [Suorituskykyominaisuudet sivulla 58](#), on saatu aikaan edustavilla rikastuspaneelilla, ja ne ilmoitetaan vain tiedonantotarkoituksissa. Analyttisiä suorituskykyominaisuuksia käytetään esimerkkeinä määrittämisen yleisestä kapasiteetista, eikä niillä määritetä tiettyjen määrittämiseen liittyviä väitteitä koskevaa kapasiteettia tai soveltuvuutta. Kaikki diagnostiset testit, jotka on kehitetty käytettäväksi näiden reagenssien kanssa, edellyttävät täyttä validointia kaikkien suorituskykykohtien kohdalla.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva sekä Illumina n että kolmannen tahon rikastuspaneelien kanssa. Muiden kuin paneelivaatimukset täyttävien kolmannen tahon rikastuspaneelien suorituskykyä ei kuitenkaan taata. Tietoa paneelista koskevista vaatimuksista on kohdassa [Rikastusanturipaneelin vaatimukset sivulla 10](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja käyttää 2 tunnin hybridisaatioaikaa. Pidemmän hybridisaatioajan käyttö saattaa vaikuttaa suorituskykykymittareihin.

- MiSeqDx- ja NextSeq 550Dx -laitteille tarkoitetut DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager -moduulit tuottavat vain FASTQ-tiedostoja. Jos näitä moduuleja käytetään, tällöin on suoritettava toissijaisen analyysin validointi.
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellus on käytettävissä NextSeq 550Dx -laitteessa, jossa on DRAGEN Server ja NovaSeq 6000Dx -laitteessa. Sovellus tukee useita toissijaisen analyysin työkujuja, mukaan lukien FASTQ-tiedostojen tuottaminen, FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottaminen ituratavarianttien tunnistukseen sekä FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottaminen somaattisten varianttien tunnistukseen. Jos käytät sovellusta VCF-tiedostojen tuottamiseen, sinun ei tarvitse suorittaa toissijaisen analyysin validointia. Sovelluksen rajoitteita ovat seuraavat:
 - Insertioita, joiden pituus > 18 bp, ja deleetioita, joiden pituus > 21 bp, ei ole validoitu.
 - Suuret variantit, muun muassa moninukleotidivariantit (MNV:t) ja suuret indelit, voidaan ilmoittaa erillisinä pienempinä variantteina VCF-tulostetiedostossa.
 - Pienet MNV:t ilmoitetaan erillisinä variantteina VCF-tulostetiedostoissa.
 - Deleetioista ilmoitetaan VCF-tiedostossa VCF-formaatin edellisen emäksen koordinaateissa. Näin ollen ota huomioon viereiset variantit ennen kuin ilmoitat yksittäisen emästunnistuksen homotsygoottiseksi referenssiksi.
 - Ituratakohtaiset rajoitukset:
 - DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen Germline FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulku on suunniteltu tuottamaan kvalitatiivisia tuloksia ituratavarianttien (esim. homotsygoottinen, heterotsygoottinen, wild-tyyppinen) tunnistusta varten.
 - Jäljennösmäärien variaatio saattaa vaikuttaa siihen, tunnistetaanko variantti homotsygoottiseksi vai heterotsygoottiseksi.
 - Järjestelmä ei raportoi useampaa kuin kaksi varianttia yhdessä sijainnissa, vaikka kopiolukuvariaatiota esiintyisikin.
 - Somaattis-spesifiset rajoitukset:
 - DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen somaattisten FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulku on suunniteltu tuottamaan kvalitatiivisia tuloksia somaattisten varianttien tunnistusta varten (ts. somaattisen variantin esiintyminen).
 - Somaattisten FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottamisen analyysityönkulku ei voi erotella iturata- ja somaattisten varianttien välillä. Kyseinen työkuju on suunniteltu havaitsemaan variantteja erilaisilla varianttitiheyksillä, mutta varianttitiheyttä ei voi käyttää erottelemaan somaattisia variantteja ituratavarianteista.
 - Näytteessä oleva normaali kudus vaikuttaa varianttien toteamiseen. Ilmoitettu toteamisraja perustuu varianttitiheyteen suhteessa sekä tuumorista että normaalista kudoksesta poimittuun kokonais-DNA:han.
 - Jos samassa sijainnissa tunnistetaan useampi kuin yksi varianttialleeli, mitään alleeleista ei raportoida läpäisevinä variantteina. Sen sijaan koko alleelien sarja raportoidaan, mutta suodatetaan monialleelisen tunnisteen kautta.

Tuotteen osat

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarja koostuu seuraavista komponenteista:

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx UD-indeksijoukolla A, luettelonro 20051354 (16 näytettä), tai nro 20051352 (96 näytettä)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx UD-indeksijoukolla B, luettelonro 20051355 (16 näytettä), tai nro 20051353 (96 näytettä)
- Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx -moduuli NextSeq 550Dx -laitetta varten, luettelonro 20063024
- Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx -moduuli MiSeqDx -laitetta varten, luettelonro 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellus NovaSeq 6000Dx -laitetta varten, luettelonro 20074609
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellus NextSeq 550Dx -laitetta varten, luettelonro 20074730

Mukana tulevat reagenssit

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx:n suorittaminen loppuun edellyttää Illumina DNA Prep with Enrichment Dx:ää, jossa on UD-indeksijoukko A tai Illumina DNA Prep with Enrichment Dx:ää, jossa on UD-indeksijoukko B. Voit suorittaa seuraavan määrän kirjaston valmisteluja ja rikastusreaktioita 16 näytteen tai 96 näytteen sarjalla.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja	Näytesyöte	Rikastusreaktiot	Rikastuksen pleksisyys
16 näytteen sarja	Heikko laatu (FFPE)	16 reaktiota	1 pleksi
96 näytteen sarja	Korkea laatu (esim. kokoveri)	8 reaktiota	12 pleksiä

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx UD-indeksijoukolla A/B

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 säilytetään 15 – 30 °C:n lämpötilassa

Seuraavat reagenssit toimitetaan huoneenlämpötilassa. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

Reagenssin nimi	Putkimäärä		Korkin väri	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat
	16 näytettä (nro 20050020)	96 näytettä (nro 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Punainen	350 µl	Puhdistusaineliuos vedessä.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Vihreä	41 ml	Puhdistusainetta ja suolaa sisältävä puskuroitu vesiliuos
Cleanup Beads (CB)	1	-*	Punainen	10 ml	Kiinteän faasin paramagneettiset rakeet puskuroidussa vesiliuoksessa.

*96 näytteen kohdalla Cleanup Beads -puhdistusrakeet sisältyvät Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples -tuotteeseen (luettelonro 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 Samples) säilytetään 15 – 30 °C:n lämpötilassa

96 näytteen sarjassa Cleanup Beads -puhdistusrakeet sisältyvät Illumina Prep Dx Cleanup Beadsiin (luettelonro 20050030). Seuraava reagenssi toimitetaan huoneenlämpötilassa. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi. 16 näytteen sarjoissa Cleanup Beads -puhdistusrakeet sisältyvät Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1:een (luettelonro 20050020).

Reagenssin nimi	Määrä	Korkin väri	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat
Cleanup Beads (CB)	4	Punainen	10 ml	Kiinteän faasin paramagneettiset rakeet puskuroidussa vesiliuoksessa.

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2 säilytetään 2 – 8 °C:n lämpötilassa

Seuraavat reagenssit lähetetään jääkaappikylmänä. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi. Säilytä eBLTS-varastoputkea pystyasennossa niin, että rakeet on aina upotettu puskuuriin.

Reagenssin nimi	Putkimäärä		Korkin väri	Täyttötilavuus		Aktiiviset ainesosat
	16 näytettä (nro 20050021)	96 näytettä (nro 20050026)		16 näytettä	96 näytettä	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Keltainen	200 µl	290 µl	Magneettiset streptavidinirakeet, jotka on linkitetty transposoneilla puskuroituun vesiliuokseen, joka sisältää glyserolia, EDTA:ta, dithiotreitolia, suolaa ja puhdistusainetta.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Kirkas	1,8 ml	1,8 ml	Puskuroitu vesiliuos

illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3 säilytetään -25 – -15 °C:n lämpötilassa

Seuraavat reagenssit lähetetään pakastettuna. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

Reagenssin nimi	Putkimäärä		Korkin väri	Täyttötilavuus		Aktiiviset ainesosat
	16 näytettä (nro 20050022)	96 näytettä (nro 20050027)		16 näytettä	96 näytettä	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Kirkas	290 µl	290 µl	Magnesiumsuolaa ja dimetyyliformamidia sisältävä puskuroitu vesiliuos.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Kirkas	200 µl	610 µl	DNA:n polymeraasi ja dNTPt puskuroidussa vesiliuoksessa.

illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 samples) säilytetään 2 – 8 °C:n lämpötilassa

16 näytteen sarjojen kohdalla seuraavat reagenssit on sisällytetty illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1:een (luettelonro 20050023). 96 näytteen sarjojen kohdalla reagenssit on sisällytetty illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1:een (luettelonro 20050028).

Seuraavat reagenssit lähetetään jääkaappikylmänä. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

Reagenssin nimi	Putkimäärä	Korkin väri	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Kirkas	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads -magneettirakeet puskuroidussa vesiliuoksessa, joka sisältää formamidia, puhdistusainetta ja suolaa.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Kirkas	1,8 ml	Puskuroitu vesiliuos
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Kirkas	200 µl	Puhdistusainetta ja suolaa sisältävä puskuroitu vesiliuos
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Kirkas	200 µl	Puskuroitu vesiliuos

illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 samples) säilytetään 2–8 °C:n lämpötilassa

96 näytteen sarjojen kohdalla seuraavat reagenssit on sisällytetty illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1:een (luettelonro 20050028). 16 näytteen sarjojen kohdalla reagenssit on sisällytetty illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1:een (luettelonro 20050023).

Seuraavat reagenssit lähetetään jääkaappikylmänä. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

Reagenssin nimi	Putkimäärä	Korkin väri	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Kirkas	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads -magneettirakeet puskuroidussa vesiliuoksessa, joka sisältää formamidia, puhdistusainetta ja suolaa.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Kirkas	1,8 ml	Puskuroitu vesiliuos
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Kirkas	200 µl	Puhdistusainetta ja suolaa sisältävä puskuroitu vesiliuos
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Kirkas	200 µl	Puskuroitu vesiliuos

illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2 säilytetään -25 – -15 °C:n lämpötilassa

Seuraavat reagenssit lähetetään pakastettuna. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

Reagenssin nimi	Putkimäärä		Korkin väri	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat
	16 näytettä (nro 20050024)	96 näytettä (nro 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Kirkas	580 µl	Puhdistusaineliuos vedessä.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Kullanruskea	4,1 ml	Suoloja ja puhdistusainetta sisältävä puskuroitu vesiliuos.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Kirkas	320 µl	PCR-alukesekoite (oligonukleotidit).
2 N NaOH (HP3)	1	1	Kirkas	200 µl	2 N natriumhydroksidiliuos (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Sininen	480 µl	Puskuroitu vesiliuos Cot-1 DNA:lla, tihennysaineella ja formamidilla
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Kirkas	200 µl	DNA:n polymeraasi ja dNTPt puskuroidussa vesiliuoksessa.

illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, säilytetään -25 – -15 °C:n lämpötilassa

Seuraavat reagenssit lähetetään pakastettuna. Laita reagenssit pikaisesti säilöön ilmoitetussa säilytyslämpötilassa asianmukaisen suorituskyvyn varmistamiseksi. Katso indeksiaadapterin sekvenssit [Liite: illumina UD -indeksisovitinsekvenssit sivulla 63](#).

Osa	Määrä
illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Indexes), nro 20050038	1
illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 Indexes), nro 20050039	1

Erikseen hankittavat reagenssit

Erikseen hankittavat pakolliset reagenssit

- DNA-eristys- ja puhdistusreagenssit
- DNA-kvantifointireagenssit
- Etanoli (200-kelpoinen molekyylibiologiaan)
- Nukleasiton vesi
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 1 N NaOH -liuos, molekyylibiologiaa
- Jos käytössä on NextSeq 550Dx -sekvensointijärjestelmä:
 - 200 mM Tris, pH 7,0 (voidaan laimentaa 1 M Tris-HCL:stä, pH 7,0)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (luettelonro 20028871)
- Jos käytössä on MiSeqDx-sekvensointijärjestelmä:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (luettelonro 20037124)
- Jos käytössä on NextSeq 6000Dx -sekvensointijärjestelmä:
 - 400 mM Tris, pH 8,0 (voidaan laimentaa 1 M Tris-HCL:stä, pH 8,0)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (luettelonro 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (luettelonro 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (luettelonro 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (luettelonro 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (luettelonro 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (luettelonro 20062291)

Rikastusanturipaneelin vaatimukset

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan reagenssit ovat yhteensopivia sekä Illumina että kolmansien tahojen DNA-rikastusoligonukleotidipaneelien kanssa. Jos käytetään kolmannen tahon biotinyloituja DNA-antureita (kiinteät tai mukautetut paneelit), varmista, että ne ovat vaadittavien teknisten tietojen mukaisia.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarja on optimoitu ja validoitu seuraavien kolmannen tahon paneelien koskevien teknisten tietojen avulla. Vertailukelpoista suorituskykyä ei taata käytettäessä kolmansien tahojen paneelien, jotka eivät ole teknisten tietojen mukaisia.

- Anturin pituus 80 bp tai 120 bp
- 500–675 000 anturin välillä
- Yksi- tai kaksisäikeinen DNA
- Anturin kokonaissyöte ≥ 3 pmol rikastukseen, kun pleksisyys vaihtelee 1-pleksisestä 12-pleksiseen

Säilytys ja käsittely

- Huoneenlämpötilan määritelmänä on 15–30 °C.
- Reagenssit ovat stabiileja pakkauksen merkinnöissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään asti, kun niitä säilytetään ilmoitetuissa olosuhteissa. Katso säilytyslämpötilat kohdasta [Mukana tulevat reagenssit sivulla 5](#).
- Pakastetut reagenssit ovat stabiileja enintään neljän sellaisen jäädytys-/sulatussyklin ajan, jotka suoritetaan ennen määritettyä viimeistä käyttöpäivää.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -menetelmä sisältää seuraavat turvalliset pysäytyskohdat:
 - [Tagmentoidun DNA:n monistaminen sivulla 28](#) monistetut kirjastot ovat stabiileja enintään 30 vuorokautta -25 – -15 °C:n lämpötilassa säilytettynä.
 - [Kirjastojen puhdistus sivulla 31](#) puhdistetut monistetut kirjastot ovat stabiileja enintään 30 vuorokautta -25 – -15 °C:n lämpötilassa säilytettynä.
 - [Esirikastettujen kirjastojen poolaus sivulla 33](#) poolatut kirjastot ovat stabiileja enintään 30 vuorokautta -25 – -15 °C:n lämpötilassa säilytettynä.
 - [Rikastetun kirjaston monistaminen sivulla 44](#) rikastettujen monistettujen kirjastojen levy voi jäädä lämpöblokkiin enintään 24 tunniksi. Vaihtoehtoisesti levyä voidaan säilyttää 2–8 °C:n lämpötilassa enintään 48 tuntia.
 - Lopulliset puhdistetut rikastetut kirjastot ovat stabiileja enintään 7 vuorokautta -25 – -15 °C:n lämpötilassa säilytettynä.
- Jos pakkaus tai Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan sisältö vaurioituu tai vaarantuu, ota yhteyttä Illumina:n asiakaspalveluun.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) saattaa muodostaa näkyviä saostumia tai kiteitä. Jos havaitaan saostumia, lämmitä 37 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia ja vorteksoi sitten, kunnes saostumat liukenevat.
- Hybridisaatio-oligot (HYB) ja Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) on esilämmitettävä samaan lämpötilaan kuin näytetyypin ja anturipaneelin mukainen hybridisaation pitolämpötila. Katso lisätietoja NHB2:n ja EEW:n käsittelystä kohdasta [Menetelmää koskevia huomautuksia sivulla 16](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) ja HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) saattavat aiheuttaa kiteitä ja sameutta. Jos havaitaan kiteitä ja sameutta, vorteksoi tai sekoita pipetoimalla ylös ja alas, kunnes liuos on kirkasta. Varmista, että NHB2 esilämmitetään ennen pipetointia.
- Noudata Cleanup Beads (CB) -puhdistusrakeiden käsittelyn yhteydessä seuraavia parhaita käytäntöjä:
 - Älä koskaan pakasta rakeita.

- Vorteksoi rakeita juuri ennen käyttöä, kunnes ne ovat suspendoituneet uudelleen ja kunnes väri vaikuttaa tasaiselta.
- Noudata Enrichment BLT Small (eBLTS) -puhdistusrakeiden käsittelyn yhteydessä seuraavia parhaita käytäntöjä:
 - Säilytä eBLTS-putkea pystyasennossa niin, että rakeet on aina upotettu puskuriiin.
 - Vorteksoi eBLTS:ää perusteellisesti, kunnes rakeet on suspendoitu uudelleen. Jotta voidaan välttyä rakeiden uudelleenasetumiselta, sentrifugointia ei suositella ennen pipetointia.
 - Jos rakeet kiinnittyvät 96 levyn sivulle tai yläosaan, sentrifugoi 280 × g:ssa 3 sekuntia ja uudelleensuspendoi sen jälkeen pipetoimalla.
- Noudata indeksisovitinlevyjen käsittelyn yhteydessä seuraavia parhaita käytäntöjä:
 - Älä lisää näytteitä indeksisovitinlevylle.
 - Kaikki indeksilevyn kuopat ovat kertakäyttöisiä.

Tarvittavat välineet ja materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Varmista ennen protokollan käynnistämistä, että sinulla on tarvittavat laitteet ja materiaalit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan lisäksi.

Laitteet

Varmista, että käytössäsi on kaikki vaaditut laitteet ennen protokollan aloittamista.

Protokolla on optimoitu ja validoitu luettelon teknisten tietojen avulla. Vertailukelpoista suorituskykyä ei taata teknisten vaatimusten ulkopuolelle jääviä laitteita käytettäessä.

Joitakin materiaaleja tarvitaan vain tiettyihin työkuuluihin. Ne on määritetty erillisissä taulukoissa.

- PCR-laite, jolla on seuraavat ominaisuudet:
 - Lämmitetty kansi
 - Lämpötilan vähimmäissäätoalue 10–98 °C
 - Lämpötilan vähimmäistarkkuus ±0,25 °C
 - Enimmäisreaktiotilavuus 100 µl
 - Yhteensopiva full-skirted-tyyppisten 96 kuopan PCR-levyjen kanssa
- Mikronäytteen inkubaattori seuraavin teknisin tiedoin:
 - Ympäristön lämpötila-alue +5,0–99,0 °C
 - Yhteensopiva 96 kuopan MIDI-levyjen kanssa
- Mikronäytteen inkubaattori-insertit, jotka ovat yhteensopivia 96 kuopan MIDI-levyjen kanssa
- Suurnopeuksinen mikrolevyravistin, jonka sekoitusnopeusalue on 200–3 000 kierrosta minuutissa

- 96 kuopan PCR-levyjen kanssa yhteensopiva magneettinen jalusta
- 96 kuopan MIDI-levyjen kanssa yhteensopiva magneettinen jalusta
- Kvantifointimenetelmän kanssa yhteensopiva fluoromittari
- DNA-fragmenttianalysointilaite
- Tarkkuuspipetit:
 - 10 µl:n yksi- ja monikanavapipetit
 - 20 µl:n yksi- ja monikanavapipetit
 - 200 µl:n yksi- ja monikanavapipetit
 - 1 000 µl:n yksikanavapipetit
 - Tarkkuuspipeteillä varmistetaan tarkka reagenssien ja näytteiden toimitus. Yksikanavaisia tai monikanavaisia pipettejä voidaan käyttää, jos ne kalibroidaan säännöllisesti ja jos ne ovat tarkkoja 5 %:n sisällä ilmoitetusta tilavuudesta.
- Mikrolevysentrifugi
- Mikrosentrifugi
- Yksi seuraavista Illumina-sekvensointijärjestelmistä:
 - MiSeqDx Instrument, luettelonro DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx -instrumentti, luettelonro 20005715 ja valinnainen Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx -palvelin, luettelonro 20086130
 - NovaSeq 6000Dx -laite, luettelonro 20068232
- [Valinnainen] Tyhjiökeskitin
- [FFPE] Reaaliaikainen PCR-tunnistusjärjestelmä

Materiaalit

Varmista, että käytössäsi on kaikki vaaditut materiaalit ennen protokollan aloittamista.

Joitakin materiaaleja tarvitaan vain tiettyihin työkulkuihin. Ne on määritetty erillisissä taulukoissa.

Protokolla on optimoitu ja validoitu luettelon tuotteiden avulla. Vertailukelpoista suorituskykyä ei taata vaihtoehtoisia materiaaleja käytettäessä.

- Suodatetut pipettikärjet
- Kartiomaiset sentrifugiputket, 15 ml tai 50 ml
- 1,5 ml:n mikrosentrifugiputket
- RNAasittomat/DNAasittomat monikanava-reagenssisäiliöt, kertakäyttöiset
- RNAasittomat/DNAasittomat 8 putken rivit ja korkit
- Serologiset pipetit
- 96 kuopan polypropeeninen syväkuoppa-säilytyslevy, 0,8 ml (MIDI-levy)

- Kovakuoriset 96 kuopan full-skirted-tyypin PCR-levyt
- [FFPE] qPCR-laitteen kanssa yhteensopivat qPCR-levyt
- 96-kuoppalevyjen liimapintaiset sulkukannet, joilla on seuraavat ominaisuudet:
 - Irrotettavaa, optisesti kirkasta polyesteriä
 - Soveltuu skirted-tyypin PCR-levyille
 - Vahva liimapinta, joka kestää useita lämpötilanvaihteluja –40 °C–110 °C
 - DNAasiton/RNAasiton
- Muoviset tarvikkeet, jotka ovat yhteensopivia valitun kvantifiointimenetelmän kanssa
- Fluorometrinen dsDNA-kvantifiointisarja, joka on yhteensopiva valitun kvantifiointijärjestelmän kanssa:
 - Ennalta rikastettujen monistettujen kirjastojen kvantifiointiin voidaan käyttää laajan alueen kvantifiointisarjaa.
 - Rikastettujen kirjastojen kvantifioinnin kohdalla kvantifiointisarjan alue riippuu käytettävästä anturipaneelistä.
- Fragmenttianalyysisarja kirjaston kvalifiointiin valitulla kvalifiointijärjestelmällä:
 - Ennalta rikastettujen monistettujen kirjastojen kvalifiointiin voidaan käyttää laajan alueen kvalifiointisarjaa.
 - Rikastettujen kirjastojen kvalifioinnin kohdalla kvalifiointisarjan alue riippuu käytettävästä anturipaneelistä.
- [Valinnainen] sarja DNA:n eristykseen ihmisen soluista ja kudoksesta. Voit käyttää mitä tahansa validoitua eristämismenetelmää.

Näytteiden ottaminen, kuljettaminen ja säilyttäminen



HUOMIO

Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti tartuntavaarallisina aineina.

- Tämä määrittäminen on yhteensopiva ihmisen soluista ja kudoksesta saatavan genomi-DNA:n kanssa.
- Varmista kaupallisesti saatavilla olevan puhdistetun gDNA:n kohdalla, että näytteet on kuljetettu oikeissa olosuhteissa ja että niitä on säilytetty valmistajan ohjeiden mukaan. Noudata gDNA-sykliden säilytyksessä ja pakastuksessa sekä sulatuksessa parhaita käytäntöjä.
- Noudata kokoverisyötteen kohdalla veren keräystä, kuljetusta ja säilytystä koskevia vaatimuksia, joita sovelletaan valittuun DNA:n eristysmenetelmään. Mitä tahansa validoitua eristämismenetelmää voidaan käyttää. Kokoveren kuljetuksessa on noudatettava kaikkia maakohtaisia, osavaltiokohtaisia ja paikallisia sovellettavia säädöksiä etiologisten aineiden kuljetuksesta.

- DNA:n eristämiseen FFPE-kudoksesta voidaan käyttää mitä tahansa validoitua eristysmenetelmää. Noudata valittua eristysmenetelmää koskevia ohjeita ja suosituksia seuraavien käytäntöjen määrittämiseksi:
 - Formaaliiniinnitys- ja parafiiniupotusmenetelmä kudoksille eristetyn DNA:n parhaan laadun varmistamiseksi.
 - FFPE-näytteiden säilytys.
 - Aloitusmateriaalivaatimukset, kuten FFPE-osioiden määrä ja paksuus. Useimmissa puhdistusmenetelmissä suositellaan vastaleikattujen osioiden käyttöä.

Varoitukset ja varotoimet

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -reagenssisarja sisältää mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Saat ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta (SDS) osoitteessa support.illumina.com/sds.html.
- Kaikista tähän tuotteeseen liittyvistä vakavista vaaratilanteista on välittömästi ilmoitettava Illuminalle ja toimivaltaisille viranomaisille siinä valtiossa, missä käyttäjä ja potilas ovat.
- Käsittele kaikkia verinäytteitä aivan kuten niissä olisi tarttuvaa ihmisen immuunikatovirusta (HIV), ihmisen hepatiitti B -virusta (HBV) ja muita veren välityksellä tarttuvia taudinaiheuttajia (yleiset varotoimet).
- Noudata normaaleja laboratoriotyön varotoimia. Älä pipetoi suun avulla. Älä syö, juo tai tupakoi työhön varatuilla alueilla. Käytä kertakäyttöisiä hansikkaita ja laboratoriotakkeja, kun käsittelet näytteitä tai sarjareagensseja. Pese kädet huolellisesti näytteiden ja sarjareagenssien käsittelyn jälkeen.
- Näytteen tai reagenssin huononemisen estämiseksi on varmistettava, että puhdistuksen jättämät natriumhypokloriittihöyryt ovat haihtuneet täysin ennen protokollan aloittamista.
- Näytteiden kontaminoituminen muilla PCR-tuotteilla/amplikonilla saattaa aiheuttaa epätarkkoja ja epäluotettavia tuloksia. Voit välttyä kontaminaatiolta noudattamalla seuraavia parhaita käytäntöjä:
 - Noudata asianmukaisia laboriokäytäntöjä ja laboratoriohygieniaa.
 - Suorita työnkulun vaiheet nimetyillä monistusta edeltävillä tai sen jälkeisillä alueilla.
 - Säilytä reagensseja ennen kirjastojen puhdistusta monistusta edeltävällä alueella.
 - Erotta monistusta edeltävät reagenssit monistuksen jälkeisistä reagensseista.
 - Varmista, että monistusta edeltävän ja sen jälkeisen työn alueilla on omat laitteet ja varusteet, kuten pipetit, pipettikärjet, vorteksilaite ja sentrifugi.
- Vältä ristikontaminaatiota. Käytä uusia pipettikärkiä näytteiden välillä ja reagenssien lisäämisen välillä. Suodatettujen kärkien käyttö vähentää amplikonin siirtymisen ja näytteiden välisen ristikontaminaation riskiä.

- Kun lisätään tai siirretään näytteitä tai reagenssin Master-seoksia, vaihda kärkiä jokaisen näytteen välillä.
- Kun lisätään indeksisovittimia monikanavapipetillä, vaihda kärkiä kunkin rivin tai kunkin sarakkeen välillä. Jos käytetään yksikanavapipettejä, vaihda kärkiä jokaisen näytteen välillä.
- Poista käyttämättömät indeksisovitinlevyt työskentelyalueelta.
- Noudata etanolipesuvaiheissa seuraavia parhaita käytäntöjä:
 - Valmista aina tuoretta 80 %:n etanolia. Etanoli voi absorboida vettä ilmasta, mikä saattaa vaikuttaa tuloksiin.
 - Varmista, että etanoli poistetaan kuoppien pohjalta pesuvaiheiden aikana. Etanolijäämät saattavat vaikuttaa tuloksiin.
 - Varmista täydellinen haihtuminen noudattamalla magneettisen jalustan vaiheille määritettyä kuivumisaikaa. Etanolin jäämät voivat vaikuttaa myöhempien reaktioiden toimintaan.
- Valmista Master-seokset aina ennen käyttöä äläkä koskaan säilytä yhdistettyjä työliuoksia.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan suorituskykyä ei taata, kun toimenpiteitä ei noudateta pakkausselosteessa mainitulla tavalla.
- Sarjan komponentteja ei saa käyttää sarjan etiketissä mainitun viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen.
- Älä vaihda eri Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -pakkauserien määrityskomponentteja keskenään. Sarjat tunnistetaan sarjan etiketistä.

Menetelmää koskevia huomautuksia

DNA-syötesuositukset

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -protokolla on yhteensopiva korkealaatuisen kaksisäikeisen 50–1 000 ng:n genomi-DNA-syötteiden (gDNA) kanssa.

Varmista, että alustava gDNA-näyte ei sisällä > 1 mM EDTA:ta ja että siinä ei ole orgaanisia epäpuhtauksia, kuten fenolia ja etanolia. Nämä aineet saattavat häiritä tagmentointireaktiota ja johtaa määrittämisen epäonnistumiseen.

gDNA-syöte \geq 50 ng

Välillä 50–1 000 ng olevien gDNA-syötteiden kohdalla alustavan gDNA-näytteen kvantifiointia ja normalisointia ei tarvita.

gDNA-syöte < 50 ng

10–50 ng:n DNA-syötteitä voidaan käyttää seuraavin säädöin:

- Jos käytetään 10–49 ng:n gDNA-syötettä, suositellaan alustavan gDNA-näytteen kvantifiointia tagmentoinnin jälkeen tarvittavien PCR-jaksojen määrän määrittämiseksi. Käytä fluorometriapohjaista menetelmää kaksisäikeisten gDNA-syötteen kvantifiointiin. Vältä menetelmiä, joilla mitataan kokonaisnukleinihappoa, kuten NanoDropia tai muita UV-absorbointimenetelmiä.
- Tämä protokolla ei normalisoi lopullisia esirikastettuja kirjastosaantoja 10–49 ng gDNA:sta ja näin ollen on suoritettava kirjastojen kvantifiointi ja normalisointi ennen rikastusta ja sen jälkeen.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarja on luonnehdittu ja tarkistettu 50–1 000 ng:n DNA-syötteiden kohdalla. Vastaavaa tuotesuorituskykyä ei voida taata < 50 ng:n gDNA-syötteiden kohdalla.

Verisyötesuoritukset

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja on yhteensopiva perifeerisestä kokoverestä eristetyn gDNA:n kanssa. Mitä tahansa validoitua eristämismenetelmää voidaan käyttää. Kun gDNA:ta eristetään kokoverestä, syöte-DNA:n alustavaa kvantifiointia ei tarvita, ja Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja tuottaa normalisoituja esirikastettuja kirjastosaantoja.

Seuraavat tekijät saattavat vaikuttaa kielteisesti kokoverinäytteistä saadun DNA:n määrään ja näin ollen kirjaston normalisointiin:

- Verinäytteen ikä
- Säilytysolosuhteet
- Taustalla olevat sairaudet, jotka vaikuttavat valkosolumäärään

FFPE-kudosnäytesyötettä koskevat suositukset

Käytä onnistuneeseen kirjaston valmisteluun tarvittavan asianmukaisen syötteen määrittämiseen seuraavia FFPE DNA laatukriteereitä:

- Sellaisten FFPE-näytteiden kohdalla, joiden ΔCq -arvo on ≤ 5 , suositeltu DNA-syöte on is 50–1 000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sarjaa ei suositella huonolaatuisille FFPE-näytteille, joiden ΔCq -arvo on > 5 . Sellaisten näytteiden käyttö, joiden ΔCq -arvo on > 5 , on mahdollista, mutta se voi lisätä kirjaston valmistelun epäonnistumisen todennäköisyyttä tai heikentää määrittämisen suorituskykyä.

FFPE:n eristäminen

Käytä nukleinihapon eristysmenetelmää, joka saa aikaan palautusasteeltaan korkeita saantoja, vähentää näytteen kulutuksen minimiin ja säilyttää näytteen eheyden. Voit käyttää FFPE-näytteiden kohdalla mitä tahansa validoitua DNA:n eristämismenetelmää. Kun gDNA:ta eristetään FFPE-kudoksesta, on suoritettava syöte-DNA:n alustava kvantifiointi, ja Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarja ei tuota normalisoituja esirikastettuja kirjastosaantoja.

FFPE DNA -kvalifiointi

FFPE-kudoksesta eristetty gDNA on kvalifioitava ennen käyttöä. Arvioi optimaalisen suorituskyvyn aikaansaamiseksi DNA-näytteen laatu FFPE-näytteistä eristetyn DNA:n kvalifiointiin tarkoitetulla validoidulla eristysmenetelmällä. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -protokolla on yhteensopiva FFPE-DNA-näytteiden kanssa, joiden ΔCq -arvo on ≤ 5 . Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan käyttö ei ole suositeltavaa huonolaatuisille FFPE-näytteille, joiden ΔCq -arvo on > 5 . Sellaisten näytteiden käyttö, joiden ΔCq -arvo on > 5 , on mahdollista, mutta se voi lisätä kirjaston valmistelun epäonnistumisen todennäköisyyttä tai heikentää määrittelyn suorituskykyä.

[Valinnainen] FFPE-viitenäytteet

Käytä Horizon HD799:n (DNA) kaltaisia luonnehdittuja viitemateriaaleja positiivisena kontrollina protokollan suorittamisen yhteydessä. Solulinjojen heterogرافteista saatavia kvalifioituja FFPE-materiaaleja voidaan myös käyttää viitenäytteinä. Käytä fluorometriapohjaista menetelmää viitemateriaalien kvantifiointiin ennen käyttöä.

HUOMAUTUS Positiivisen kontrolliviitenäytteen tai mallittoman kontrollin ajaminen kuluttaa reagensseja ja vähentää sellaisten tuntemattomien näytteiden kokonaismäärää, joka voidaan käsitellä.

Näytesyötettä koskevat suositukset

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan näytesyötettä koskevat suositukset on tiivistetty seuraavassa taulukossa.

Taulukko 1 Näytesyötettä koskevat suositukset

Näytteen syötetyyppi	Näytesyötteen määrä	Tarvittavan syöte-DNA:n kvantifiointi	Vaadittava DNA-syötteen laatu	Normalisoidun esirikastetun kirjaston saanto
gDNA	10–49 ng	Kyllä	260/280-suhde 1,8–2,0	Ei
gDNA	50–1 000 ng	Ei	260/280-suhde 1,8–2,0	Kyllä
Verestä saatava gDNA	50–1 000 ng	Ei	260/280-suhde 1,8–2,0	Kyllä
FFPE:stä saatava gDNA	50–1 000 ng	Kyllä	ΔCq -arvo ≤ 5	Ei

eBLTS PCR -ohjelman suositeltuja PCR-syklejä säädetään näytesyötepitoisuuden ja -laadun perusteella. Lisätietoja on kohdassa [Tagmentoidun DNA:n monistaminen sivulla 28](#).

Vinkkejä ja tekniikoita

Ristikontaminaation välttäminen

- Kun lisätään tai siirretään näytteitä, vaihda kärkiä *jokaisen näytteen* välillä.
- Kun lisätään indeksisovittimia monikanavapipetillä, vaihda kärkiä *kunkin rivin* tai *kunkin sarakkeen* välillä. Jos käytetään yksikanavapipettejä, vaihda kärkiä jokaisen näytteen välillä.

Levyn sulkeminen

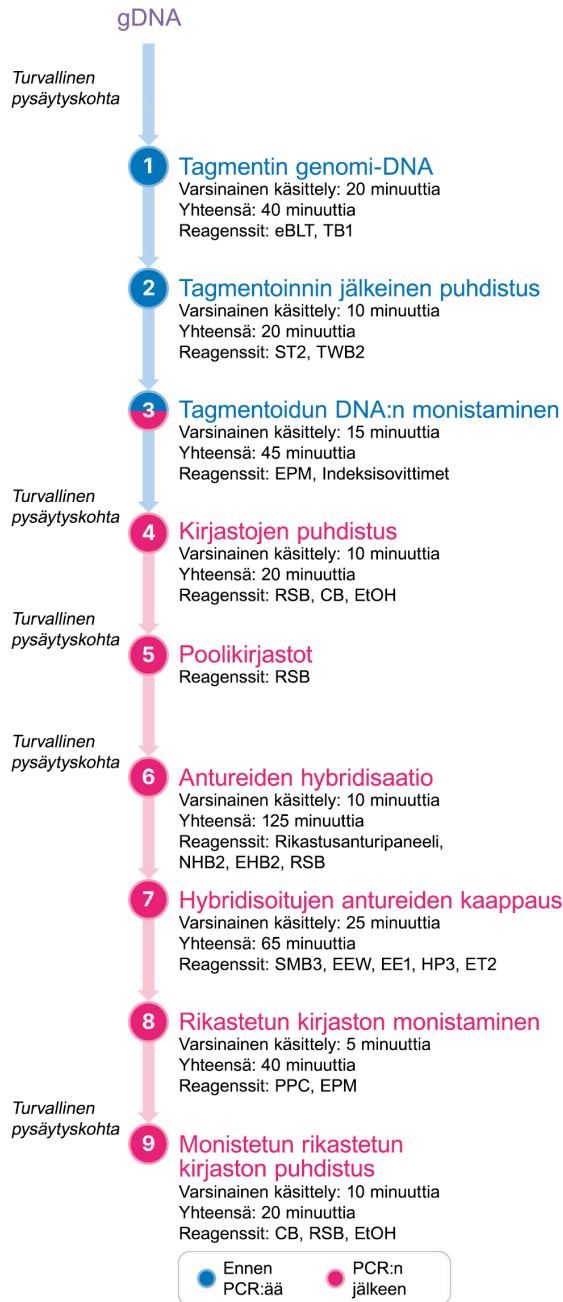
- Sulje 96 kuopan levy aina uudella liimapintaisella sululla käyttäen kumitulppaa levyn peittämiseen ennen protokollan seuraavia vaiheita:
 - Ravisteluvaiheet
 - Inkubointivaiheet. Mikäli levyä ei suljeta asianmukaisesti, se saattaa johtaa haihtumiseen inkuboinnin aikana.
 - Sentrifugointivaiheet
 - Hybridisaatiovaiheet
- Varmista, että reunat ja kuopat on suljettu täysin ristikontaminaatoriskin ja haihtumisriskin vähentämiseksi.
 - Mikäli sulussa tai levyn kuoppien sivuilla havaitaan nestettä tai kondensaatiota, sentrifugoi tarpeen mukaan ennen avaamista.
- Aseta levy tasaiselle pinnalle, ennen kuin poistat sulkukannen hitaasti.

Enrichment BLT Small (eBLTS) -reagenssin käsittely

- Säilytä eBLTS-varastoputkea pystyasennossa jääkaapissa niin, että rakeet on aina upotettu puskuriiin.
- Vorteksoi eBLTS-varastoputkea perusteellisesti välittömästi ennen käyttöä, kunnes rakeet suspendoiduvat uudelleen. Jotta voidaan välttyä rakeiden uudelleenasettamiselta, sentrifugointia ei suositella ennen pipetointia.
- Jos rakeet kiinnittyvät 96 levyn sivulle tai yläosaan, sentrifugoi $280 \times g$:ssa 3 sekuntia ja uudelleensuspendoi sen jälkeen pipetoimalla.
- Pestäessä eBLTS -reagenssia:
 - Käytä levyille sopivaa magneettista jalustaa.
 - Pidä levy magneettisella jalustalla, kunnes ohjeissa kehoitetaan poistamaan se.
 - Jos rakeet aspiroidaan pipettien kärkiin, annostele ne takaisin magneettisella jalustalla olevalle levyille ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja - työnkulku

Seuraava kaavio kuvaa illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -työnkulkua. Turvalliset pysähdyskohdat on merkitty vaiheiden väliin. Aika-arviot perustuvat 12 näytteen käsittelyyn 12 pleksin rikastuksen kohdalla.



Käyttöohjeet

Tässä luvussa kuvataan Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -protokolla.

- Tarkista suunniteltu täydellinen sekvensointityönkulku näytteestä analyysiin tuotteiden ja koeparametrien yhteensopivuuden varmistamiseksi.
- Vahvista ennen jatkamista sarjan sisältö ja varmista, että käytössä on tarvittavat komponentit, laitteet ja materiaalit.
 - Kolmannen tahon biotinyloitujen anturien on vastattava erityisiä vaatimuksia. Katso kohta [Rikastusanturipaneelin vaatimukset sivulla 10](#) varmistaaksesi, että kolmannen osapuolen anturit vastaavat vaatimuksia.
- Noudata protokollia esitettyssä järjestyksessä käyttämällä määritettyjä tilavuuksia ja inkubointiparametreja.
- Ellei turvallista pysähdyskohtaa ole määritetty protokollassa, jatka välittömästi seuraavaan vaiheeseen.
- Master-seosta luotaessa ylimitoitus sisältyy ilmoitettuihin tilavuuksiin.
- Varmista, että käytetään levytyypille sopivaa magneettista jalustaa.

Valmistelu poolausta varten

Tätä vaihetta tarvitaan rikastettujen kirjastojen onnistuneen sekvensoinnin varmistamiseen. Kirjastojen poolaus voidaan suorittaa ennen rikastusta ja ennen sekvensointia.

Ennen rikastusta – yksittäiset indeksoidut ja monistetut kirjastot poolataan yhteen valitun anturipaneelin avulla suoritettavaa rikastusta varten. Näin luodaan multipleksoitu rikastettujen kirjastojen pooli. FFPE-näytesyötteen kohdalla käsittely on testattu ja sitä suositellaan ainoastaan 1 pleksin rikastusreaktioille. Korkealaatuisen gDNA:n kohdalla 12-pleksinen on testattu, mutta vaihtoehto 2-pleksisestä 11-pleksiseen on mahdollinen.

Ennen sekvensointia – 1 pleksin rikastetut kirjastot ja/tai rikastetut multipleksikirjastot poolataan yhteen ennen sekvensointia. Sellaisten rikastettujen kirjastojen määrä, jotka voidaan sekvensoida, riippuu sekvensointijärjestelmän kunkin näytteen kohde-readin syvyydestä.

Ainutkertainen kaksoisindeksointi

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja käyttää ainutkertaisia kaksoisindeksejä.

- Kaksoisindeksoiduissa kirjastoissa lisätään indeksi 1 (i7)- ja indeksi 2 (i5) -sekvenssit ainukertaisesti merkittyjen kirjastojen luomiseksi.
- UP-indekseissä on erilliset toisiinsa liittymättömät indeksisekvenssit i7- ja i5-indeksireadin kohdalla. Indeksit ovat 10 emäksen pituisia.

Kun valitaan monimuotoisilla sekvensseillä varustettuja indeksisovittimia poolattuihin kirjastoihin, voidaan optimoida väritasapaino onnistuneeseen sekvensointiin ja tietanalyysiin. Pleksisyyspoolit, jotka ovat ≥ 10 -pleksisiä, ovat luonnostaan väritasapainotettuja, jotta voit käyttää mitä tahansa indeksisovitinyhdistelmää.

Sekvensointiajon aikana DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager -moduulissa tarjotaan vaihtoehtoja väritasapainotettuja indeksiyhdistelmiä varten ja ilmoitetaan, jos valituissa indeksiyhdistelmissä ei ole riittävästi monimuotoisuutta.

Lisätietoja Illumina UD-indeksisovitinsekvensseistä ja levyasetteluista on [Liite: Illumina UD -indeksisovitinsekvenssit sivulla 63](#)

Tuetut rikastuspleksisyydet

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan reagenssit on määritetty ja testattu 1 pleksin ja 12 pleksin rikastuspleksisyydellä. Vaikka muut rikastuspleksisyydet ovat mahdollisia, jotkin pleksisyydet edellyttävät ylimääräistä esirikastuskirjaston valmistelua ja rikastusanturipaneelin reagensseja.

Sopivan rikastustuoton aikaansaaminen muun kuin vakiorikastuspleksisyyden kohdalla saattaa edellyttää lisäoptimointia. Optimaalisia tuloksia ei taata.

- **Rikastuspleksisyys** – Esirikastettujen kirjastojen määrä (1–12) poolattuna yhteen rikastusreaktioon rikastusanturipaneeleilla suoritettavaa hybridisaatiota varten. Esimerkiksi 12 esirikastetun kirjaston yhdistäminen johtaa 12-pleksisen rikastuspoolin luontiin.
- **Rikastusreaktio** – Ainutkertaisten rikastusreaktiovalmistelujen määrä esirikastettujen reaktiota kohti poolattujen kirjastojen määrästä riippumatta. Esimerkiksi yksittäisellä rikastusreaktiolla voidaan valmistella 1-pleksinen tai 12-pleksinen rikastuspooli.

Jälkirikastettujen kirjastojen kokonaismäärän laskentaa varten on kerrottava reaktiokohtainen rikastuspleksisyys rikastusreaktioiden määrällä. Esimerkiksi 12 pleksin rikastuspoolin yksittäinen rikastusreaktio johtaa 12 jälkirikastetun kirjaston pooliin.

Esirikastettuja kirjastoja poolattaessa Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan reagenssit tukevat seuraavia rikastusreaktioita ja pleksisyyttä.

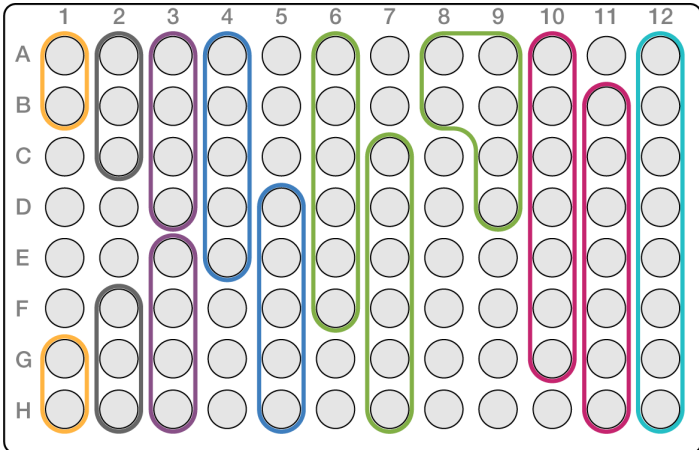
Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -reagenssit	Rikastusreaktiot	Rikastuksen pleksisyys
16 näytteen sarja	16 reaktiota	1 pleksi
96 näytteen sarja	8 reaktiota	12 pleksiä

Kaksi pleksiä kahdeksan pleksin poolausstrategioiden kautta

Seuraavassa taulukossa esitetään indeksisovittimet (kuopat), jotka voidaan yhdistää 2–8 pleksin poolissa, kun taas kukin yhdistelmä on havainnollistettu värikoodatulla kuvalla.

Poolaa mahdollinen pleksisyys, joka on ≥ 2 , sarakkeen ylä- tai alaosasta. Älä poolaa rivin poikki.

Pleksisyys	Yhdistelmät	Kuvan väri
2	Sarakkeen kaksi ensimmäistä tai kaksi viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A ja B • G ja H Rivejä C–F ei käytetä.	Oranssi
3	Sarakkeen kolme ensimmäistä tai kolme viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A–C • F–H Rivejä D ja E ei käytetä.	Harmaa
4	Sarakkeen neljä ensimmäistä tai neljä viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A–D • E–H 	Violetti
5	Sarakkeen viisi ensimmäistä tai viisi viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A–E • D–H 	Sininen
6	[Vaihtoehto 1] Sarakkeen kuusi ensimmäistä tai kuusi viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A–F • C–H [Vaihtoehto 2] Yhden sarakkeen kaksi ensimmäistä (A ja B) tai kaksi viimeistä kuoppaa (G ja H) ja mitkä tahansa neljä kuoppaa viereisessä sarakkeessa.	Vihreä
7	Sarakkeen seitsemän ensimmäistä tai seitsemän viimeistä kuoppaa: <ul style="list-style-type: none"> • A–G • B–H 	Vaaleanpunainen
8	Koko sarake.	Sinivihreä

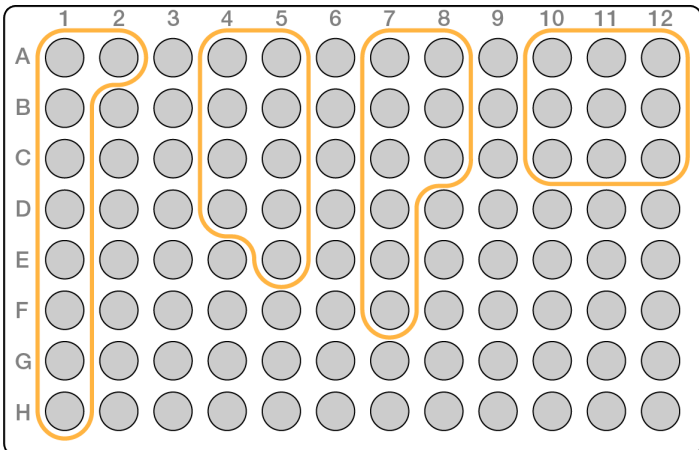


Yhdeksän pleksin poolausstrategiat

Käytä indeksisovittimia mistä tahansa kuopista, jotka optimoivat sekvensointiajon väritasapainon, esimerkiksi:

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

Seuraavassa kuvassa esitetään kaikki neljä esimerkkiä.



Tagmentin genomi-DNA

Tässä vaiheessa käytössä on Enrichment BLT Small (eBLTS) DNA:n tagmentointiin. Se on prosessi, jossa DNA fragmentoidaan ja merkitään sovitinsekvenssitunnisteilla.

Tarvikkeet

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (keltainen korkki)

- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nukleasiton vesi
- 96 kuopan PCR-levy
- Liimapintainen sulku
- 1,7 ml:n mikrosentrifugiputket
- 8 putken rivit
- Pipetin kärjet
 - 200 µl:n monikanavapipetit



HUOMIO

Tämä reagenssarja sisältää mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Saat ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta (SDS) osoitteessa support.illumina.com/sds.html.

Tietoa reagensseista

- eBLTS on säilytettävä 2–8 °C:n lämpötilassa. Älä käytä eBLTS -tuotetta, jota on säilytetty alle 2 °C:ssa.
- Älä sentrifugoi eBLTS -tuotetta.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Tuote	Säilytys	Ohjeet
eBLTS (keltainen korkki)	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita välittömästi ennen käyttöä vorteksoimalla. Älä sentrifugoi pipetoimalla.
TB1	-25 – -15 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla.

2. Vorteksoi tai pipetoi DNA ja sentrifugoi sen jälkeen lyhyesti.
3. Tallenna seuraava TAG-ohjelma lämpöblokissa:
 - Valitse esilämmitetyn kannen vaihtoehto ja aseta lämpötilaksi 100 °C
 - Aseta reaktiutilavuudeksi 50 µl
 - 55 °C 5 minuutin ajan
 - Pidä 10 °C:ssa

Toimenpide

1. Lisää 2–30 µl DNA:tä 96 kuopan PCR-levyn jokaiseen kuoppaan, jotta kokonaissyötemäärä on 50–1 000 ng. Jos DNA-tilavuus on < 30 µl, lisää nukleaasitonta vettä DNA-näytteisiin, jotta kokonaistilavuudeksi saadaan 30 µl.
2. Vorteksoi eBLTS:ää perusteellisesti, kunnes rakeet on suspendoitu kokonaan uudelleen.
3. Yhdistä seuraavat tilavuudet putkessa tagmentoinnin Master-seoksen valmistelua varten. Kerro kukin tilavuus käsiteltävien näytteiden määrällä.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Reagenssin ylimitoitus sisältyy tilavuuteen.
4. Sekoita tagmentoinnin Master-seos perusteellisesti sekoittamalla.
5. Jaa tagmentoinnin Master-seoksen tilavuus tasaisesti 8 putken riville.
6. Siirrä 200 µl:n monikanavapipetillä 20 µl tagmentoinnin Master-seosta näytteen sisältävän PCR-levyn kuhunkin kuoppaan. Käytä kuhunkin näytesarakkeeseen tai -riviin uusia kärkiä.
7. Hävitä 8 putken rivi tagmentoinnin Master-seoksen annostelun jälkeen.
8. Sekoita pipetoimalla 40 µl:aan asetetulla 200 µl:n monikanavapipetillä jokaista näytettä 10 kertaa. Käytä kuhunkin näytesarakkeeseen uusia kärkiä.
Sulje vaihtoehtoisesti PCR-levy ja ravista levyravistimella nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
9. Sulje levy ja aseta se sitten esiohjelmoituun lämpöblokkiin ja aja TAG-ohjelma.
10. Odota, kunnes TAG-ohjelmassa on saavutettu 10 °C:n pitolämpötila ja hävitä sen jälkeen levy välittömästi.
11. Laita 96 kuopan PCR-levyn jalusta huoneenlämpötilaan 2 minuutiksi ja jatka sen jälkeen seuraavaan vaiheeseen.

Tagmentoinnin jälkeinen puhdistus

Tässä vaiheessa sovitintunnisteella varustettu DNA pestään eBLTS:ssä ennen PCR:n monistusta.

Tarvikkeet

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96 kuopan PCR-levyn magneettinen jalusta
- Liimapintainen sulku
- 8 putken rivit
- Pipetin kärjet
 - 20 µl:n monikanavapipetit

- 200 µl:n monikanavapipetit
- Valmistele myöhempää toimenpidettä varten:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Indeksisovitinlevy

Tietoa reagensseista

- Varmista, että käytetään levyille sopivaa magneettista jalustaa. MIDI-levyn magneettisen jalustan käyttö PCR-levyn kanssa saattaa estää TWB2:n kiinnittymisen rakeisiin.
- Pipetoi TWB2 hitaasti vaahtoamisen minimoimiseksi, jotta voidaan välttää virheellinen tilavuuden aspirointi ja epätäydellinen sekoittuminen.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Tuote	Säilytys	Ohjeet
EPM	-25 – -15 °C	Sulata jäissä 1 tunti. Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi lyhyesti.
ST2	15 – 30 °C	Jos havaitaan saostumia, lämmitä 37 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia ja vorteksoi sitten, kunnes saostumat ovat liuenneet. Käytä huoneenlämpötilassa.
TWB2	15 – 30 °C	Käytä huoneenlämpötilassa.
Indeksisovitinlevy	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.

Toimenpide

1. Lisää 10 µl ST2:ta jokaiseen tagmentointireaktioon. Jos käytetään monikanavapipettiä, pipetoi ST2 8 putken riville ja siirrä sitten asianmukaiset tilavuudet PCR-levylle. Käytä kuhunkin näytesarakkeeseen tai -riviin uusia kärkiä.
2. Pipetoi 50 µl:aan asetetulla 200 µl:n pipetillä hitaasti jokainen kuoppa 10 kertaa rakeiden uudelleensuspendoimiseksi.
Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan. Toista tarpeen mukaan.
3. Sulje levy ja sentrifugoi sitten 280 × g:ssa 10 sekuntia.
4. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
5. Aseta PCR-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (3 minuuttia).
6. [≤ 48 näytettä] Pese kolme kertaa seuraavasti.
 - a. Poista ja hävitä 60 µl:aan asetetulla 200 µl:n monikanavapipetillä supernatantti raapellettiä häiritsemättä.

- b. Poista magneettijalustalta.
 - c. Lisää välittömästi tämän jälkeen hitaasti 100 µl TWB2:ta suoraan rakeille.
 - d. Pipetoi hitaasti, kunnes rakeet on suspendoitu kokonaan uudelleen. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
 - e. Mikäli ilmenee roiskumista, pyöritä alas 280 × g:ssa 10 sekuntia.
 - f. Aseta PCR-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (3 minuuttia). Jätä levy magneettiselle jalustalle ja TWB2 kuoppiin liiallisen kuivumisen estämiseksi kolmatta pesua suoritettaessa. Poista ja hävitä supernatantti PCR Master -seoksen valmistelun jälkeen.
 - g. Poista ja hävitä 100 µl:aan asetetulla 200 µl:n monikanavapipetillä supernatantti.
 - h. Toista vaiheet c–f kaksi kertaa, jotta suoritetaan yhteensä kolme pesua.
7. [> 48 näytettä] Pese kolme kertaa seuraavasti.
- a. Suorita vaiheet b ja c 1 sarakkeen tai 2 sarakkeen lisäyksin, kunnes kaikki sarakkeet on käsitelty liiallisen kuivumisen estämiseksi.
 - b. Poista ja hävitä 60 µl:aan asetetulla 200 µl:n monikanavapipetillä supernatantti.
 - c. Poista magneettijalustalta.
 - d. Annostele välittömästi tämän jälkeen hitaasti 100 µl TWB2:ta suoraan rakeille.
 - e. Pipetoi hitaasti, kunnes rakeet on suspendoitu kokonaan uudelleen. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
 - f. Mikäli ilmenee roiskumista, pyöritä alas 280 × g:ssa 10 sekuntia.
 - g. Aseta PCR-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (3 minuuttia). Jätä levy magneettiselle jalustalle ja TWB2 kuoppiin liiallisen kuivumisen estämiseksi kolmatta pesua suoritettaessa. Poista ja hävitä supernatantti PCR Master -seoksen valmistelun jälkeen.
 - h. Poista ja hävitä 100 µl:aan asetetulla 200 µl:n monikanavapipetillä supernatantti.
 - i. Poista magneettiselta jalustalta ja lisää hitaasti 100 µl TWB2:ta suoraan rakeille.
 - j. Toista vaiheet h ja i 1 tai 2 sarakkeen lisäyksin, kunnes kaikki sarakkeet on käsitelty.
 - k. Toista vaiheet e–h kaksi kertaa, jotta suoritetaan yhteensä kolme pesua.
8. Pidä magneettisella jalustalla 4 -kohdan *Toimenpide*-osion vaiheeseen 4 saakka. TWB2 jää kuoppiin rakeiden liiallisen kuivumisen ehkäisemiseksi.

Tagmentoidun DNA:n monistaminen

Tässä vaiheessa tagmentoitu DNA monistetaan rajoitettujen jaksojen PCR-ohjelmalla. PCR-vaiheessa lisätään Indeksien 1 (i7) sovittimet, Indeksien 2 (i5) sovittimet sekä sekvenssoinnin klusterin luontiin tarvittavat sekvenssit.

Tarvikkeet

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Indeksisovitinlevy

- 96 kuopan PCR-levy
- Nukleasiton vesi
- Liimapintainen sulku
- 1,5 ml:n mikrosentrifugiputket
- Pipetin kärjet
 - 20 µl:n monikanavapipetit
 - 200 µl:n monikanavapipetit

Tietoa reagensseista

- Indeksisovitinlevyt
 - Kuoppa saattaa sisältää > 10 µl indeksisovittimia.
 - Älä lisää näytteitä indeksisovitinlevylle.
 - Kaikki indeksilevyn kuopat ovat kertakäyttöisiä.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Tuote	Säilytys	Ohjeet
EPM	-25 – -15 °C	Sulata 4 °C:n lämpötilaan tai säilytä jäissä 1 tunti. Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi lyhyesti.
Indeksisovitinlevy	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.

2. Tallenna seuraava eBLTS PCR -ohjelma lämpöblokkiin käyttämällä alla olevassa taulukossa ilmoitettua asianmukaista PCR-jaksojen määrää.
 - Valitse esilämmitetyn kannen vaihtoehto ja aseta lämpötilaksi 100 °C
 - Aseta reaktiotilavuudeksi 50 µl
 - 72 °C 3 minuutin ajan
 - 98 °C 3 minuutin ajan
 - X jaksoa arvoilla:
 - 98 °C 20 sekunnin ajan
 - 60 °C 30 sekunnin ajan
 - 72 °C 1 minuutin ajan
 - 72 °C 3 minuutin ajan
 - Pidä 10 °C:ssa

Kokonaisajoaika on ~38 minuuttia 9 jakson kohdalla ja ~46 minuuttia 12 jakson kohdalla.

Näytteen syötetyyppi	PCR-jaksojen määrä (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1 000 ng gDNA	9
50–1 000 ng gDNA:ta FFPE:stä eristettynä	12
gDNA verestä eristettynä	9

Toimenpide

1. Yhdistä seuraavat PCR Master -seoksen valmistelemiseksi. Kerro kukin tilavuus käsiteltävien näytteiden määrällä.
 - EPM (23 µl)
 - Nukleaaiston vesi (23 µl)Reagenssin ylimitoitus sisältyy tilavuuteen.
2. Sekoita PCR Master -seos pipetoimalla 10 kertaa ja sentrifugoi sen jälkeen lyhyen aikaa.
3. Kun levy on magneettijalustalla, poista ja hävitä TWB2 200 µl:n monikanavapipetillä. Kuopan seinille jäävä vaahto ei vaikuta haitallisesti kirjastoon.
4. Poista magneettijalustalta.
5. Lisää välittömästi 40 µl PCR Master -seosta suoraan kunkin kuopan rakeisiin.
6. Sekoita välittömästi pipetoimalla, kunnes rakeet on suspendoitu kokonaan uudelleen. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
7. Sulje näytelevy ja sentrifugoi 280 × g:ssa 10 sekuntia.
8. Sentrifugoi indeksisovitinlevyä arvolla 1 000 × g 1 minuutin ajan.
9. Valmistele indeksisovitinlevy.
 - [< 96 näytettä] Puhkaise indeksisovitinlevyn kalvosulku uuden pipetin kärjellä kuoppien kohdalla vain käsiteltävien näytteiden määrän verran.
 - [96 näytettä] Kohdista uusi semiskirted-tyypin PCR-levy indeksisovitinlevyn yläpuolelle ja puhkaise kalvosulku painamalla alas. Hävitä kalvosulun puhkaisemiseen käytetty PCR-levy.
10. Lisää uuden pipetin kärjellä 10 µl ennalta pareiksi muodostettua indeksisovitinlehtä kuhunkin kuoppaan.
11. Sekoita pipetoimalla 10 kertaa 40 µl:aan asetetulla pipetillä. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 600 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
12. Sulje levy ja sentrifugoi sitten 280 × g:ssa 10 sekuntia.
13. Aseta lämpöblokin päälle ja aja eBLTS PCR -ohjelma.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, säilytä -25 – -15 °C:n lämpötilassa enintään 30 vuorokautta.

Kirjastojen puhdistus

Tässä vaiheessa käytetään kaksipuolista rakeiden puhdistustoimenpidettä monistettujen kirjastojen puhdistukseen.

Tarvikkeet

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Vasta valmistettu 80-prosenttinen etanoli (EtOH)
- 96 kuopan 0,8 ml:n polypropeeninen syväkuoppa-säilytyslevy (MIDI-levy)
- 96 kuopan PCR-levy
- MIDI-levyn magneettinen jalusta
- PCR-levyn magneettinen jalusta
- 1,5 ml:n mikrosentrifugiputket
- Nukleaasiton vesi

Tietoa reagensseista

- Cleanup Beads
 - Vorteksoi ennen jokaista käyttökertaa.
 - Varmista vorteksoimalla usein, että rakeet ovat jakautuneet tasaisesti.
 - Aspiroi ja annostelee hitaasti liuoksen viskositeetin vuoksi.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Tuote	Säilytys	Ohjeet
CB	Huoneenlämpötila	Sekoita vorteksoimalla ja kääntämällä, kunnes nesteen väri on tasainen.
RSB	2–8 °C	Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia. Sekoita vorteksoimalla.

Toimenpide

1. Ravista 96 kuopan PCR-levyä nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan ja sentrifugoi sen jälkeen lyhyesti.
2. Aseta PCR-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (1 minuutti).
3. Vorteksoi CB 3 kertaa 10 sekunnin ajan ja käännä sitten useita kertoja uudelleensuspendoimiseksi.
4. Saat korkealaatuista gDNA:ta toimimalla seuraavasti.

- a. Lisää 77 µl nukleaasitonta vettä uuden MIDI-levyn kaikkiin kuoppiin.
 - b. Lisää 88 µl CB -rakeita MIDI-levyn jokaiseen kuoppaan.
 - c. Siirrä 45 µl supernatanttia PCR-levyn jokaisesta kuopasta MIDI-levyn vastaavaan kuoppaan.
 - d. Hävitä PCR-levy.
 - e. Sekoita pipetoimalla kukin kuoppa 10 kertaa. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
 - f. Sulje levy ja inkuboi huoneenlämpötilassa 5 minuuttia.
 - g. Tarkista ilmakuplien varalta. Mikäli niitä havaitaan, pyöritä alas.
 - h. Laita MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (5 minuuttia).
 - i. Vorteksoi CB perusteellisesti inkuboinnin aikana ja lisää sitten 20 µl *uuden* MIDI-levyn jokaiseen kuoppaan.
 - j. Siirrä 200 µl supernatanttia ensimmäisen MIDI-levyn jokaisesta kuopasta uuden (20 µl CB -rakeita sisältävän) MIDI-levyn vastaaviin kuoppiin.
 - k. Hävitä ensimmäinen MIDI-levy.
 - l. Sekoita pipetoimalla jokainen uuden MIDI-levyn kuoppa 10 kertaa. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
5. Toimi eristetyn FFPE:n kohdalla seuraavasti.
- a. Lisää 81 µl CB -rakeita uuden MIDI-levyn jokaiseen kuoppaan.
 - b. Siirrä 45 µl supernatanttia PCR-levyn jokaisesta kuopasta MIDI-levyn vastaavaan kuoppaan.
 - c. Hävitä PCR-levy.
 - d. Sekoita pipetoimalla kukin kuoppa 10 kertaa. Sulje vaihtoehtoisesti levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
6. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
7. Tarkista ilmakuplien varalta. Mikäli niitä havaitaan, pyöritä alas.
8. Laita MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (5 minuuttia).
9. Poista ja hävitä supernatantti rakeita häiritsemättä.
10. Pese helmet seuraavasti.
- a. Kun levy on magneettisella jalustalla, lisää 200 µl uutta 80-prosenttista EtOH:ta sekoittamatta.
 - b. Inkuboi 30 sekuntia.
 - c. Poista ja hävitä supernatantti rakeita häiritsemättä.
11. Pese helmet **toisen** kerran.
12. Ilmakuivaa magneettisella jalustalla 5 minuuttia.
13. Poista ilmakuivatuksen aikana 20 µl:n pipetillä ja hävitä EtOH-jäämät jokaisesta kuopasta.
14. Poista magneettijalustalta.
15. Lisää 17 µl RSB:tä rakeisiin.
16. Sulje levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.

17. Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.
18. Tarkista ilmakuplien varalta. Mikäli niitä havaitaan, pyöritä alas.
19. Laita levy MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
20. Siirrä 15 µl supernatanttia uudelle 96 kuopan PCR-levylle.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä levy ja aseta se säilytykseen -25 – -15 °C:n lämpötilaan enintään 30 vuorokaudeksi.

Esirikastettujen kirjastojen poolaus

Tässä vaiheessa ainutkertaisilla indekseillä varustetut DNA-kirjastot yhdistetään yhdeksi enintään 12 kirjaston pooliksi.

Poolausmenetelmät

Poolaus voidaan suorittaa tilavuuden tai massan mukaan. Määritä seuraavan taulukon avulla syötteesi sopiva menetelmä.

Taulukko 2 Suositellut poolausmenetelmät

Näytesyöte	Poolausmenetelmä
10–49 ng gDNA	Massa
50–1 000 ng gDNA	Tilavuus
FFPE:stä eristetty gDNA	Massa
gDNA verestä eristettynä	Tilavuus

- Yhden pleksin rikastus ei edellytä esirikastettujen kirjastojen poolausta. RSB:n lisäys saattaa kuitenkin olla tarpeen.
- Esirikastetun kirjaston kvantifioinnin jälkeen kaikki näytesyötetyypit voidaan poolata massan mukaan optimaalisen indeksitasapainon aikaansaamiseksi.
- Erillisissä kokeellisissa valmisteluissa luotujen esirikastettujen kirjastojen lopullinen saanto saattaa vaihdella. Näin ollen poolausta massan mukaan suositellaan optimaalisen indeksitasapainon aikaansaamiseksi.
- Käytä 1 pleksin rikastusta seuraavissa tilanteissa.
 - 10–49 ng gDNA
 - 50–1 000 ng gDNA:ta FFPE:stä eristettynä
 - Alhainen vähäisen alleelitaajuuden tunnistus somaattisen varianttunnistuksen kohdalla.

Poolaus massan mukaan

Kvantifioi seuraavissa tilanteissa kirjastot käyttämään DNA-massaa kirjastoa kohti sellaista rikastusta varten, joka on määritetty kohdassa [Esirikastettujen kirjastojen poolaus yhtä suuressa pitoisuudessa sivulla 35](#).

- 10–49 ng gDNA:n näytesyöte
- 50–1 000 ng gDNA:ta FFPE-näytesyötteestä eristettynä
- Alhainen vähäisen alleelitaajuuden tunnistus somaattisten varianttien tunnistuksen kohdalla
- Verestä eristetty gDNA optimaalisen indeksitasapainon aikaansaamiseksi

Esirikastettujen kirjastojen kvantifointi

1. Aja 1 µl esirikastettuja kirjastoja valitsemallasi fluoresenssipohjaisella kvantifointimenetelmällä, jossa käytetään dsDNA:n interkalaatioväriä.
 - 50–1 000 ng:n korkealaatuisesta gDNA:sta on odotettavissa \geq 500 ng:n esirikastettu kirjastosaanto.
 - 50–1 000 ng:n FFPE:stä eristettyä gDNA:sta on odotettavissa 500–6 000 ng:n esirikastettu kirjastosaanto alustavan näytteen laadun mukaan.

HUOMAUTUS Kvalifioi tämän työnkulun kvantifointimenetelmä vinoumaltaan erilaisten kvantifointimenetelmien kohdalla. Pitoisuustulokset saattavat olla erilaisia käytetyn menetelmän mukaan.

Esirikastettujen kirjastojen poolaus yhtä suuressa pitoisuudessa

Määritä seuraavan taulukon avulla rikastukseen tarvittava DNA-massa kirjastoa kohti näytetyypin ja rikastuksen pleksisyyden mukaan. Optimaalisia rikastussaantoja ja määrittämisen optimaalista suorituskykyä ei taata käytettäessä suositeltua alhaisempia esirikastettuja kirjastosaantoja.

Rikastusreaktion DNA-kokonaismassan ei pitäisi ylittää 6 000 ng.

Näytesyöte	Rikastuksen pleksisyys	DNA-massa kirjastoa kohti (ng)	DNA-kokonaiskirjastomassa (ng)
Korkealaatuinen gDNA	12	250–500	3 000–6 000
FFPE:stä eristetty gDNA	1	200	200

1. Tallenna sellaisten kirjastojen indeksit, jotka aiot poolata tässä vaiheessa.
2. Laske kunkin kirjaston pitoisuuden perusteella tilavuus, joka on lisättävä rikastusreaktioon vaadittavan DNA-massan aikaansaamiseksi.
 - Korkealaatuinen gDNA: laske kirjaston tilavuus, joka tarvitaan 250–500 ng:n syötteeseen.
 - FFPE:stä eristetty gDNA: laske kirjaston tilavuus, joka tarvitaan 200 ng:n syötteeseen.
3. Lisää kunkin kirjaston laskettu tilavuus PCR-levyn samaan kuoppaan.
4. Jos käytetään korkealaatuista gDNA:ta, suorita yksi seuraavista toimista poolattujen esirikastettujen kirjastojen kokonaistilavuuden perusteella:
 - Jos esirikastetun kirjaston tilavuus = 30 µl, jatka kohtaan [Antureiden hybridisaatio sivulla 37](#).
 - Jos esirikastetun kirjaston tilavuus < 30 µl, lisää RSB, jotta saadaan 30 µl:n kokonaistilavuus.
 - Jos esirikastetun kirjaston tilavuus > 30 µl, voit tiivistää poolatun näytteen raepohjaisella menetelmällä tai tyhjiökeskittimellä. Lisää RSB:tä tiivistettyyn poolattuun näytteeseen, jotta saadaan 30 µl:n kokonaistilavuus.
5. Jos käytetään FFPE:stä eristettyä gDNA:ta, suorita yksi seuraavista toimista poolattujen esirikastettujen kirjastojen kokonaistilavuuden perusteella.

- Jos esirikastetun kirjaston tilavuus = 7,5 µl, siirry kohtaan [Antureiden hybridisaatio sivulla 37](#).
- Jos esirikastetun kirjaston tilavuus < 7,5 µl, lisää RSB, jotta saadaan 7,5 µl:n kokonaistilavuus.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä levy ja aseta se säilytykseen -25 – -15 °C:n lämpötilaan enintään 30 vuorokaudeksi.

Poolaus tilavuuden mukaan

Kun syöte on 50–1 000 ng gDNA, saman kokeen yhteydessä luotujen yksittäisten kirjastojen kvantifointia ja normalisointia ei tarvita.

Jotta saat aikaan optimaalisen suorituskyvyn, poolaa vain saman käyttäjän valmistelemat, samassa reagenssierässä valmistellut ja samalla indeksisovitinlevyllä valmistellut esirikastetut kirjastonäytteet.

1. Tallenna sellaisten kirjastojen indeksit, jotka aiot poolata tässä vaiheessa.
2. Yhdistä seuraava esirikastettu kirjasto ja rikastuksesi pleksisyyden RSB-tilavuudet uuden PCR-levyn samaan kuoppaan.

Tuloksena saadaan 30 µl:n tilavuus.

Rikastuksen pleksisyys*	Jokaisen esirikastetun kirjaston tilavuus (µl)	RSB-tilavuus (µl)
1 pleksi	14	16
2 pleksiä	14	2
3 pleksiä	10	0
4 pleksiä	7,5	0
5 pleksiä	6	0
6 pleksiä	5	0
7 pleksiä	4,2	0,6
8 pleksiä	3,7	0,4
9 pleksiä	3,3	0,3
10 pleksiä	3	0
11 pleksiä	2,7	0,3
12 pleksiä	2,5	0

*Katso tiedot muusta kuin vakiopleksisyydestä (2-pleksisestä 11-pleksiseen) kohdasta [Menetelmän rajoitukset sivulla 2](#).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä levy ja aseta se säilytykseen -25 – -15 °C:n lämpötilaan enintään 30 vuorokaudeksi.

[Valinnainen] Esirikastettujen kirjastojen kvalifointi

Jos poolaus suoritetaan tilavuuden mukaan, esirikastettujen kirjastojen kvantifointiin käytetään fluorometriapohjaista menetelmää, jossa käytetään dsDNA:n interkalaatioväriä. Voit kvalifioida esirikastettuja kirjastoja käyttämällä DNA:n fragmenttianalysointilaitetta asianmukaisella fragmenttianalyysisarjalla.

Käytä yhteensä 1 µl kirjaston kvalifointiin. Esirikastetut kirjastot ovat riittävän konsentroituja, jotta voidaan suorittaa pieniä laimennuksia kvantifointiin tai fragmenttianalyysiin.

Antureiden hybridisaatio

Tässä vaiheessa DNA:n kohdealueet sidotaan kaappausantureilla.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjan reagenssit ovat yhteensopivia sekä Illumina että kolmansien tahojen DNA-rikastusoligonukleotidipaneelien kanssa. Tietoa kolmansien tahojen paneeleilta edellytettävistä teknisistä tiedoista on kohdassa [Rikastusanturipaneelin vaatimukset sivulla 10](#).

Tarvikkeet

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB-puskuri 2 + IDT NXT -salpaajat) (sininen korkki)
- Rikastusanturipaneeli
- 96 kuopan PCR-levy
- Liimapintainen sulku
- Valmistele myöhempää toimenpidettä varten:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (kellanuskea korkki)

Tietoa reagensseista

- NHB2 saostuu ja erottuu säilytyksen aikana.
- Rikastusanturin paneelissa viitataan valittuun rikastusoligonukleotidipaneeliin, jonka myyjä on Illumina alihankkija.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Tuote	Säilytys	Ohjeet
EHB2	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla. Jos havaitaan kristalleja ja sameutta, toista vorteksointi tai sekoita pipetoimalla ylös ja alas, kunnes liuos on kirkasta.
Rikastusanturipaneeli	-25 – -15 °C (illumina)	Tuo sekä illumina että kolmansien tahojen paneelit huoneenlämpötilaan. Sekoita vorteksoimalla.
NHB2 (sininen korkki)	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Esilämmitä huoneenlämpötilassa mikronäytteen inkubaattori 5 minuutiksi samaan lämpötilaan käyttämäsi anturin kanssa. Suspendoi uudelleen vorteksoimalla maksiminopeudella 3 kertaa 10 sekunnin ajan. Sentrifugoi lyhyesti. Pipetoi ylös ja alas putken pohjalta. Jos havaitaan kristalleja ja sameutta, toista vorteksointi tai sekoita pipetoimalla ylös ja alas, kunnes liuos on kirkasta. Käytä lämpimänä saostumien uudelleenmuodostumisen ehkäisemiseksi.
SMB3*	2–8 °C	Jos siirryt seuraavaan toimenpiteeseen välittömästi HYB-ohjelman 90 minuutin pidon jälkeen, tuo huoneenlämpötilaan vähintään 2 tuntia ennen HYB-ohjelman käynnistämistä.
EEW* (kullanruskea putki)	-25 – -15 °C	Jos siirryt seuraavaan toimenpiteeseen välittömästi HYB-ohjelman 90 minuutin pidon jälkeen, tuo huoneenlämpötilaan vähintään 2 tuntia ennen HYB-ohjelman käynnistämistä. Esilämmitä huoneenlämpötilassa mikronäytteen inkubaattorissa sovellettavaan hybridisaatioon ja kaappaa lämpötila 30 minuuttia ennen HYB-ohjelman päättymistä.

*Jos pysähdyt ennen seuraavaa toimenpidettä, viivytä tämän reagenssin valmistelua, kunnes saavutaan kyseisen toimenpiteen kohdalle.

2. Tallenna seuraava HYB-ohjelma lämpöblokkiin käyttämällä asianmukaista jaksojen määrää, joka on lueteltu [Taulukko 3](#).

- Valitse esilämmitetyn kannen vaihtoehto ja aseta lämpötilaksi 100 °C
- Reaktiutilavuuden asettaminen
 - [Korkealaatuinen gDNA] 100 µl
 - [FFPE:stä eristetty gDNA] 25 µl
- 98 °C 5 minuutin ajan
- X kappaletta 1 minuutin jaksoja alkaen 98 °C:stä ensimmäisen jakson kohdalla ja laskien lämpötilaa 2 °C jaksoa kohti
- Pidä 90 minuuttia sovellettavassa lämpötilassa:
 - [FFPE:stä eristetty gDNA] 58 °C
 - [80 meerin anturipaneelit] 58 °C
 - [Somaattinen varianttitunnistus] 58 °C
 - [Kaikki muut] 62 °C

Kokonaisajoaika on ~115 minuuttia.

Taulukko 3 Jaksojen määrä näytettä tai paneelia kohti

Näyte- ja paneelityyppi	Jaksojen määrä (X)
FFPE:stä eristetty gDNA (paneelityypistä riippumatta)	20
80 meerin anturipaneelit (paneelityypistä riippumatta)	20
Somaattisten varianttien tunnistus	20
Kaikki muut näytteet ja paneelit	18

Toimenpide

1. [Korkealaatuinen gDNA] Lisää seuraavat reagenssit *luetellussa järjestyksessä* kuhunkin poolattuun kirjastoon PCR-levyllä.
Älä luo masterseosta. NHB2- ja EHB2-masterseoksen luominen vaikuttaa kielteisesti rikastuksen suorituskykyyn.
 - NHB2 (sininen korkki) (50 µl)
 - Rikastusanturipaneeli (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. [Korkealaatuinen gDNA] Käyttäen pipettiä, joka on asetettu 90 µl:aan, sekoita kaikki kuopat 10 kertaa pipetillä.
3. [FFPE:stä eristetty gDNA] Lisää seuraavat reagenssit *luetellussa järjestyksessä* kuhunkin poolattuun kirjastoon PCR-levyllä.

Älä luo masterseosta. NHB2- ja EHB2-masterseoksen luominen vaikuttaa kielteisesti rikastuksen suorituskykyyn.

- NHB2 (sininen korkki) (12,5 µl)
 - Rikastusanturipaneeli (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. [FFPE:stä eristetty gDNA] Sekoita pipetoimalla 20 µl:aan asetetulla pipetillä kaikki kuopat 10 kertaa.
 5. Sulje levy ja sentrifugoi 280 × g:ssa 10 sekuntia.
 6. Aseta näytelevy esiohjelmoidun lämpöblokin päälle ja aja HYB-ohjelma.
 7. Siirry välittömästi seuraavaan toimenpiteeseen, kun HYB-ohjelman lämpötilan pitoaika päättyy.



HUOMIO

Saostumia muodostuu, jos hybridisaatioreaktion lämpötila jää huoneenlämpötilan alapuolelle.

Hybridisoitujen antureiden kaappaus

Tässä vaiheessa käytetään Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)-reagenssia kohdealueille hybridisoituneiden koettimien sieppaamiseen.

Tarvikkeet

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (kellanuskea korkki)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5 ml mikrosentrifugiputki
- 96 kuopan MIDI-levy
- 96 kuopan PCR-levy
- Liimapintainen sulku
- MIDI-levyn magneettinen jalusta
- Valmistele myöhempää toimenpidettä varten:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Tietoa reagensseista

- EEW

- Varmista, että EEW on sulanut huoneenlämpötilassa vähintään 2 tuntia, ennen kuin se esilämmitetään mikronäytteen inkubaattorissa.
- Varmista, että EEW-reagenssia lämmitetty mikronäytteen inkubaattorissa 30 minuuttia ennen HYB-ohjelman päättymistä.
- Jätä EEW mikronäytteen inkubaattoriin, kun sitä ei käytetä. EEW on pidettävä lämmitettynä koko protokollan ajan.
- Se saattaa olla sameaa huoneenlämpötilassa.
- Se saattaa olla kellertävää.
- SMB3
 - SMB3-reagenssin on oltava huoneenlämpötilassa ennen käyttöä.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet.

Tuote	Säilytys	Ohjeet
SMB3	2–8 °C	Anna lämmitä huoneenlämpöiseksi 2 tunnin ajan. Käännä ja vorteksoi sitten, kunnes se on suspendoitu kokonaan uudelleen.
EEW (kullanruskea putki)	-25 – -15 °C	Kun inkubointia on suoritettu 2 tuntia huoneenlämpötilassa, esilämmitä mikronäytteen inkubaattori sovellettavaan hybridisaatioon ja kaappaa lämpötila 30 minuuttia ennen HYB-ohjelman päättymistä.
EE1	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämmössä ja vorteksoi sen jälkeen.
HP3	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämmössä ja vorteksoi sen jälkeen.
ET2	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla.
EPM	-25 – -15 °C	Sulata jäissä yksi tunti. Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi lyhyen aikaa. Siirrä syrjään jäihin.
PPC	-25 – -15 °C	Sulata jäissä yksi tunti. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Siirrä syrjään jäihin.

2. Esilämmitä yksi mikronäytteen inkubaattori MIDI-lämpölohkon insertillä näytelevyn inkuboimiseksi to yhteen seuraavista lämpötiloista. EEW-reagenssin esilämmitykseen voidaan käyttää valinnaista toista mikronäytteen inkubaattoria. Aseta EEW MIDI-lämpölohkon insertin päälle.
- [FFPE] 58 °C
 - [80 meeriä anturipaneeleita kohti] 58 °C
 - [Somaattinen varianttitunnistus] 58 °C
 - [Kaikki muut] 62 °C

Toimenpide

Kaappaus

1. Lisää SMB3 uuden MIDI-levyn vastaavaan kuoppaan seuraavasti.
 - **[Korkealaatuinen gDNA]** Lisää 250 µl SMB3.
 - **[FFPE:stä eristetty gDNA]** Lisää 62,5 µl SMB3-reagenssia.
2. Käyttäen pipettiä, joka on asetettu 100 µl:aan korkealaatuista gDNA:ta varten tai 25 µl:aan FFPE:tä varten, siirrä jokainen poolattu kirjasto 96 kuopan PCR-levystä vastaavaan uuden MIDI-levyn kuoppaan.
3. Sulje levy ja ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 4 minuutin ajan.
4. Mikäli ilmenee roiskumista, sentrifugoi levyä lyhyen aikaa.
5. Laita poolattujen kirjastojen levy MIDI-lämpölohkon insertin päälle mikronäytteen inkubaattorille EEW-putken alle, sulje kansi ja inkuboi sitten 15 minuuttia sovellettavassa lämpötilassa:
 - **[FFPE]** 58 °C
 - **[80 meerin anturipaneeli]** 58 °C
 - **[Somaattinen varianttitunnistus]** 58 °C
 - **[Kaikki muut]** 62 °C
6. Poista poolattujen kirjastojen levy ja sentrifugoi voimalla 280 × g 30 sekunnin ajan.
7. Aseta levy välittömästi MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
8. **[Korkealaatuinen gDNA]** Poista ja hävitä 200 µl:aan asetetulla pipetillä supernatantti kokonaan kustakin kuopasta raepellettiä häiritsemättä.
9. **[FFPE:stä eristetty gDNA]** Poista ja hävitä 90 µl:aan asetetulla pipetillä supernatantti kokonaan kustakin kuopasta raepellettiä häiritsemättä.
10. Poista ja hävitä supernatanttijäämät kokonaan kustakin kuopasta.

Pesu

1. Poista magneettijalustalta.
2. **[Korkealaatuinen gDNA]** Poista nopeasti EEW mikronäytteen inkubaattorista ja lisää 200 µl kuhunkin kuoppaan .
3. **[FFPE:stä eristetty gDNA]** Poista EEW nopeasti mikronäytteen inkubaattorista ja lisää 50 µl kuhunkin kuoppaan.
4. Palauta käyttämätön EEW mikronäytteen inkubaattoriin ja pidä se lämmitettynä.
5. Sulje ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 4 minuutin ajan.
6. Laita näytelevy MIDI-lämpölohkon insertin päälle mikronäytteen inkubaattoriin EEW-putken alle, sulje kansi ja inkuboi sitten 5 minuuttia sovellettavassa lämpötilassa:
 - **[FFPE]** 58 °C

- [80 meerin anturipaneelit] 58 °C
 - [Somaattinen varianttitunnistus] 58 °C
 - [Kaikki muut paneelit] 62 °C
7. Aseta levy välittömästi MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
 8. Poista ja hävitä kaikki supernatantti kuopista käyttämällä pipettiä, joka on asetettu 200 µl:aan korkealaatuista DNA:ta varten tai 50 µl:aan FFPE:tä varten.
 9. Toista vaiheet 1–8 kaksi kertaa, jotta suoritetaan yhteensä kolme pesua.

Pesun siirto

1. Poista magneettijalustalta.
2. **[Korkealaatuinen gDNA]** Poista nopeasti EEW mikronäytteen inkubaattorista ja lisää 200 µl kuhunkin kuoppaan.
3. **[FFPE:stä eristetty gDNA]** Poista EEW nopeasti mikronäytteen inkubaattorista ja lisää 50 µl kuhunkin kuoppaan.
4. Sulje ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 4 minuutin ajan. Jos ilmenee roiskumista, alenna nopeutta 1 600 kierrokseen minuutissa.
5. Siirrä uudelleensuspendoitu raeliuos uudelle MIDI-levylle.
Kuoppiin voi jäädä jonkin verran näytettä.



HUOMIO

Reagenssin siirtäminen vähentää minimiin jäännösreagenssien siirtymisen, joka saattaa estää loppupään PCR:n.

6. Laita näytelevy MIDI-lämpölohkon insertin päälle mikronäytteen inkubaattoriin, sulje kansi ja inkuboi sitten 5 minuuttia sovellettavassa lämpötilassa:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 meerin anturipaneelit] 58 °C
 - [Somaattinen varianttitunnistus] 58 °C
 - [Kaikki muut] 62 °C
7. Aseta levy välittömästi MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
8. Poista ja hävitä kaikki supernatantti kuopista käyttämällä pipettiä, joka on asetettu 200 µl:aan korkealaatuista DNA:ta varten tai 50 µl:aan FFPE:tä varten.
9. Sentrifugoi levyä 280 × g:ssa 30 sekuntia.
10. Laita MIDI-levyn magneettiselle jalustalle 10 sekunniksi.
11. Poista ja hävitä 20 µl:n pipetillä jäännösneeste jokaisesta kuopasta.
12. Siirry välittömästi kohtaan [Eluointi sivulla 44](#) rakeiden liiallisen kuivumisen ja kirjaston saannon menetyksen ehkäisemiseksi.

Eluointi

1. Voit valmistella Elution Master -seoksen yhdistämällä seuraavat tilavuudet. Kerro kukin tilavuus käsiteltävien poolattujen kirjastojen määrällä.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Reagenssin ylimääräinen ylimerkitys sisältyy tilavuuteen.
2. Vorteksoi ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
3. Poista MIDI-levy magneettijalustalta.
4. Lisää 23 µl Elution Master -seosta kuhunkin kuoppaan.
5. Sulje levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 2 minuutin ajan.
6. Inkuboi levyä huoneenlämpötilassa 2 minuuttia.
7. Sentrifugoi 280 × g:ssa 30 sekuntia.
8. Laita se MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
9. Siirrä 21 µl supernatanttia MIDI-levyltä uuden 96 kuopan PCR-levyn vastaavaan kuoppaan.
10. Hävitä MIDI-levy.
11. Lisää 4 µl ET2-reagenssia jokaiseen kuoppaan, joka sisältää 21 µl supernatanttia.
12. Määritä pipetti 20 µl:aan ja sekoita pipetoimalla hitaasti kutakin kuoppaa 10 kertaa.
13. Sulje levy ja sentrifugoi sitten 280 × g:ssa 10 sekuntia.
14. Inkuboi levyä huoneenlämpötilassa 1 minuutin ajan.

Rikastetun kirjaston monistaminen

Tässä vaiheessa käytetään PCR:ää rikastetun kirjaston monistamiseen.

Tarvikkeet

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Liimapintainen sulku

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet:

Tuote	Säilytys	Ohjeet
EPM	-25 – -15 °C	Sulata 4 °C:n lämpötilaan tai säilytä jäissä yksi tunti. Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi lyhyen aikaa. Siirrä syrjään jäihin.
PPC	-25 – -15 °C	Sulata 4 °C:n lämpötilaan jäissä yksi tunti. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Siirrä syrjään jäihin.

2. Tallenna seuraava AMP-ohjelma lämpöblokkiin käyttämällä seuraavassa taulukossa lueteltua asianmukaisten PCR-jaksojen määrää.

- Valitse esilämmitetyn kannen vaihtoehto ja aseta lämpötilaksi 100 °C
- Aseta reaktiutilavuudeksi 50 µl
- 98 °C 45 sekunnin ajan
- (X) jaksoa arvoilla:
 - 98 °C 30 sekunnin ajan
 - 60 °C 30 sekunnin ajan
 - 72 °C 30 sekunnin ajan
- 72 °C 5 minuutin ajan
- Pidä 10 °C:ssa

Kokonaisajoaika on ~35 minuuttia.

Näyte- ja paneelityyppi	(X) jaksoa
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) korkealaatuisen gDNA:han	10
Illumina Exome Panel (CEX) FFPE:lle	12
Kaikki muut näytteet ja paneelit	12 ¹²³⁴

¹ Voidaan säätää enintään 15 jaksoa pienten kolmannen osapuolen paneelien kohdalla myöhemmän optimoinnin avulla. Jos käytetään FFPE:tä, jaksojen määräksi voidaan säätää enintään 17.

² Voidaan säätää enintään 17 jaksoa sellaisten kolmannen osapuolen paneelien kohdalla, joissa on vain 500 anturia. Jos käytetään FFPE:tä, jaksojen määräksi voidaan säätää enintään 19.

³ Voidaan säätää enintään 14 jaksoa FFPE-näytteiden kohdalla.

⁴ PCR-jaksojen määrän lisääminen saattaa johtaa suurempaan duplikaatioasteeseen ja pienemin fragmenttikokoihin FFPE-näytteiden kohdalla.

Toimenpide

1. Lisää 5 µl PPC-reagenssia kuhunkin kuoppaan.

2. Lisää 20 µl EPM-reagenssia kuhunkin kuoppaan.
3. Sulje levy ja ravista nopeudella 1 200 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
4. Sentrifugoi levyä 280 × g:ssa 10 sekuntia.
5. Aseta esiohjelmoidun lämpöblokin päälle ja aja AMP-ohjelma.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, säilytä 2–8 °C:n lämpötilassa enintään kaksi vuorokautta. Jätä vaihtoehtoisesti lämpöblokki päälle enintään 24 tunniksi.

Monistetun rikastetun kirjaston puhdistus

Tässä vaiheessa käytetään Cleanup Beads -puhdistusrakeita rikastetun kirjaston puhdistukseen ja ei-toivottujen tuotteiden poistamiseen.

Tarvikkeet

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Vasta valmistettu 80-prosenttinen etanoli (EtOH)
- Liimapintaiset sulut
- 96 kuopan MIDI-levy
- 96 kuopan PCR-levy
- MIDI-levyn magneettinen jalusta

Tietoa reagensseista

- Cleanup Beads
 - Vorteksoi ennen jokaista käyttökertaa.
 - Varmista vorteksoimalla usein, että rakeet ovat jakautuneet tasaisesti.
 - Aspiroi ja annostele hitaasti liuoksen viskositeetin vuoksi.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet.

Tuote	Säilytys	Ohjeet
CB	Huoneenlämpötila	Sekoita vorteksoimalla ja kääntämällä, kunnes nesteen väri on tasainen.
RSB	2 – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön. Sekoita vorteksoimalla.

2. Valmista uusi 80-prosenttinen EtOH absoluuttisesta etanolista.

Toimenpide

1. Sentrifugoi PCR-levyä 280 × g:ssa 10 sekuntia.
2. Vorteksoi CB 3 kertaa 10 sekuntia ja käännä se sitten.
3. Lisää 40,5 µl CB -puhdistusrakeita uuden **MIDI**-levyn jokaiseen kuoppaan.
4. Siirrä 45 µl PCR-levyn jokaisesta kuopasta MIDI-levyn vastaavaan kuoppaan.
5. Sulje levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
6. Inkuboi MIDI-levyä huoneenlämpötilassa 5 minuuttia.
7. Sentrifugoi 280 × g:ssa 10 sekuntia.
8. Laita se MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (5 minuuttia).
9. Poista ja hävitä 95 µl:aan asetetulla pipetillä supernatantti kokonaan jokaisesta kuopasta.
10. Pese kaksi kertaa seuraavasti.
 - a. Kun levy on magneettisella jalustalla, lisää 200 µl uutta 80-prosenttista EtOH:ta sekoittamatta.
 - b. Inkuboi 30 sekuntia.
 - c. Poista ja hävitä supernatantti rakeita häiritsemättä.
11. Ilmakuivaa magneettisella jalustalla 5 minuuttia.
12. Poista ilmakuivatuksen aikana 20 µl:n pipetillä ja hävitä EtOH-jäämät jokaisesta kuopasta.
13. Poista magneettiselta jalustalta ja lisää 32 µl RSB -puskuria jokaiseen kuoppaan.
14. Sulje levy ja ravista nopeudella 1 800 kierrosta minuutissa 1 minuutin ajan.
15. Inkuboi levyä huoneenlämpötilassa 5 minuuttia.
16. Sentrifugoi 280 × g:ssa 10 sekuntia.
17. Laita se MIDI-levyn magneettiselle jalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
18. Siirrä 30 µl supernatanttia 96 kuopan MIDI-levyltä uuden PCR-levyn vastaavaan kuoppaan.
19. Hävitä MIDI-levy.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, peitä levy ja aseta se säilytykseen -25 – -15 °C:n lämpötilaan enintään 7 vuorokaudeksi.

Rikastettujen kirjastojen tarkistaminen

Voit kvantifioida kaksisäikeisen gDNA-syötteen käyttämällä fluoresenssipohjaista menetelmää, jossa käytetään interkalaatioväriä. Vältä menetelmiä, joilla mitataan kokonaisnukleinihappoa, kuten NanoDropia tai muita UV-absorbointimenetelmiä.

1. Aja 1 µl rikastettuja kirjastoja kvantifiointimenetelmäsi avulla.

HUOMAUTUS Anturin kokonaismolaarisuus vaikuttaa suhteellisesti rikastuksen jälkeisen kirjaston saantoon.

Odotettavissa on 125–235 bp:n keskimääräinen fragmenttikoko ja DNA-fragmenttien jakautuminen kokoalueella, joka vaihtelee välillä ~200 bp – ~1 000 bp.

Kirjastojen laimennus aloituspitoisuuteen

Tässä vaiheessa kirjastot laimennetaan sekvensointijärjestelmän aloituspitoisuuteen, ja tämä on sarjalaimennuksen ensimmäinen vaihe. Kun laimennus aloituspitoisuuteen on suoritettu, kirjastot ovat valmiita denaturointiin ja lopulliseen latauspitoisuuteen laimennukseen.

Riippumatta käyttämästäsi rikastusanturipaneelista Illumina suosittelee sekvensoinnin kohdalla paired-end-tyyppisen ajon määrittämistä siten, että siinä on 151 jaksoa readia kohti (2 × 151) ja 10 jaksoa indeksireadia kohti. Jos haluat vähemmän päällekkäisiä readeja tai vähemmän raakakattavuutta, voit sekvensoida arvoon 2 × 126 tai 2 × 101.

- Laske kirjaston tai poolattujen kirjastojen molaarisuusarvo seuraavalla kaavalla.
 - Käytä kirjaston keskimääräistä kokoa DNA-fragmenttianalysointilaitteella kvalifioitujen kirjastojen kohdalla.
 - Käytä kaikkien muiden kvalifiointimenetelmien kohdalla kirjaston keskimääräisenä kokona 350 bp:tä.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{kirjaston keskimääräinen koko (bp)}} = \text{Molaarisuus (nM)}$$

Jos kirjaston pitoisuus on esimerkiksi 20 ng/μl ja keskimääräinen koko on 350 bp, tulokseksi saatava molaarisuusarvo on 86,58 nM.

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

- Laske molaarisuusarvon avulla RSB:n tilavuudet ja kirjasto, jota tarvitaan kirjastojen laimentamiseksi järjestelmän aloituspitoisuuteen.

Sekvensointijärjestelmä	Vaadittava kirjaston vähimmäistilavuus (μl)	Aloituspitoisuus (nM)	Lopullinen latauspitoisuus (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) tai 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM on lopullisen 350 pM:n lastauspitoisuuden aloituspitoisuus. Säädä lopullista latauspitoisuutta tarvittaessa seuraavan taulukon avulla.

Lopullinen latauspitoisuus (pM)	Poolatun kirjaston pitoisuus (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50

Lopullinen latauspitoisuus (pM)	Poolatun kirjaston pitoisuus (nM)
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Kirjastojen laimennus RSB:llä:

- **Multipleksoiduksi kirjastopooliksi kvantifioidut kirjastot** – Laimenna pooli järjestelmän aloituspitoisuuteen.
- **Yksitellen kvantifioidut kirjastot** – Laimenna jokainen kirjasto järjestelmän aloituspitoisuuteen. Lisää 10 µl kustakin laimennetusta kirjastosta putkeen multipleksoidun kirjastopoolin luomiseksi.

4. Noudata järjestelmäsi denaturointi- ja laimennusohjeita laimennuksen suorittamiseksi lopulliseen latauspitoisuuteen.

- Katso NextSeq 550Dx System -järjestelmän ohjeet kohdasta [NextSeq 550Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 50](#).
- Katso MiSeqDx System -järjestelmän ohjeet kohdasta [MiSeqDx-sekvensoinnin valmistelu sivulla 52](#).
- Katso NovaSeq 6000Dx System -järjestelmän ohjeet kohdasta [NovaSeq 6000Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 53](#).

Lopulliset latauspitoisuudet ovat aloituspiste ja yleinen ohjeistus. Optimoi pitoisuudet työkulkuasi ja kvantifiointimenetelmää varten myöhempien sekvensointiajojen kohdalla tai virtauskyvetin titrauksella.

NextSeq 550Dx -sekvensoinnin valmistelu

Noudata seuraavia ohjeita kirjastojen denaturointiin ja laimennukseen NextSeq 550Dx -sekvensointijärjestelmällä suoritettavan sekvensoinnin yhteydessä.

Tarvikkeet

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

Valmisteleminen

Valmistele *uus*i 0,2 N NaOH -liuoksella laimennus kirjastojen denaturoimiseksi sekvensointia varten. Ylimääräinen tilavuus valmistellaan, jotta pienet pipetointivirheet eivät vaikuta lopulliseen NaOH-pitoisuuteen.



HUOMIO

Vasta laimennettu 0,2 N NaOH on välttämätön denaturointiprosessin onnistumiseksi. Virheellinen denaturointi voi vähentää saantoa.

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet.

Tuote	Säilytys	Ohjeet
HT1	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Säilytä 2–8 °C:n lämpötilassa, kunnes olet valmis laimentamaan denaturoidut kirjastot.

2. Valmista uusi NaOH-laimennus yhdistämällä seuraavat määrät mikrosentrifugin putkeen:
 - Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi (800 µl)
 - 1 N NaOH (200 µl)
 Tuloksena on 1 ml 0,2 N NaOH.
3. Sekoita kääntelemällä putkea useita kertoja.
4. Valmista 200 mM Tris-HCl:ää, pH 7,0, yhdistämällä seuraavat määrät mikrosentrifugin putkeen.
 - Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi (800 µl)
 - 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)
 Tuloksena on 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

HUOMAUTUS Pidä putki suljettuna. Käytä uusi laimennus **12 tunnin** kuluessa.

Kirjastojen denaturointi

1. Yhdistä kirjaston seuraavat tilavuudet ja äskettäin laimennettu 0,2 N NaOH mikrosentrifugiputkessa.
 - 10 µl:n kirjasto
 - 10 µl 0,2 N NaOH
2. Vorteksoi lyhyen aikaa ja sentrifugoi sen jälkeen 280 × g:ssä 1 minuutin ajan.
3. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
4. Lisää 10 µl 200 mM Tris-HCl:ää, pH 7.

Laimenna denaturoidut kirjastot 20 pM:iin

1. Lisää 970 µl ennalta jäähdytettyä HT1:tä putkeen, joka sisältää denaturoituja kirjastoja. Tuloksena on 20 pM:n denaturoitu kirjasto.
2. Vorteksoi lyhyen aikaa ja sentrifugoi sen jälkeen 280 × g:ssä 1 minuutin ajan.
3. Laita 20 pM:n kirjastot jäihin, kunnes ovat valmis siirtymään lopulliseen laimennukseen.

Kirjastojen laimennus latauspitoisuuteen

1. Lisäämällä seuraavat tilavuudet voit laimentaa denaturoidun 20 pM:n kirjastoliuoksen 1,2 pM:iin.
 - Denaturoitu kirjastoliuos (78 µl)
 - Ennalta jäädytetty HT1 (1 222 µl)Kokonaistilavuus on 1,3 ml 1,2 pM:n kohdalla.
2. Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi sykinällä.
3. Siirry sekvensointiin. Katso ohjeet *NextSeq 550Dx -instrumentin käyttöoppaasta (asiakirjanro 1000000009513)* ja *Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Workflow Guide for NextSeq 550Dx -työnkulkuoppaasta (asiakirjanro 200015671)* tai *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on NextSeq 550Dx -sovelluksen käyttöoppaasta (asiakirjanro 200025238)*.

MiSeqDx-sekvensoinnin valmistelu

Noudata seuraavia ohjeita kirjastojen denaturointiin ja laimennukseen MiSeqDx-sekvensointijärjestelmällä suoritettavan sekvensoinnin yhteydessä.

Tarvikkeet

- HT1 (Hybridisaatiopuskuri)
- 1 N NaOH

Valmisteleminen

Valmistele *uusi* 0,2 N NaOH -liuoksella laimennus kirjastojen denaturoimiseksi sekvensointia varten. Ylimääräinen tilavuus valmistellaan, jotta pienet pipetointivirheet eivät vaikuta lopulliseen NaOH-pitoisuuteen.



HUOMIO

Vasta laimennettu 0,2 N NaOH on välttämätön denaturointiprosessin onnistumiseksi. Virheellinen denaturointi voi vähentää saantoa.

1. Valmistele seuraavat tarvikkeet.

Tuote	Säilytys	Ohjeet
HT1	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämmössä. Säilytä 2–8 °C:n lämpötilassa, kunnes olet valmis laimentamaan denaturoidut kirjastot.

2. Valmista uusi NaOH-laimennus yhdistämällä seuraavat määrät mikrosentrifugin putkeen:
 - Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi (800 µl)
 - 1 N NaOH (200 µl)Tuloksena on 1 ml 0,2 N NaOH.

HUOMAUTUS Pidä putki suljettuna. Käytä uusi laimennus **12 tunnin** kuluessa.

Denaturoi 4 nM:n kirjasto

1. Yhdistä seuraavat tilavuudet mikrosentrifugiputkessa.
 - 4 nM:n kirjasto (5 µl)
 - 0,2N NaOH (5 µl)
2. Vorteksoi lyhyen aikaa ja sentrifugoi sen jälkeen 280 × g:ssä 1 minuutin ajan.
3. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
4. Lisää 990 µl ennalta jäähdytettyä HT1:tä putkeen, joka sisältää denaturoidun kirjaston. Tuloksena on 1 ml:n 20 pM denaturoitu kirjasto.

Laimenna denaturoitu 20 pM:n kirjasto

1. Laimenna haluttuun pitoisuuteen seuraavien tilavuuksien avulla.

Pitoisuus	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM:n kirjasto	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Ennalta jäähdytetty HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Sekoita kääntämällä ja sentrifugoi sykinällä.
3. Siirry sekvensointiin. Katso ohjeet *MiSeqDx-laitteen käyttöopas MOS v4:lle (asiakirjanro 1000000157953)*-oppaasta ja *Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Workflow Guide for MiSeqDx -työnkulkuoppaasta (asiakirjanro 200015661)*.

NovaSeq 6000Dx -sekvensoinnin valmistelu

Noudata seuraavia ohjeita kirjastojen denaturointiin ja laimennukseen NovaSeq 6000Dx -sekvensointijärjestelmällä suoritettavan sekvensoinnin yhteydessä.

Tarvikkeet

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

Valmisteleminen

Valmistele *uusi* 0,2 N NaOH -liuksella laimennus kirjastojen denaturoimiseksi sekvensointia varten. Ylimääräinen tilavuus valmistellaan, jotta pienet pipetointivirheet eivät vaikuta lopulliseen NaOH-pitoisuuteen.



HUOMIO

Vasta laimennettu 0,2 N NaOH on välttämätön denaturointiprosessin onnistumiseksi. Virheellinen denaturointi voi vähentää saantoa.

1. Yhdistä seuraavat tilavuudet mikrosentrifugiputkessa 1 N NaOH:n laimentamiseksi 0,2 N NaOH:ksi:

Taulukko 4 S2-tila

Reagenssi	Yhden virtauskyvetin tilavuus (µl)	Kahden virtauskyvetin tilavuus (µl)
Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi	40	80
Varastoerä 1 N NaOH	10	20

Näiden tilavuuksien tuloksena on 50 µl 0,2 N NaOH -liuosta yhdelle virtauskyvetille tai 100 µl 0,2 N NaOH -liuosta kahdelle virtauskyvetille.

Taulukko 5 S4-tila

Reagenssi	Yhden virtauskyvetin tilavuus (µl)	Kahden virtauskyvetin tilavuus (µl)
Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi	80	160
Varastoerä 1 N NaOH	20	40

Näiden tilavuuksien tuloksena on 100 µl 0,2 N NaOH -liuosta yhdelle virtauskyvetille tai 200 µl 0,2 N NaOH -liuosta kahdelle virtauskyvetille.

2. Sekoita kääntämällä ylösalaisin useita kertoja tai vorteksoi huolellisesti.
3. Valmista 400 mM Tris-HCl:ää, pH 8,0, yhdistämällä seuraavat määrät mikrosentrifugin putkeen.

- Laboratoriokäyttöön tarkoitettu vesi (600 µl)
- 1 M Tris-HCl, pH 8,0 (400 µl)

Tuloksena on 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0

HUOMAUTUS Pidä putki suljettuna. Käytä uusi laimennus **12 tunnin** kuluessa.

Normalisoidun kirjastopoolin luominen

Latauspitoisuus voi vaihdella kirjaston valmistelu-, kvantifiointi- ja normalisointimenetelmien mukaan.

Seuraavien ohjeiden avulla voit normalisoida kirjastot oikeaan pitoisuuteen ja poolata ne sen jälkeen. Samassa virtauskyvetissä sekvensoidut kirjastot on yhdistettävä yhteen normalisoituun pooliin.

HUOMAUTUS Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit -sarja -sarjalla ajettavien näytteiden enimmäismäärä kaistaa kohden on 192. Tämä raja johtuu UD-indeksien kokonaismäärästä joukoissa A ja B.

Kirjastojen normalisointi poolausta varten

- Määritä tarvittava poolatun kirjaston pitoisuus halutun lopullisen latauspitoisuuden perusteella.
 - Lopullista latauspitoisuutta 350 pM varten vaaditaan poolatun kirjaston pitoisuudeksi 1,75 nM.
 - Jos haluat määrittää poolatun kirjaston pitoisuuden eri lopulliselle latauspitoisuuden osalta, katso kohta [Kirjastojen laimennus aloituspitoisuuteen sivulla 49](#).
- Normalisoi kirjastot haluttuun poolatun kirjaston pitoisuuteen käyttämällä 10 mM Tris-HCl:ää, pH 8,5. Lisätietoja kirjastojen laimentamisesta sopivaan pitoisuuteen on Illumina verkkosivustolla olevassa [poolauslaskimessa](#).

Suosittelut latauspitoisuudet

Optimaalinen DNA:n latauspitoisuus riippuu kirjastotyypistä ja insertin koosta. > 450 bp:n kirjastojen tapauksessa voi olla tarpeen käyttää suurempia latauspitoisuuksia.

Normalisoitujen kirjastojen poolaaminen ja valinnaisen PhiX-kontrollin lisääminen

- Yhdistä kunkin normalisoidun kirjaston sopiva tilavuus uuteen mikrosentrifugiputkeen, jolloin saadaan yksi seuraavista lopullisista tilavuuksista:

Tila	Lopullinen tilavuus (µl)
S2	150
S4	310

- [Valinnainen]** Lisää 1-prosenttista ei-denaturoitua PhiX>:ää seuraavasti.
 - Laimenna 10 nM PhiX:ää 2,5 nM:iin käyttäen 10 mM Tris-HCl:ää, pH 8,5.
 - Lisää sopiva määrä ei-denaturoitua 2,5 nM PhiX:ää ei-denaturoidun kirjastopoolin putkeen.

Tila	Ei-denaturoitu 2,5 nM PhiX (µl)	Ei-denaturoitu kirjastopooli (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

PhiX:ssä lisättäessä 1 % on suositeltava määrä hyvin tasapainotettuja kirjastoja varten. Vähäisen monimuotoisuuden kirjastot voivat vaatia enemmän. Jos haluat käyttää PhiX-kontrollia vähäisen monimuotoisuuden kirjastojen kanssa, ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen saadaksesi opastusta.

Kirjastopoolin ja valinnaisen PhiX-kontrollin denaturointi

- Lisää 0,2 N NaOH:ia ei-denaturoidun kirjastopoolin ja valinnaisen PhiX:n putkeen seuraavasti.

Virtauskylvetti	0,2 N NaOH	Ei-denaturoitu kirjastopooli (µl)	Tuloksena saatava tilavuus
S2	37	150	187 µl, tai 187,9 µl yhdessä PhiX:n kanssa
S4	77	310	387 µl, tai 388,9 µl yhdessä PhiX:n kanssa

- Sulje korkki ja vorteksoi sitten lyhyesti.
- Sentrifugoi kiihtyvyydellä 280 × g enintään 1 minuutin ajan.
- Denaturoi inkuboimalla huoneenlämmössä 8 minuuttia.
- Lisää 400 mM Tris-HCl:ää, pH 8,0; seuraavasti neutraloidaksesi.

Tila	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Tuloksena saatava tilavuus
S2	38	225 µl, tai 225,9 µl yhdessä PhiX:n kanssa
S4	78	465 µl, tai 466,9 µl yhdessä PhiX:n kanssa

- Sulje korkki ja vorteksoi sitten lyhyesti.
- Sentrifugoi kiihtyvyydellä 280 × g enintään 1 minuutin ajan.
- Siirrä denaturoidun kirjaston tai denaturoidun kirjaston ja PhiX:n koko tilavuus NovaSeq 6000Dx -kirjastoputkeen.
- Siirry sekvensointiin. Katso ohjeet *NovaSeq 6000Dx -instrumentin tuotedokumentaatiosta (asiakirjanro 200010105)* ja *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx for NovaSeq 6000Dx -oppaasta (asiakirjanro 200014776)*.

Vianmääritys

Seuraavan taulukon avulla voit tehdä työnkulun ongelmien vianmäärityksen. Jos näytteen sekvensointiajo tai kirjaston valmistelu epäonnistuu kaksi kertaa, vianmäärityksen lisätoimet saattavat olla tarpeen. Ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen.

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
Sekvensointiajo ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita	Käyttäjän tai laboratoriolaitteiden virhe määrityksen työnkulussa	<p>Kvalifioi rikastetut kirjastot varmistaaksesi asianmukainen kirjaston tuotos ja fragmenttikokojakauma. Toista kirjaston valmistelu jostakin seuraavista vaiheista riippuen siitä, missä epäilty käyttövirhe tai laitevirhe tapahtui. Jos tuntematon virhe tai muita virheitä tapahtui, ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen, jotta voidaan tehdä ajon vianmääritys.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sekvensoi kirjastot uudelleen. Katso kohta NextSeq 550Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 50, MiSeqDx-sekvensoinnin valmistelu sivulla 52, tai NovaSeq 6000Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 53. • Rikasta kirjastot uudelleen. Katso kohta Antareiden hybridisaatio sivulla 37. • Aloita kirjaston valmistelu työnkulun alusta. Katso Käyttöohjeet sivulla 21.
	Laitteeseen liittyvä ongelma	Ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen.
FASTQ-luontiin liittyvä virhe tai yleisen sekvensointijärjestelmän virhe (esim. verkkovirhe, virheet reagenssien latauksessa/purkamisessa jne.)	Ohjelmisto- tai laiteongelma	<p>Katso analyysiin liittyviä ohjeita moduulin tai sovelluksen ohjeesta tai katso NextSeq 550Dx -laitteen käyttöopas (asiakirja nro 1000000009513), MiSeqDx-laitteen käyttöopas MOS v4:lle (asiakirjanro 1000000157953) tai NovaSeq 6000Dx -instrumentin tuotedokumentaatio (asiakirjanro 200010105).</p> <p>Saat apua ottamalla yhteyttä Illumina tekniseen tukeen.</p>

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
DNA-kirjastosta ei saada riittävästi saantoa sekvensoinnin lataukseen	Näytesyötettä koskevia vaatimuksia ei noudatettu	Varmista asianmukainen näytesyöte ja toista kirjaston valmistelu. Katso kohta Näytesyötettä koskevat suositukset sivulla 18.
	Käyttö- tai laitevirhe määrittämisen työkulussa	Toista kirjaston valmistelu jostakin seuraavista vaiheista riippuen siitä, missä epäilty käyttövirhe tai laitevirhe tapahtui. Jos tuntematon virhe tai muita virheitä tapahtui, ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen, jotta voidaan tehdä ajon vianmääritys. <ul style="list-style-type: none"> • Sekvensoi kirjastot uudelleen. Katso kohta NextSeq 550Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 50, MiSeqDx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 52, tai NovaSeq 6000Dx -sekvensoinnin valmistelu sivulla 53. • Rikasta kirjastot uudelleen. Katso kohta Antireiden hybridisaatio sivulla 37. • Aloita kirjaston valmistelu työkulun alusta. Katso Käyttöohjeet sivulla 21.
	Rikastusanturipaneelia koskevia vaatimuksia ei noudatettu	Varmista, että käytössä on asianmukainen rikastusanturipaneeli ja toista kirjaston valmistelu. Katso kohta Rikastusanturipaneelin vaatimukset sivulla 10.

Suorituskykyominaisuudet

Suorituskyky kokonaisilla eksomipaneeleilla

Eksomipaneelin suorituskykyä testattiin käyttämällä alhaisinta (50 ng) ja korkeinta (1 000 ng) suositeltua Coriell Cell Line gDNA NA12878:n syötettä ituratavariantin tunnistuksen tunnetulla totuusjoukolla (Coriell-platinagenomi). Eksomipaneelia 1 (45 Mb) ja eksomipaneelia 2 (36,8 Mb) käytettiin edustavina paneeleina. 24 teknistä replikaattia testattiin Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrityksellä käyttäen eksomipaneelia 1 (45 Mb) kahdessa 12 pleksin rikastusreaktiossa. 12 teknistä replikaattia testattiin Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrityksellä käyttäen eksomipaneelia 2 (36,8 Mb) yhdessä 12 pleksin rikastusreaktiossa. Rikastetut kirjastot sekvensoitiin NextSeq 550Dx -sekvensointijärjestelmässä DNA Generate FASTQ Dx Local Run Manager -moduulilla.

Seuraavassa taulukossa esitetään toissijaisen sekvensoinnin keskiarvot ja varianttintunnistuksen suorituskykymittarit kunkin paneelin kohdalla testattujen teknisten replikaattien osalta.

Taulukko 6 Määrittelyn suorituskyky kahdella kokonaisella eksomipaneelilla

Paneeli	Tyynyllisen ainutkertaisen readin rikastus	Kattavuuden yhdenmukaisuus	Fragmenttipituuden keskiarvo	SNV-takaisin-kutsu ¹	SNV-tarkkuus ²	Indel-takaisin-kutsu ¹	Indel-tarkkuus ²
Eksomipaneeli 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Eksomipaneeli 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹Takaisin-kutsu = Positiiviset/(todelliset positiiviset + virheelliset negatiiviset)

²Tarkkuus = Todelliset positiiviset/(todelliset positiiviset + virheelliset positiiviset)

Määrittelyn tunnistusraja

Horizon HD799 DNA -viitestandardia käytettiin tunnistusrajan testaukseen. HD799 koostuu kohtalaisen vaarantuneesta formaliinilla käsitellystä DNA:sta, jossa on tunnettuja SNV-kohteita alleelitaajuuksilla alueella 1–24,5 %. Testauksessa käytettiin alhaisinta suositeltua DNA-syötettä (50 ng) ja arvioitiin SNV-kohteiden tunnistusastetta, kun variantin alleelitiheys (VAF) oli $\geq 5,0$ %. 16 teknistä replikaattia testattiin illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrittelyllä käyttämällä FFPE-työnkulkua, joka on rikastettu yleisellä syöpää koskevalla rikastuspaneelilla (1,94 Mb) 16 (1 pleksin) rikastuksessa ja sen jälkeen sekvensoitu NextSeq 550Dx -laitteessa DNA Generate FASTQ Dx -moduulilla.

Kaikki näytteet läpäisivät paneelikohtaiset näytteen suorituskykyvaatimukset seuraavassa taulukossa esitetyllä tavalla.

Taulukko 7 Tunnistusrajan näytesuorituskyky

Paneeli	Variantin tunnistusaste SNV-kohteissa, kun VAF $\geq 5,0$ %	Keskiarvo Kattavuuden yhdenmukaisuus
Yleinen syöpää koskeva rikastuspaneeli (1,94 Mb, 523 geeniä)	100 %	99 %

Häiritsevät aineet

Mahdollisten interferenttien vaikutusta illumina DNA Prep with Enrichment Dx:ssä arvioitiin testaamalla määrittelyn suorituskykyä interferenssiä aiheuttavien aineiden läsnä ollessa.

Interferenssi kokoveressä

Asetaminofeenia (eksogeeninen yhdiste, lääkevalmiste), kreatiniinia ja triglyseridejä (endogeeniset metaboliitit) testattiin lisäämällä niitä ihmisen kokoverinäytteisiin ennen DNA:n eristämistä. Veren keräyksestä (lyhyt näytteenotto) johtuvan interferenssin arvioimiseksi kokoverinäytteisiin lisättiin myös EDTA:ta. Lisäksi näytteen

valmistelusta johtuvan interferenssin arvioimiseksi molekyylilaadun etanolia lisättiin kokoverestä eristettyyn DNA:han.

Seuraavassa taulukossa esitetään testipitoisuudet interferenttiä kohti.

Taulukko 8 Kokoverestä testattavat mahdollisesti interferenssiä aiheuttavat aineet ja pitoisuudet

Testattu aine	Testipitoisuus
Asetaminofeeni	15,6 mg/dl* Odotettavissa oleva kolme kertaa korkeampi pitoisuus lääkkeen terapeuttisen annoksen jälkeen.
Kreatiniini	15 mg/dl* Korkein populaatiossa havaittu pitoisuus.
Triglyseridit	1,5 g/dl* Korkein populaatiossa havaittu pitoisuus.
EDTA	6 mg/ml Kolme kertaa veressä odotettavissa oleva pitoisuus EDTA-putkiin kerättyinä.
Molekyylilaadun etanoli	15 % v/v Eluaatissa DNA:n eristyksen jälkeen.

*CLSI EP37-ED1:2018:n mukaan

Interferenssiä aiheuttavaa ainetta kohti testattiin 12 teknistä replikaattia Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrityksellä, joka on rikastettu eksomipaneelilla 1 (45 Mb, jossa on yksittäisen pleksin (12 pleksin) rikastus, ja joka sekvensoidaan sen jälkeen NextSeq 550Dx -laitteessa DNA Generate FASTQ Dx -moduulilla.

Testattavien aineiden kohdalla kaikki 12 näytettä vastasivat näytteen suorituskykyvaatimuksia, eikä määrityksen suorituksessa havaittu interferenssiä.

Interferenssi FFPE-kudoksessa

Kaksi kolorektaalista FFPE-näytettä testattiin, kun mukana oli 0,1 mg hemoglobiinia 10 µm:n FFPE -osiota kohti tai tällainen hemoglobiini puuttui. Tarkoituksena oli edustaa pahinta mahdollista tilannetta, jossa 50 % FFPE-kudosnäytteestä on kontaminoitunut verellä, jonka hemoglobiinitaso on korkea. Näytteet testattiin Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrityksellä yleisellä syöpää koskevalla rikastuspaneelilla 1 (1,94 Mb), jota käytetään edustuspaneelilla yksittäisen pleksin rikastuksissa. Rikastetut kirjastot sekvensoitiin tämän jälkeen NextSeq 550Dx -laitteessa DNA Generate FASTQ Dx -moduulilla. Kaikki näytteet vastasivat näytteiden suorituskykyvaatimuksia, ja osoitettiin, että hemoglobiini ei vaikuta määrityksen suorituskykyyn häiritsevästi.

Näytteiden valmistelusta johtuvan interferenssin arvioimiseksi kaksi eksogeenistä yhdistettä lisättiin virtsarakon syöpää koskevasta FFPE-kudosnäytteestä eristettyyn DNA:han. Testatut eksogeeniset aineet ovat eristettyjä liuoksia, joita käytetään yleisessä DNA:n eristysprosessissa, ja ne on lueteltu seuraavassa taulukossa yhdessä testattujen määrien kanssa.

Testiaineliuokset ovat kaupallisesti saatavilla sarakepohjaisissa DNA-eristyssarjoissa.

Taulukko 9 FFPE:ssä testatut potentiaalisesti interferenssiä aiheuttavat eksogeeniset aineet ja pitoisuudet

Testattu aine	Testipitoisuus (µl / 30 µl:n eluaatti)
Parafiininpoistoliuos	113 x 10 ⁻⁶
Pesupuskuri AW2	0,417

Interferenssiä aiheuttavaa ainetta kohti testattiin kahdeksan teknistä replikaattia Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrityksellä, joka on rikastettu yleisellä syöpää koskevalla rikastuspaneelilla (1,94 Mb), jossa on yksittäisen pleksin rikastuksia, ja joka sekvensoidaan sen jälkeen NextSeq 550Dx -laitteessa DNA Generate FASTQ Dx -moduulilla.

Molempien testattavien aineiden kohdalla kaikki kahdeksan näytettä vastasivat näytteen suorituskysyvaatimuksia, eikä määrityksen suorituksessa havaittu interferenssiä.

Ristikontaminaatio

Coriell Cell Line gDNA NA12878- (naaras, 10 näytettä), Coriell Cell Line gDNA NA12877- (koiras, 12 näytettä), ja ei mallikontrolleja (NTC, 2 näytettä)-näytteet testattiin Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -määrityksellä ruudukkokuviolla levyasettelussa. Kaikissa näytteissä käytettiin korkeinta (1 000 ng) gDNA-syötesuosituksista vaativimpana ehtona näytteen ristikontaminaation arviointiin. Testaus suoritettiin kaksi kertaa, ja suorittajina oli kaksi eri käyttäjää. Eksomipaneelia 1 (45 Mb) käytettiin 12 pleksin rikastusreaktioissa. Rikastetut kirjastot sekvensoitiin NextSeq 550Dx:ssä DNA Generate FASTQ Dx:llä. Arviointi suoritettiin arvioimalla koirasten Y-kromosomin kattavuus naarasnäytteissä vertaamalla niitä kokonaisen naarasten näytteiden levyn taustatasoihin sekä NTC-näytteiden indeksiedustukseen.

Taulukko 10 Ristikontaminaatiotulokset

Naarasnäytteet, joissa on koirasten Y-kromosomin kattavuus < 3x lähtötason melussa	Indeksin edustus NTC:ssä
100 %	< 0,0005 %

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen suorituskyky

NovaSeq 6000Dx:lle tarkoitettuna DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksen suorituskykyominaisuudet on esitetty *NovaSeq 6000Dx -instrumentin pakkausselosteessa (asiakirjanro 200025276)*.

NextSeq 550Dx:n DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksessa on samat toissijaisen analyysin työkulut kuin NovaSeq 6000Dx:ssä, mukaan lukien seuraavat kolme työkulkua: FASTQ-tiedostojen tuottaminen, FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottaminen ituratavarianttien tunnistukseen sekä FASTQ- ja VCF-tiedostojen tuottaminen somaattisten varianttien tunnistukseen.

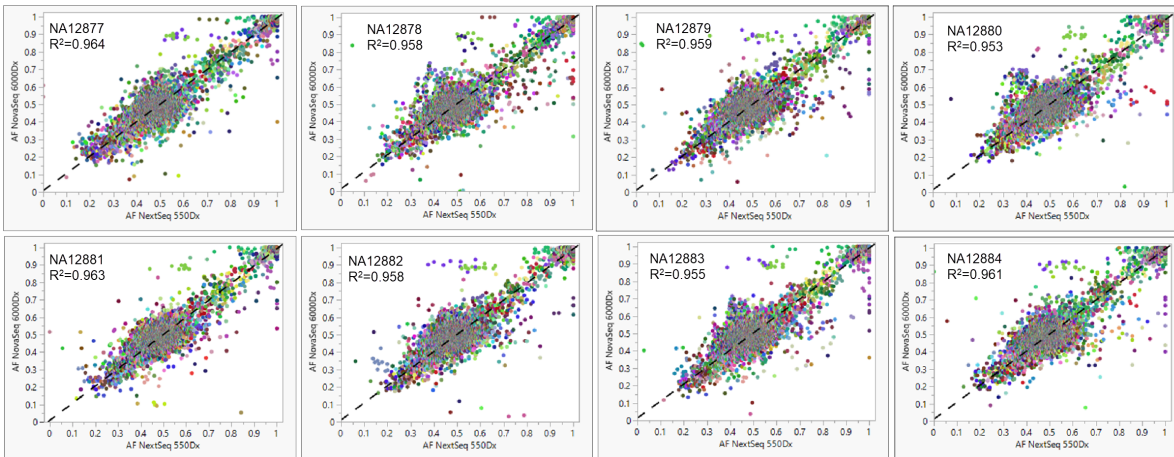
Vastaava toissijaisen analyysin suorituskyky saatiin samasta kirjaston valmistelusta, joka sekvensoitiin molemmilla alustoilla. Coriell Cell Line gDNA -näytteiden varianttien tunnistusaste ([Taulukko 11](#)) ja tiheyden yhdenmukaisuus ([Kuva 1](#)) arvioitiin käyttämällä edustavaa määrittystä, joka oli suunniteltu suorittamaan haku useiden erilaisten geenien osalta, jotka kattavat 1 970 505 emästä (9 232 kohdetta) kaikissa 23 ihmisen kromosomissa. Kahdeksan Platinum Genome DNA -näytettä testattiin, seitsemän kuutena replikaattina (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) ja yksi viitenä replikaattina (NA12881) (ks. [Kuva 1](#)). Kirjastot sekvensoitiin kolmella ajolla NovaSeq 6000Dx- ja NextSeq 550Dx -instrumenteilla, ja varianttintunnistus tehtiin tuottamalla FASTQ- ja VCF-tiedostoja ituratavarianttien tunnistuksen työkulkua varten DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovelluksessa.

NovaSeq 6000Dx- ja NextSeq 550Dx -instrumenttien sovelluksen suorituskyvyn vahvan korrelaation perusteella *NovaSeq 6000Dx -instrumenttien pakkausselosteessa (asiakirjanro 200025276)* esitetyt toissijaiseen analyysiin liittyvät suorituskykyominaisuudet on määritelty myös NextSeq 550Dx -instrumentin DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellusta koskeviksi.

Taulukko 11 Sovelluksen suorituskyky – SNV:iden, insertioiden ja deleetioiden varianttien tunnistusnopeus

Paneeli	Varianttien tunnistusnopeus NovaSeq 6000Dx -laitteessa	Varianttien tunnistusnopeus NextSeq 550Dx -laitteessa
Pan-genomi-paneeli (1,97 Mb, 9 232 kohdetta, 23 kromosomia)	99,9 %	99,9 %

Kuva 1 Varianttitiheyden vertailu NovaSeq 6000Dx- ja NextSeq 550Dx -ajoissa DRAGEN for IDPE Dx -sovelluksen analyysia varten



Liite: Illumina UD -indeksisovitinsekvenssit

Nämä ainutkertaiset kaksoisindeksisovittimet (UD) järjestellään levyllä suositellun parinmuodostusstrategian täytöntönpänoa varten. Indeksisovittimet ovat 10 emäksen pituisia tavanomaisten kahdeksan emäksen sijasta.

Indeksisovittimet 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i 7] GTCTCGTGGGCTCGG

Indeksisovittimet 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i 5] TCGTCGGCAGCGTC

Seuraavaa sekvenssiä käytetään Readin 1 ja Readin 2 sovittimen leikkaukseen.

CTGTCTCTTATACACATCT

Levyn A/Joukon 1 indeksisovittimet

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
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

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAAC TGAA
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	GTTGCGGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC

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

Levyn B/Joukon 2 indeksisovittimet

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGATT
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	TATATTTCGAG
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
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
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
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA

Indeksin nimi	i7 emästä sovittimessa	i5 emästä sovittimessa
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Versiohistoria

Asiakirja	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirjanro 200038118 v00	Heinäkuu 2023	<p>Ensimmäinen versio.</p> <p>Edellinen asiakirja 200019584 on korvattu tällä asiakirjalla.</p> <p>Muutokset asiakirjasta 200019584 v2 tähän uuteen asiakirjaan:</p> <ul style="list-style-type: none"> Lisätty sisältöä, joka tukee sekvensointia NextSeq 550Dx -instrumentilla käyttämällä NextSeq 550Dx -laitteelle tarkoitettua DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx -sovellusta. Erikseen hankittavat reagenssit -luettelo on selkeytetty. Lisätty poikkeustapahtumien raportointitiedot Varoitukset ja varotoimet -kohtaan. Selvennetty rikastuskirjastojen odotusarvoja. Lisätty ohje valmistella 400 mM Tris-HCl, pH 8,0. Poistettu sekvensoinnin valmisteluvaiheen kirjoitusvirhe. <p>Aiemmin asiakirjaan 200019584 tehdyt muutokset:</p> <ul style="list-style-type: none"> Lisätty sisältöä NovaSeq 6000Dx -laitteella tapahtuvan sekvensoinnin tueksi. Lisätty sekvensointijärjestelmän nimet ja kuvastonumerot. Poistettu ainutkertaiset kaksoisindeksointitiedot yksittäisen indeksin kirjastojen kohdalla.

Patentit ja tavaramerkit

Tämä asiakirja ja sen sisältö ovat Illumina, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden ("Illumina") omaisuutta, ja ne on tarkoitettu ainoastaan Illumina asiakkaiden sopimuskäyttöön tässä kuvattujen tuotteiden käyttöön liittyen eikä mihinkään muuhun tarkoitukseen. Tätä asiakirjaa ja sen sisältöä ei saa käyttää tai jakaa missään muussa tarkoituksessa ja/tai välittää, paljastaa tai jäljentää millään muulla tavoin ilman Illuminalta ennakkoon saatua kirjallista lupaa. Illumina ei tällä asiakirjalla luovuta mitään käyttöoikeuksia sen patentti-, tavaramerki-, tekijänoikeus- tai tapaoikeuksien nojalla eikä vastaavien kolmansien osapuolten oikeuksien nojalla.

Tässä kuvattuja tuotteita saa käyttää vain pätevä ja asianmukaisesti koulutettu henkilökunta noudattamalla täsmällisesti tässä asiakirjassa annettuja ohjeita, jotta tuotteiden asianmukainen ja turvallinen käyttö voidaan taata. Asiakirjan sisältö on luettava ja ymmärrettävä kokonaisuudessaan ennen näiden tuotteiden käyttöä.

MIKÄLI KAIKKIA TÄSSÄ ANNETTUJA OHJEITA EI LUETA JA TÄSMÄLLISESTI NOUDATETA, SEURAUKSENA VOI OLLA TUOTTEIDEN VAURIOITUMINEN, HENKILÖVAHINKOJA JOKO KÄYTTÄJILLE TAI MUILLE JA MUITA OMAISUUSVAHINKOJA, MINKÄ LISÄKSI TUOTTEITA MAHDOLLISESTI KOSKEVAT TAKUUT MITÄTÖITYVÄT.

ILLUMINA EI OLE VASTUUSSA TÄSSÄ KUVATTUJEN TUOTTEIDEN VÄÄRINKÄYTÖSTÄ (MUKAAN LUKIEN TUOTTEEN OSAT JA OHJELMISTO).

© 2023 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

Kaikki tavaramerkit ovat Illumina, Inc:n tai niiden vastaavien omistajien omaisuutta. Tarkemmat tavaramerkkitiedot ovat verkkosivustolla www.illumina.com/company/legal.html.

Yhteystiedot



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (Pohjois-Amerikan ulkopuolella)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Tuotteiden merkinnät

Katso kaikkien tuotteen pakkauksessa ja merkinnöissä käytettyjen symbolien selitykset verkko-osoitteesta support.illumina.com käyttämäsi pakkauksen välilehdeltä *Documentation* (Dokumentaatio).